

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA,  
MOLECULAR E SENSIBILIDADE A FUNGICIDA DE *Cercospora coffeicola***

**ANA PAULA ZIMBARDI LOMBARDI**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP  
Março – 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA,  
MOLECULAR E SENSIBILIDADE A FUNGICIDA DE *Cercospora coffeicola***

**ANA PAULA ZIMBARDI LOMBARDI**

Orientador: Prof. Dr. Chukichi Kurozawa

Co-Orientadora Dr. Eiko E. Kuramae-Izioka

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP  
Março – 2002

*“Vencem na vida os que a encaram com permanente otimismo.*

*Vencem sempre os que sabem lutar, sem perder a direção da vitória.*

*Vencem aqueles que começam a luta pensando que, por mais árdua que seja,*

*ela os leva para o endereço que se propuseram, sem pensar em derrotas.*

*Vencem aqueles que não desanimam em face das dificuldades e para os quais os obstáculos servem como degraus para a subida e para a consecução do objetivo.”*

*À Deus*

*Agradeço pela presença  
em todos os momentos da  
minha vida.*

*A Minha Mãe Ana Maria (in memóiriam), ao Meu Pai Artur, por  
dedicarem parte de suas vidas, na minha formação pessoal e  
profissional, pelo amor a mim dedicado e por me proporcionarem  
paz na alma e felicidade na vida.*

*Ã minha avó Lina, ao meu namorado  
Marcelo, a minha tia Regina, prima  
Luciana e a minha boadrasta Eliane  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Chukichi Kurozawa pela orientação na realização deste trabalho, pelos ensinamentos e pela paciência;
- À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos;
- À Prof. Dr<sup>a</sup> Eiko-Kuramae-Izooka pela co-orientação na caracterização molecular;
- À Prof. Dr<sup>a</sup> Rita Rodela e ao Prof. Dr. Edson Furtado pela orientação na análise estatística por ocasião da elaboração do projeto de pesquisa;
- Ao Prof. Dr. Norberto Silva, pela versão do resumo para o inglês;
- Aos meus amigos, que compartilham das minhas aventuras (mesmo que em pensamentos);
- À grande amiga Janaína Marque, companheira de curso de pós graduação, pela amizade, pela disposição, pelos ensinamentos e pelas discussões que realizamos sobre a experimentação agrônômica, que foram fundamentais na condução deste trabalho e na minha formação profissional;
- Aos professores e Funcionários do Departamento de Produção Vegetal, pelos ensinamentos, apoio e colaboração;
- Às companheiras de república Carolina Queiroz, Liziane Gomes, Suzan Pantaroto e Patrícia Carnieto;
- Aos colegas de pós-graduandos do curso de Proteção de Plantas;
- Aos amigos Daniela Caldeira, Rosana Sambugaro, Anielo Cutulo, Viviane Biazon, Alexandre Buzeto, Gustavo Theodoro, Maurício Meyer, Sergio Hanai, Adriana Jadão, Cristane Aparecido, Camilo Rodrigues; Michele Queiróz, César Bueno;
- À Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, pela formação e oportunidades concedidas;

- Aos funcionários da Biblioteca Faculdade de Ciências Agrônômicas, pela gentileza e disposição;
- Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, pela gentileza e disposição;
- A Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, pelo apoio e compreensão na conclusão deste trabalho:  
Rosemary Rodrigues, Sérgio Paiva, Roberto de Castro e Karin Ditrich;
- À comunidade universitária deste campus (FCA/Câmpus Lageado/ UNESP), pela convivência agradável durante esses anos;
- A todos que direta e indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

**O MEU MUITO OBRIGADO.**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
4.1 O patógeno e a doença.....	6
4.2 Etiologia da <i>Cercospora coffeicola</i> .....	8
4.3 Esporulação do fungo.....	9
4.4 Patogenicidade.....	15
4.5 Controle químico .....	17
4.5.1. Estrobilurinas.....	18
4.5.2. Triazóis.....	21
4.5.3. Benzimidazóis.....	24
4.6. Caracterização molecular.....	27
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
5.1 Estabelecimento da coleção de isolados de <i>C. coffeicola</i> cafeeiro e manutenção de culturas.....	34
5.1.1. Coleção de isolados.....	34

5.1.2. Isolamento a partir de tecidos vegetais infectados.....	36
5.1.3. Preservação dos isolados.....	36
5.2 Caracterização morfológica.....	37
5.2.1. Produção dos conídios.....	37
5.2.2. Mensuração de conídios dos isolados de <i>C. coffeicola</i> .....	39
5.3. Efeitos de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação.....	40
5.4. Teste de patogenicidade.....	42
5.4.1. Obtenção das mudas .....	42
5.4.2. Obtenção do inóculo.....	43
5.4.3. Inoculação.....	44
5.4.4. Avaliação.....	44
5.5. Caracterização dos isolados de <i>C. coffeicola</i> por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	47
5.5.1. Obtenção do inóculo.....	47
5.5.2. Extração do DNA total.....	48
5.5.3. Reações de RAPD.....	49
5.5.4. Avaliação.....	50
5.6. Sensibilidade “in vitro” de <i>C. coffeicola</i> a diferentes fungicidas.....	51
5.6.1. Obtenção dos discos de micélio.....	53
5.6.2. Preparo do meio de cultura com fungicidas.....	53
5.6.3. Avaliação.....	53
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
6.1 Caracterização morfológica.....	55



6.2 Meios de cultura para a esporulação do fungo.....	61
6.3 Teste de patogenicidade.....	67
6.4 Caracterização dos isolados de <i>C. coffeicola</i> por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	73
6.5 Sensibilidade “in vitro” de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> a oito fungicidas (Primeiro experimento.....)	78
6.6 Sensibilidade “in vitro” de dez isolados de <i>C. coffeicola</i> a sete fungicidas (Segundo experimento.....)	88
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
7.1 Caracterização morfológica.....	97
7.2 Caracterização fisiológica.....	98
7.3 Caracterização patogênica.....	100
7.4 Caracterização molecular.....	101
7.5 Sensibilidade “in vitro” de <i>C. coffeicola</i> a diferentes fungicidas.....	101
7.6 Considerações gerais.....	105
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>108</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro</b>	<b>Página</b>
1. Relação de isolados de <i>C. coffeicola</i> , com respectivos municípios e datas de isolamentos, mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP/Botucatu - S.P.....	35
2. Relação de isolados de <i>C. coffeicola</i> , com respectivos municípios e datas dos isolamentos, coletados nas regiões produtoras da cultura no Estado de São Paulo	37
3. Isolados de <i>C. coffeicola</i> , provenientes de diversos municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, para a caracterização morfológico.....	38
4. Isolados de <i>C. coffeicola</i> e sua procedência para estudo de crescimento micelial e esporulação em quatro meios de cultura.....	40
5. Adaptação da escala diagramática da porcentagem de área foliar lesionada por <i>C. coffeicola</i> para notas.....	45
6. Isolados de <i>C. coffeicola</i> , provenientes de vários municípios dos Estados de São Paulo e de Minas Gerais, para a caracterização molecular.....	47
7. Seqüência dos “primers” usados em reações de RAPD para determinar a similaridade genética entre os isolados de <i>C. coffeicola</i> .....	50
8. Nome comercial, princípio ativo, formulação e grupo químico dos fungicidas utilizados nos testes de sensibilidade “in vitro” dos isolados de <i>C. coffeicola</i> .....	51
9. Isolados de <i>C. coffeicola</i> caracterizados quanto a sensibilidade aos fungicidas (Primeiro experimento).....	52

10. Isolados de <i>C. coffeicola</i> caracterizados quanto a sensibilidade aos fungicidas (Segundo experimento).....	52
11. Fungicidas e suas concentrações utilizadas nos testes de sensibilidade “in vitro” dos isolados de <i>C. coffeicola</i> (Segundo experimento).....	53
12. Resultados médios obtidos na mensuração dos conídios de 21 isolados de <i>C. coffeicola</i> .....	57
13. Correlações entre as variáveis originais referentes à avaliação para o comprimento, largura e número de septos de 21 isolados de <i>C. coffeicola</i> aos dois componentes principais, $Y_1$ e $Y_2$ , a ordenação (ord.) das variáveis quanto ao seu poder discriminatório e porcentagem de informação retida e acumulada em $Y_1$ e $Y_2$ .....	59
14. Produção média de conídios por onze isolados de <i>C. coffeicola</i> , avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias), em quatro meios de cultura.....	62
15. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de <i>C. coffeicola</i> , avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) no meio de V-8.....	63
16. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de <i>C. coffeicola</i> , avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) do meio de cenoura (CDA).....	64
17. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de <i>C. coffeicola</i> , avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) do meio de pó de café (EPCA) .....	64
18. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de <i>C. coffeicola</i> , avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) do meio de extrato de folhas de café-ágar (EFCA).	65
19. Severidade média de infecção de 49 isolados de <i>C. coffeicola</i> , em cinco épocas de avaliação.....	70

20. Correlações entre as variáveis originais das avaliações da patogenicidade dos 49 isolados de <i>C. coffeicola</i> aos dois componentes principais $Y_1$ e $Y_2$ , a ordenação (ord.) das variáveis quanto ao seu poder discriminatório e porcentagem de informação retida e acumulada em $Y_1$ e $Y_2$ .....	71
21. Concentrações de DNA e suas respectivas razões obtidas no aparelho GenQuant	73
22. Matriz gerada pelo programa NTSYS 1.5 referente ao RAPD dos isolados de <i>Cercospora coffeicola</i> .....	78
23. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de propiconazole e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	80
24. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de oxicloreto de cobre e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	81
25. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de benomyl e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	82
26. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de chlorothalonil e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	83
27. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de azoxyatrobina e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	84

28. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100(g/mL de chlorothalonil e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	85
29. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100(g/mL de methalaxyl-mancozeb e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	87
30. Crescimento micelial de sete isolados de <i>C. coffeicola</i> , em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100(g/mL de tebuconazole e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).....	86
31. Efeito do propiconazole nas concentrações de 0, 10 e 100 (g/mL, em dez isolados de <i>C. coffeicola</i> , em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias).....	90
32. Efeito do oxicloreto de cobre nas concentrações de 0, 100, 1000, 1500 (g/mL, em dez isolados de <i>C. coffeicola</i> , em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias)...	91
33. Efeito do benomyl nas concentrações de 0, 1, 100 (g/mL, em dez isolados de <i>C. coffeicola</i> , em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias).....	92
34. Efeito do chlorothalonil nas concentrações de 0, 10, e 100 (g/mL, em dez isolados de <i>C. coffeicola</i> , em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias).....	93
35. Efeito do azoxystrobin nas concentrações de 0, 10, e 100 (g/mL, em dez isolados de <i>C. coffeicola</i> , em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias).....	94
36. Efeito do methalaxyl+mancozeb nas concentrações de 0, 10, e 100 (g/mL, em dez isolados de <i>C. coffeicola</i> , em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias).....	95
37. Efeito do tebuconazole nas concentrações de 0, 10, e 100 (g/mL, em dez isolados de <i>C. coffeicola</i> , em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias).....	96

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
1 Área foliar lesionada em 6%, 12%, 18%, 25% e 50% por <i>C. coffeicola</i> em folhas com área total de 20cm <sup>2</sup> (Fernandes, 1988).....	45
2. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento das mensurações dos conídios de isolados de <i>C. coffeicola</i> , utilizando-se a Distância Média Euclidiana	60
3 Dispersão gráfica dos 21 isolados de <i>C. coffeicola</i> , caracterizados quanto ao fator morfológico, utilizando-se os dois componentes principais (Y <sub>1</sub> e Y <sub>2</sub> ).....	61
4 Correlação entre o crescimento da colônia e a quantidade de conídios (x10 <sup>4</sup> conídios/mL) de onze isolados de <i>C. coffeicola</i> nos meios de cultura: Pó de café (1), Folha de café (2), meio de cenoura (3) e meio de V-8 (4).....	66
5 Folhas de café inoculadas com <i>C. coffeicola</i> e apresentando sintomas após 33 dias de inoculação (4 <sup>a</sup> avaliação).....	69
6 Dispersão gráfica dos 49 isolados de <i>C. coffeicola</i> , caracterizados quanto à patogenicidade, utilizando-se os dois componentes principais (Y <sub>1</sub> e Y <sub>2</sub> ).....	71
7 Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das similaridades obtidas pelos isolados de <i>C. coffeicola</i> avaliados na caracterização patogênica.....	72
8. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com “primers” G-P, em análise dos isolados de <i>C. coffeicola</i> .....	75
9. Padrão gerado pelo polimorfismo das bandas de DNA amplificado ao acaso com Primer OPG-04, entre os isolados de <i>C. coffeicola</i> .....	76

10. Padrão gerado pelo polimorfismo das bandas de DNA amplificado ao acaso com  
Primer OPG-13, entre os isolados de *C. coffeicola*..... 77

## 1 RESUMO

A cercosporiose do cafeeiro, causada por *Cercospora coffeicola* Berk e Cooke, é uma doença importante porque prejudica o desenvolvimento do cafeeiro, principalmente em condições de viveiro, pela intensa desfolha, raquitismo e atraso no crescimento. Em 1998, notou-se, em uma propriedade em Santa Juliana, Minas Gerais, intensa desfolha de plantas no campo e presença de manchas grandes e típicas daquelas causadas por *Cercospora*, e os exames das lesões mostraram conídios longos, mais finos na sua espessura, hialinos e multiseptados, sendo a morfologia dos conídios diferente da verificada no material provenientes de Paracatu, Monte Carmelo e Santa Juliana, cidades situadas em Minas Gerais, em 1986. Essas diferenças apresentadas na morfologia dos conídios foram atribuídas a hipóteses, como a influência do ambiente, em função da época do ano ou a existência de mais de um gênero do fungo provocando sintomas semelhantes nas folhas dos cafeeiros. Os estudos realizados para caracterizar os isolados de *Cercospora* do cafeeiro, coletados em diversos municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais, através da patogenicidade, morfologia dos conídios, fisiologia, técnicas moleculares e sensibilidade a fungicidas, indicaram a inexistência de correlação entre esses parâmetros.



Na caracterização morfológica dos conídios, foram detectados três grupos de isolados, resultantes da associação, individual, das dimensões maiores, intermediárias e menores do comprimento, largura e número de septo dos conídios.

No tocante da caracterização fisiológica, não foi constatada correlação entre o crescimento micelial dos isolados e a produção de conídios nos meios de cultura de V-8, extrato de pó de café, extrato de folha de café, e de cenoura. O meio de V-8 proporcionou maior esporulação do fungo.

Nos testes “in vitro”, verificou-se que a concentração mínima inibitória diferiu, em função dos produtos testados (azoxystrobin, benomyl, chlorothalonil, tebuconazole, propiconazole, oxicloreto de cobre e methalaxyl-mancozeb) e dos isolados do fungo.

MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY, PATHOGENICITY, AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SENSIBILITY TO FUNGICIDE OF *Cercospora coffeicola*. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ANA PAULA ZIMBARDI LOMBARDI

Adviser: CHUKICHI KUROZAWA

## 2 SUMMARY

*Cercospora coffeicola* Beerck e Cooke is a fungus which causes an important disease on coffee trees resulting on leaves shedding and slowing plant development. In 1998, one isolate was selected in Santa Juliana, Minas Gerais State, Brazil, wich have longer and narrow spores when compared isolates collected in Paracatú, Monte Carmelo and Santa Juliana counties, in 1986.

Studies were made to characterize and compare different isolates by pathogenicity test, conidia morphology, growth physiology, molecules characteristics and fungicides sensibility.

By conidia morphology three groups of isolates were characterized differing by conidia length, width and number of septa. Physiological characterization showed no correlation between mycelium growth on different media e conidia production. The best sporulation was observed when the fungus was growed on V-8 medium.

By "in vitro" test it was showed that minimum inhibitory concentration for fungus growing in the presence of fungicides (azoxystrobin, benomyl, chlorothalonil, tebuconazole, propiconazole, oxicloreto de cobre e methalaxy-mancozeb) varied as a function of isolates.

Key words: *Cercospora coffeicola*, coffee, characterization

### 3 INTRODUÇÃO

A cercosporiose do cafeeiro, causada por *Cercospora coffeicola* Berk e Cooke, é uma doença amplamente disseminada nas Américas e relatada, pela primeira vez, no Brasil, em 1887 (Godoy et al.,1997). Trata-se de uma doença importante porque prejudica o desenvolvimento do cafeeiro, principalmente em condições de viveiro, pela intensa desfolha, raquitismo e atraso no crescimento. Em plantas adultas, ela pode provocar intensa desfolha com redução da produtividade e na qualidade da sua bebida (Fernández-Borrero et al.,1982). Esses danos são acentuados principalmente se a cultura for conduzida em condições ambientais de baixa temperatura, alta umidade, ventos frios e em solos com deficiência de nitrogênio.

Em 1996, constatou-se alta incidência de cercosporiose nos cafezais dos municípios de Paracatu, Monte Carmelo e Santa Juliana, no estado de Minas Gerais. As folhas, coletadas nessas regiões, apresentavam sintomas típicos de cercosporiose, mas os conídios presentes não eram típicos de *Cercospora*. Isto porque, invés de conídios longos, hialinos e multiseptados, os conídios eram curtos, mais largos e com menor número de septos, além de não serem hialinos (Chukichi Kurozawa, informação pessoal).

Em 1998, notou-se, em uma propriedade em Santa Juliana, Minas Gerais, intensa desfolha de plantas com alguns meses no campo e presença de manchas grandes e típicas daquelas causadas por *Cercospora*. As mudas foram introduzidas do estado de São Paulo. Os exames em laboratório mostraram conídios longos, mais finos na sua espessura, hialinos e multiseptados. Portanto, a morfologia dos conídios era diferente daquela verificada no material provenientes de Paracatu, Monte Carmelo e Santa Juliana, cidades situadas em Minas Gerais, em 1986. Essas diferenças apresentadas na morfologia dos conídios foram atribuídas a uma das duas hipóteses:

1. O ambiente, em função da época do ano, estaria interferindo na morfologia dos conídios.
2. As diferenças na morfologia e na coloração dos conídios seriam de gêneros de fungo diferentes, os quais causariam sintomas semelhantes nas folhas dos cafeeiros.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados de *Cercospora* do cafeeiro coletados em diversos municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais, através da patogenicidade, morfologia, fisiologia, técnicas moleculares e sensibilidade a fungicidas.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. O patógeno e a doença

A cercosporiose, também conhecida como olho pardo, mancha circular, olho de pombo, mancha de hierro, chasparria, mancha del fruto del café e brown eye spot, é uma das doenças mais antigas descritas na América e foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1887. O seu agente causal é o fungo *Cercospora coffeicola* Berk e Cooke. Os sintomas necróticos nas folhas são mais ou menos circulares, com diâmetro compreendido entre 0,5 - 1,5 cm, de coloração pardo-clara com centro branco-acinzentado e circundadas por um halo amarelo. No centro das lesões, geralmente aparecem pequenas pontuações pretas que constituem estruturas de frutificação do fungo.

Atualmente, esta doença está presente de forma endêmica em quase todos os cafezais das regiões de alta umidade, baixa temperatura, excesso de umidade no solo, ventos frios, insolação intensa, solos de baixa fertilidade, solos arenosos, que são as condições que favorecem a esporulação do fungo. Entretanto, a severidade da infecção é condicionada também a baixas condições nutricionais do cafeeiro, principalmente de nitrogênio (Fernández-Borrero et al., 1982; Godoy et al., 1997) e em locais onde há intensa aplicação de inseticida-

fungicida sistêmico, via solo, para o controle do bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella* Guérin-Menévillé) e da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk e Br.).

Zambolin et al. (1999) citam que, em 1971, ocorreu uma perda de produção de 30% no Estado do Espírito Santo, devido a ocorrência de cercosporiose. Esse fato comprova que, dependendo da região e da condução da lavoura, a doença pode causar considerável prejuízo. Isto porque apenas uma única lesão na folha é suficiente para causar a sua queda, principalmente se a lesão estiver próxima à sua nervura central (Zambolin et al., 1999).

Segundo Godoy et al. (1997), a cercosporiose do cafeeiro é economicamente importante, porque provoca a desfolha prematura, queda de produção e prejudica a qualidade da bebida. Nos frutos, as lesões surgem quando ainda são pequenos e o ataque aumenta após a granação. As lesões permanecem até o amadurecimento dos frutos. O ataque é maior nas partes mais expostas à insolação, em forma de manchas castanhas, deprimidas, que se alongam no sentido das extremidades. A medida que as manchas envelhecem, elas assumem um aspecto ressecado e escuro, promovendo a aderência do pergaminho à polpa, e pode causar o chochamento do grão, que dificulta o beneficiamento ou mesmo a sua queda antes da colheita. Em condições de viveiro, as mudas sofrem intensa desfolha, atraso no crescimento e raquitismo por causa da doença, principalmente em condições de excesso de exposição solar, substrato desequilibrado em relação aos nutrientes e substrato compactado (Zambolin et al., 1999). A desfolha ocorre pela grande produção de etileno no processo de necrose.

#### 4.2. Etiologia da doença da *Cercospora coffeicola*

*C. coffeicola* é um fungo mitospórico, que é uma classificação artificial, pertence à “classeforma” Hyphomycetes, “ordemforma” Moniliales e “famíliaforma” Dematiaceae (Agrios, 1998; Barnett e Hunter, 1998). O fungo forma estruturas denominadas esporodóquios, que consistem de agregações de conidióforos mais curtos produzidos numa superfície estromática, com formação de conídios nas extremidades. Estas estruturas possuem coloração escura e são formados no centro das lesões, onde os conidióforos septados e cilíndricos em fascículo mais ou menos compactos. Conidiosporos (simpodulosporos) longos, septados, coloração hialina e escura, obclavados ou cilíndricos, retos ou curvos, os quais ao serem destacados deixam cicatrizes nos conidiosporos (Barnett e Hunter, 1998). O fungo produz conídios hialinos, multiseptados, com 100-270 $\mu$  de comprimento por 3-4 $\mu$  de diâmetro, afinando-se para a extremidade distal (Godoy et al., 1997). Segundo Fernández-Borrero et al. (1982), a cor do micélio cultivado “in vitro” pode variar de preto-esverdeada, no início do seu desenvolvimento, a branca-leitosa ou parda-escura no final. No centro da colônia, a coloração é gradativamente clareada pela formação de um aglomerado de conidióforos com conídios e a colônia promove um avermelhamento do meio de cultura de BDA no fundo da placa de Petri.

Segundo Mitov (1971), as colônias possuem coloração pardo-escura e gradualmente o centro clareia-se e forma um aglomerado de conídios e conidióforos. O autor descreve que os conídios de *C. coffeicola* são hialinos, septados, com 20-95 x 3,5-5,5  $\mu$  de comprimento x largura, respectivamente, aderidos aos conidióforos septados, pardo-clara, formato arredondado e com 25-95  $\mu$  de comprimento. Mitov constatou, em alguns países, grandes diferenças entre as medidas, das manchas, dos conidióforos e conídios. Na Índia, os

conídios variavam de 40-60 x 3,5-4  $\mu$ , contendo de 2 a 3 septos; nas Antilhas, de 70-130 x 5-7 $\mu$  e na Guatemala, as manchas eram pequenas com diâmetros de 2 a 3 mm, conídios de 75 x 3  $\mu$  e conidióforos bastante compridos de 100 - 300  $\mu$ . Na variedade *Coffea arabica typica*, assim como na variedade Caturra, Mitov (1971) observou manchas com diâmetro de 1,5 - 2,0 cm com um centro branco em forma de ponto que as diferencia das manchas causadas por *C. coffeicola typica*. Os conídios produzidos nestas manchas eram maiores e variavam de 26,5 - 235,5 x 4,5 - 6,5  $\mu$ , alguns alcançavam o comprimento de até 370  $\mu$ , contendo mais de 20 septos transversais. Em algumas ocasiões, os conídios estavam bastante curvados enquanto que a base da primeira célula era quase reta. Os conidióforos tinham a mesma cor que os de *C. coffeicola typica*, mas eram menos curvados, embora na maioria dos casos fosse quase reto, com a célula apical ligeiramente arredondada. O autor concluiu recomendando que essas características apresentadas pelo fungo merecem um estudo mais aprofundado para determinar se há alguma correlação da infecção por ascosporos ou por alguma forma especial do patógeno.

### 4.3. Esporulação do fungo

Em geral, as espécies de *Cercospora* caracterizam-se pelo crescimento lento e por raramente ou nunca esporularem em meio de cultura (Nagel, 1934). Esses fatores dificultam a sua classificação, biologia, estudos genéticos, citológicos, bem como a identificação da espécie, inoculações cruzadas e trabalhos de detecção de resistência das plantas a estes patógenos.

A composição do meio de cultura influencia o crescimento, a morfologia da colônia e a esporulação da *Cercospora* spp. (Queiroz e Menezes, 1993). Vários trabalhos mostram que os meios de culturas naturais, como decoctos e sucos feitos de folhas ou



partes do tecido do hospedeiro são mais favoráveis à esporulação de espécies de *Cercospora* (Diachun e Valleu, 1941; Kilpatrick e Johnson, 1956; Murakishi et al., 1960; Berger e Hanson, 1963; Stavely e Nimmo, 1968; Chen et al., 1979; Silva et al., 1988). O fato de um substrato ser considerado adequado para o crescimento micelial de um fungo e nem sempre bom para a sua esporulação, foi evidenciado em outros fitopatógenos (Lilly e Barnett, 1951; Hawker, 1950, 1957; Cochrane, 1958; Griffin, 1994). Geralmente, a produção de conídios ocorre quando há uma exaustão do meio de cultura, resultante da utilização dos nutrientes pelo fungo, durante a fase de crescimento vegetativo (Rosa e Menezes, 2001). Associadas a este processo podem ocorrer alterações na composição do meio pelos metabólitos secundários liberados pelo fungo (Rosa e Menezes, 2001). Segundo Hawker (1957), a mudança no crescimento vegetativo, para a esporulação, depende principalmente do grau de maturidade do micélio, acelerado ou inibido pelas condições de cultivo. De acordo com Griffin (1993), a esporulação é um processo de diferenciação mais específico, no qual as células reprodutivas estão envolvidas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

Segundo Fernández-Borrero et al. (1982), *C. coffeicola* é facilmente isolado em meio de cultura, como ocorre com a maioria das espécies do gênero *Cercospora*, mas é difícil a sua esporulação “in vitro”. Hawker (1966), citado por Buitrago-Jaramillo e Fernández-Borrero (1982), verificou a existência de interações entre substrato, temperatura, regime de luz e pH, assim como a radiação ultravioleta, que condicionam a produção de conídios por *Cercospora* spp, nos meios de cultura.

Segundo dados da literatura, o crescimento de *Cercospora* é favorecido em meio de cultura a base de malte, cenoura e suas folhas ou mesmo suco de vegetais. Mas, em

condições de câmara de crescimento, em meio de cultura, o fungo se desenvolve melhor com o aumento de horas de luz diária, onde a esporulação é mais abundante.

Echedi (1959), segundo Del Peloso et al. (1988), com o objetivo de encontrar um meio de cultura que promova uma boa esporulação da *C. coffeicola*, testou vários deles, compostos de diferentes partes vegetais do cafeeiro e de outras plantas, e observou maior esporulação do fungo no meio de folha de cenoura-ágar a 24°C, em quatro dias, onde o regime de luz não afetou a esporulação do fungo.

Buitrago-Jaramillo e Fernández-Borrero (1982) citam trabalhos de Castaño (1956) e Siddigi (1970). O primeiro autor conseguiu boa esporulação de *C. coffeicola* em BDA não acidificado, previamente umedecido, e incubado a 24°C, enquanto que o segundo não conseguiu obter a esporulação do fungo em BDA.

Del Peloso et al. (1989), estudando o efeito de diferentes meios de cultura na esporulação de *C. coffeicola*, concluíram que o regime de iluminação e o meio de cultura são importantes na esporulação. O regime de iluminação contínua foi mais indicado para induzir a esporulação. Entre os meios de cultura testados, o melhor meio foi o suco de vegetais + Panvit M, nos regimes de iluminação contínua ou alternada (9 horas de luz, alternada com 15 horas de escuro). A maior esporulação foi constatada na avaliação aos 7 dias de incubação e uma substancial redução na avaliação realizada aos 14 dias. Os autores verificaram baixa correlação e negativa entre esporulação e diâmetro das colônias.

Del Peloso et al. (1989) constataram ainda que a adição do Panvit-M proporcionou maior esporulação de *C. coffeicola*, pelo suprimento de sais minerais, aminoácidos e vitaminas. Esses pesquisadores admitem que o Panvit-M (formulação em

drágeas), aparentemente, foi superior à líquida quanto ao fornecimento de vitamina C, fosfato di-básico de cálcio, sulfato ferroso e iodeto de potássio.

Buitrago-Jaramillo e Fernández-Borrero (1982) obtiveram máxima esporulação no meio de FCA (folhas de café-ágar), exposto a 9 horas de luz e 15 horas de escuro. Os resultados obtidos em diversos experimentos sugerem que a luz é essencial para a síntese de substâncias que induzem atividades esporogênicas durante os primeiros oito dias de incubação. Segundo Hawker (1966), citado por Buitrago-Jaramillo e Fernández-Borrero (1982), a esporulação obtida pelas diferentes seqüências de luz e escuro pode ser resultado de uma modificação da capacidade de esporulação do fungo em resposta a uma troca na capacidade de sintetizar algumas enzimas necessárias.

Nagel (1934) obteve esporulação abundante de *C. beticola* em meio de folhas de beterraba-ágar, enquanto que, em batata-dextrose-ágar, houve maior crescimento da colônia e pequena produção de conídios. Kilpatrick e Johnson (1956), trabalhando com várias espécies de *Cercospora*, obtiveram esporulação em abundância em meio de decocto de folhas de cenoura-ágar: *C. canescens*, *C. brachiata*, *C. penniseti*, *C. zebrina* e moderada esporulação da *C. capsici*, *C. kikuchi* e *C. sorghi*. Murakishi et al. (1960) verificaram abundante esporulação de *C. apii* no meio de decocto de folhas de cenoura-ágar e obtiveram duas a três coletas e produções sucessivas de conídios.

Queiroz e Menezes (1993), Chen et al. (1979) e Cooperman e Jenkis (1986) comprovaram que o meio de V-8 é o melhor para a esporulação de várias espécies do gênero *Cercospora*, tanto na presença como na ausência de luz. Queiroz e Menezes (1993) conseguiram a maior esporulação de *C. nicotianae* no meio de V-8, em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Stavely e Nimmo (1968) verificaram a esporulação de *C. nicotianae* em meio semi-seletivo contendo DL-Leucina, sacarose, extrato de leveduras, nutrientes minerais e ágar em meio de suco de V-8.

Smith (1971) constatou esporulação em abundância de *C. arachidicola* em meio de extrato de aveia ágar, embora este meio diferisse, quanto ao modo de preparo e quanto as quantidades de folhas de amendoim e de farinha de aveia, do meio utilizado por Abdou (1966).

Veiga (1973) conseguiu melhor esporulação de *C. sojina* nos meios de suco de V-8-ágar e farinha de aveia-ágar, que em batata-dextrose-ágar e decocto de folhas de cenoura-ágar, apesar de ter verificado que este fungo, diferentemente de outras espécies de *Cercospora*, esporulava facilmente em meio de cultura.

Loch et al. (1975) verificaram grande viabilidade quanto a esporulação de *C. capsici* nos meios de extrato de folhas de pimentão-ágar, semi-sintético de Stavely e Nimmo e suco V-8-ágar.

Castro e Coêlho (2000) obtiveram melhor esporulação da *C. cruenta* em meio de cenoura-dextrose-ágar, o que demonstra que este fungo possui habilidade em utilizá-lo assimilando as substâncias encontradas, suprindo as exigências metabólicas para o desenvolvimento em meio artificial. Estes autores verificaram também que a produção dos conídios começou no 5º dia, ocorrendo o pico de esporulação no 8º dia de incubação sob regime de luz contínua. Com o declínio da esporulação após certo período de incubação do fungo, houve a tendência destes meios propiciarem a formação de hifas estéreis (Lilly e Barnett, 1951) o que prejudicou os resultados para a esporulação do fungo.

A esporulação em espécies de *Cercospora* tem sido correlacionada com a técnica de plaqueamento do fungo em meios de cultura. Nagel e Dietz (1932), trabalhando com quatro espécies do fungo, verificaram que a esporulação ocorria somente quando as cepas eram recentemente isoladas. Nagel (1934) concluiu que, em geral, por transferência de micélio o fungo produzia somente hifas estéreis em meio de cultura, enquanto que, por transferência de esporos, produzia colônias esporulantes. Goode e Brown (1970) verificaram que o uso de conídios de *C. citrullina* para o isolamento era importante para encontrar isolados com a combinação de caracteres genéticos desejados e com boa esporulação.

O período de esporulação também constitui uma importante informação e varia de acordo com a espécie em estudo. *C. manihotae* Chupp (1953) apresenta maior esporulação entre o 3º e o 8º dia de incubação, *C. henningsii*, entre o 3º e o 7º dia e *C. caribaea*, atingiu o ápice de esporulação no 6º dia (Ribeiro et al., 1997).

Além do meio de cultura utilizado, a luz tem mostrado grande influência sobre a quantidade de esporos produzidos em meio de cultura por muitos fungos (Moraes, 1977). Barnett e Lilly (1950) constataram que um isolado de *Choanephora cucurbitarum* requeria tanto luz, como escuro para a formação de conídios. Os autores sugeriram que a luz ou ausência afetava duas reações metabólicas ou grupos de reações, que são essenciais para a formação de conídios deste fungo. A luz, aparentemente inibe a reação B, que é essencial para a reação A, que deve ocorrer no escuro ou com a luz de baixa intensidade. A reação na luz deve ser seguida pela reação no escuro para a formação dos conídios.

Kilpatrick e Johnson (1956), trabalhando com várias espécies de *Cercospora*, com particular atenção a *C. kikuchii*, verificaram que a esporulação foi maior nas culturas expostas à luz, mas que o escuro não suprimiu completamente a esporulação. Berger e

Hanson (1963) também conseguiram maior esporulação de *C. zebrina* nos isolados mantidos sob luz contínua.

Stavely e Nimmo (1969) verificaram que a esporulação de *C. nicotianae*, em meio de suco V-8-ágar, foi aumentada pela exposição constante à luz fluorescente (lâmpada de 15 watts colocadas a 24 cm acima da superfície do meio de cultura).

Smith (1971) utilizou o regime de luz contínua, proporcionada por duas lâmpadas fluorescentes de 15 watts cada, a 31 cm do nível das culturas, durante quatorze dias de incubação a 28°C, e obteve abundante esporulação de *C. arachidicola* em meio de extrato de folhas de amendoim-aveia-ágar.

Loch et al. (1975) verificaram em *C. capsici* um maior estímulo para esporulação em meio de cultura de extrato de folhas de pimentão-ágar, a 20°C, e sob regime de doze horas de luz, alternadas com doze horas de escuro, em câmaras incubadoras providas de seis lâmpadas fluorescentes de 15 watts cada, localizadas a 10 cm de distância do meio de cultura.

#### **4.4. Patogenicidade**

Segundo Castanõ (1956), citado por Fernández-Borrero et al. (1982), *C. coffeicola* penetra nas folhas através dos estômatos e as hifas colonizam o tecido inter e intracelularmente. Zambolin et al., (1999) descreve que os conídios deste fungo são formados principalmente à noite e em dias frios e nublados, sendo disseminados pelo vento e pela água. Se houver umidade relativa suficiente, os conídios germinam e emitem tubo germinativo que penetra através das aberturas naturais nas faces inferior e superior das folhas do cafeeiro. As células ao redor do local onde houve a penetração do patógeno sofrem inicialmente uma

plasmólise, que as tornam translúcidas e delimitadas apenas pelas paredes celulares, razão pela qual aparece o tecido central da lesão descorado.

As condições de temperatura mais baixa associadas a alta umidade após a inoculação assumem importância relevante no desenvolvimento da cercosporiose (Bitancourt, 1958; Galli e Carvalho, 1980; Instituto Brasileiro de Café, 1985).

Segundo Welman e Quesada (1951) e Echedi (1959), os esporos de *C. coffeicola* requerem um filme de água livre para germinar e temperatura de 24 a 30°C, para o crescimento e germinação. Casela e Bracão (1981) inocularam *C. sojina* em plantas de soja e mantiveram sob alta umidade relativa, proporcionada por cobertura de plástico, por 48 horas ou até a avaliação final (Casela et al., 1981). A temperatura na casa de vegetação variou entre 20°C e 30°C. Nessas condições, eles obtiveram desenvolvimento da doença.

O efeito da luz sobre o desenvolvimento da doença, especialmente em condições naturais, é menos efetivo que o da temperatura e umidade, embora se saiba que a intensidade e/ou duração da luminosidade pode aumentar ou reduzir tanto a suscetibilidade das plantas à infecção como a severidade da doença (Agrios, 1988).

A intensidade da cercosporiose no cafeeiro é influenciada pelo sombreamento, sendo maior em plantios instalados em pleno sol (Echedi, 1959; Instituto Brasileiro do Café, 1985; Almeida, 1986). Quesada (s.d.), citado por Echedi (1959), constatou que cafeeiros inoculados e mantidos na sombra, por vários meses, não exibiram sintomas da doença, enquanto que as plantas expostas ao sol apresentaram grande quantidade de manchas causadas pelo patógeno. Uma das possibilidades levantadas pelo autor é que o patógeno penetrou na planta antes da sua exposição ao sol, mas não houve nenhuma comprovação. Echedi (1959) observou os mesmos resultados obtidos por Quesada, onde a penetração dos

fungos ocorreu através dos estômatos e, em maior frequência, nas plantas expostas ao sol. O autor considerou que as plantas expostas ao sol se umedecem e secam com mais facilidade que as expostas à sombra, favorecendo a penetração do fungo.

Quanto aos métodos de avaliação das espécies de *Cercospora* do teste de patogenicidade, há diversos sistemas, escalas e índices utilizados como: número de lesões por folha (Echedi, 1959; Calpouzos e Stallknecht, 1967; Judd e Peterson, 1974; Veiga e Kimati, 1976; Casela e Brancão, 1981; Cooperman e Jekins, 1986); proporção de plantas doentes (Miller, 1969); proporção de desfolha (Echedi, 1959) e índice de infecção – relação entre produto do número de lesões e o número de folhas doentes e o número total de folhas (Fernández-Borrero e López-Duque, 1971; Cadena-Gómez, 1982). Esses métodos embora sejam práticos e rápidos, em muitos casos, perdem a precisão por serem, na maioria, arbitrários (Fernández, 1988).

#### **4.5. Controle químico**

Galvéz (1979), ao testar a eficiência de quatro fungicidas para o controle da cercosporiose do cafeeiro aplicados a cada 21 dias, concluiu que os mais eficientes, em ordem decrescente, foram: Bayleton, Trimiltox Forte e Daconil. O Benlate não apresentou boa eficiência quando comparado com outros produtos testados. No entanto, Fernández –Borrero et al. (1982), ao testar diversos fungicidas, visando o controle químico da cercosporiose em mudas de cafeeiro em viveiro, concluíram que o Benlate apresentou desempenho superior em comparação aos demais, uma vez que reduziu a infecção e a desfolha em níveis significativos. Os ditiocarbamatos apresentaram também boa eficiência no controle da doença e não prejudicaram o desenvolvimento das mudas.



Mitov (1971) cita que, na Índia, tem-se notado danos nas plantas novas ao pulverizar com calda bordalesa e por isso recomenda sua aplicação somente nas plantas desenvolvidas.

Fernández-Borrero e López-Duque (1971), estudando o efeito da adubação e da aplicação de maneb no controle da cercosporiose do cefeeiro, concluíram que tanto o nitrogênio como o maneb diminuíram significativamente a incidência e a porcentagem de desfolha.

Pozza et al. (1997) testaram vários fungicidas em condições de viveiro, empregando mudas de café, para o controle do olho pardo, e concluíram que os melhores tratamentos foram chlorothalonil (1000g i.a./ha) e mancozeb + óleo mineral (1600 g i.a./ha+400ml/ha). Observaram-se ainda um efeito positivo na retenção de folhas, quando se aplicou o oxiclreto de cobre a 1500g i.a./ha, o que amenizou o problema da desfolha causada pela doença.

#### 4.5.1. Estrobilurinas

Na década de 60, descobriram-se as propriedades antibióticas de um grupo de fungos superiores, cogumelos comestíveis, pertencentes à sub-divisão *Basidiomycota*, classe *Basidiomycetes*, ordem *Agaricales* e família *Tricholomataceae*, possuindo 147 gêneros com 101 sinonímias e 2347 espécies, destacando-se duas de suas espécies devido a sua ação anti-fúngica: *Strobilurus tenacellus* (Pers.: Fr.) Sing e *Oudemansiella mucida* (Schad.: Fr.) Höhn. Eles sobrevivem nas florestas européias, competindo por nutrientes com os outros fungos e ao mesmo tempo inibiam a atuação destes competidores através de produção de substâncias anti-fúngicas (Lange et al., 1993).

Os compostos naturais que originaram o grupo de fungicidas denominado como estrobilurinas foram: estrobilurinas A e B extraído do fungo *Strobilurus tenacellus* (Pers.: Fr.) Sing e *Oudemansiella mucida* (Schad.: Fr.) Höhn, sendo que elas apresentam uma variada atividade biológica com potencial de uso completa contra leveduras, controlam o crescimento de algumas bactérias Gram positivas, inibem o crescimento de células humanas, de animais e uma ampla gama de fungos, incluindo: *Alternaria porri*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis cineria*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Epicocum purpurascens*, *Mucor miehei*, *Neurospora crassa*, *Penicillium islandicum*, *Penicillium notatum*, *Paecilomyces variotii*, *Phoma clematidina* e *Phytophthora infestans*. Os fungicidas do grupo das estrobilurinas atuam através da inibição da cadeia respiratória mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c<sub>1</sub> (Complexo III), sendo que esta inibição interfere na liberação de energia e consequentemente na formação do ATP (Anke, 1995; Fraire et al., 1995; Koeller, 1998; Leroux, 1996; Ypema e Gold, 1999).

As moléculas dos compostos pertencentes ao grupo das estrobilurinas, atuam preventivamente inibindo a germinação dos esporos dos fungos fitopatogênicos, apresentando ação curativa e erradicante e inibindo o desenvolvimento dos fungos nos estádios iniciais de pós-germinação, apresentando ainda atividade anti-esporulante. As moléculas são absorvidas pelas folhas de forma gradual e constante, promovendo proteção na superfície por tempo mais prolongado e difundindo-se pela folha, apresentando geralmente, uma distribuição uniforme. Com o aumento da umidade (orvalho, chuva, pulverização, etc.), a redistribuição superficial e absorção das moléculas são incrementadas. A estrobilurina apresenta também difusão translaminar, de célula a célula. Ou seja, quando esta molécula for

aplicada sobre a superfície da folha, após certo período esta apresentará uma certa proteção também na face oposta. Esta molécula mostra-se segura tanto no manuseio quanto na utilização, sendo rapidamente decomposta no ambiente e não provocando efeitos fitotóxicos.

A seletividade das estrobilurinas parece estar baseada não sobre as diferenças de sítios mitocondriais dos organismos alvos, mas sim sobre as diferenças estruturais de membranas celulares na penetração e degradação dos fungos, vegetais e animais. O ingrediente ativo atua em doses que não atingem as mitocôndrias em células de plantas ou animais, evitando riscos (Leroux, 1996; Miller, 1997).

A eficácia do fungicida CGA 279202 no controle de *Cercosporidium personatum*, *Puccinia arachidis* e *Cercospora arachidicola*, em amendoim, foi demonstrada por Margot et al.(1998) onde, na média de nove experimentos, o fungicida apresentou para *C. personatum* e *C. arachidicola* controle superior a 85% e para ferrugem (*P. arachidis*) um controle de 78%. O desempenho do azoxystrobim no controle do “Mal de Sigatoka” (*Mycosphaerella musicola*) na cultura da bananeira foi avaliado por Salgado (1998). O autor concluiu que com a utilização de adjuvantes, a doses de azoxystrobin mantiveram a doença em baixos níveis na cultura. Para o controle do patógeno *Mycosphaerella fijiensis*, Margot et al. (1998) relataram que ocorreu um excelente controle da doença.

Nas culturas de beterraba e cenoura, Garcia Junior (1998 a,b) relatou bom desempenho do produto, nas doses de 6 a 8g i.a./100 litros de água, no controle de *Cercospora beticola* e *Alternaria dauci*, respectivamente, e constatou ainda folhas verdes um efeito fitotônico por mais tempo.

O controle químico da cercosporiose do cafeeiro foi avaliado por Galli (1998), onde se utilizaram diferentes doses de azoxystrobin associadas a diferentes

concentrações de adjuvantes comparadas ao tratamento padrão da cultura com cobre. Resultados semelhantes aos de Galli (1998), no controle de cercosporiose, foram observados em outros experimentos comparativos de princípios ativos, para o controle de fungos, porém, no tratamento com estrubilurina, observou-se melhor controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), Phoma (*Phoma* sp.) e da mancha de Ascochyta (*Ascochyta* sp.), resultando um melhor enfolhamento das culturas com maturação e colheita mais uniforme. Avaliando a ação da chuva no desempenho do azoxystrobin para o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro, Töfoli (1998) demonstrou que a ocorrência de 30 mm de chuva a intervalos de 60 a 120 minutos após a pulverização interferiu pouco no desempenho do princípio ativo, mostrando sua maior persistência se comparado ao oxicloreto de cobre.

#### 4.5.2. Triazóis

Os triazóis são fungicidas orgânicos, em sua maioria de ação sistêmica de forma acropetal, sendo composto pela adição de radicais químicos diferentes a uma molécula básica de 1,2,4-triazol. São classificados quimicamente como: a) triazóis com radicais ceto: triadimefol; b) triazóis com radicais cetol: propiconazole e etaconazole; c) triazóis com radicais hidroxil: triadimenol, bitertanol e diclobutrazole; d) triazóis sem outros grupos funcionais: fluotrimazol (Kramer, 1986).

Com a evolução da agricultura nos últimos anos, esses produtos foram largamente utilizados e de real importância, pois possuem certa combinação de características positivas, como: redução do risco da perda de eficiência por promover a instabilidade dos fungos resistentes; elevada fungitoxicidade a grande número de patógenos causadores de doenças importantes para agricultura como: ferrugens, oídios, e manchas foliares

tanto em culturas olerícolas como em frutíferas e em cereais; possui efeito residual prolongado, possibilitando maior intervalo entre as aplicações, reduzindo o número de tratamentos e de doses; rápida penetração e translocação nos tecidos, evitando a lixiviação, permitindo boa distribuição pela planta e possui ação curativa sobre as infecções já iniciadas, possibilitando a sua utilização com base em níveis de controle pré-estabelecidos, evitando-se gastos com aplicações preventivas desnecessárias.

Quanto ao modo de ação, os fungicidas triazóis podem atuar como protetores ou como curativos. Como protetores, a ação tóxica é exercida sobre a germinação dos esporos, formação do tubo germinativo e no apressório. Mas, a inibição é apenas parcial, pois pode ocorrer a penetração do patógenos nos tecidos tratados. Com sua ação curativa, o desenvolvimento de haustórios e/ou crescimento micelial nos tecidos são inibidos pela presença do fungicida.

As células dos fungos, quando em contato com os fungicidas triazóis, acumulam esteróis como o 4,4-dimetil e o  $4\alpha$ -metil, ambos possuidores do radical  $14\alpha$ -metil, provocando a inativação do processo de demetilação do lanosterol, até compostos intermediários, precursores do ergosterol (Gadher et al., 1983). Este fato está associado à ocupação pelo fungicida dos sítios ativos destinados à ligação da enzima  $14\alpha$ -demetilase ao citocromo P-450, que é catalizador da reação de oxidação do  $14\alpha$ -metil até  $14\alpha$ -hidroximetil, sendo o primeiro passo no processo da demetilação (Buchanauer, 1987; Henry, 1987).

Com a deficiência do ergosterol e o acúmulo de compostos intermediários haverá a indução da formação de membranas alternativas e a desorganização da estrutura celular (Forcelini, 1988). A adição de ergosterol às células tratadas com o fungicida

não promoverá a reversão deste processo, pois as posições a ele destinadas são ocupadas por outros esteróis (Kato, 1986).

O processo de demetilação é considerada como caráter fungistático e obtida em concentrações ou em doses menores do fungicida. Quando utilizam-se doses elevadas, constata-se a ocorrência de danos diretamente na membrana, além de alterações morfológicas identificadas por inchamento de células, por vacuolização excessiva, septação incompleta, aparecimento de vesículas entre a membrana e a parede celular, além de formação de inclusões membranosas (Kato, 1986). Mas o principal efeito está relacionado à inibição de demetilação. Segundo Buchenauer (1978 e 1987), os fungicidas compreendidos dentro deste grupo químico não afetam significativamente a oxidação dos açúcares e a síntese de proteínas e dos ácidos nucléicos (DNA e RNA).

Atualmente, os fungicidas triazóis registrados para o uso no Brasil são triadimefon, triadimenol, bitertanol, propiconazole, tebuconazole, ciproconazole, flutriafol e triciclazole.

O propiconazole caracteriza-se pelo seu amplo espectro de ação, controlando eficientemente ferrugens, oídios e manchas foliares induzidas por fungos dos gêneros *Bipolaris*, *Cercospora*, *Drechslera*, *Rynchosporium* e *Stagonospora*. Este fungicida tem sido largamente utilizado nas culturas de trigo e cevada e o seu uso em fruteiras e olerícolas tem sido muito pesquisada, mostrando-se amplamente possível.

O tebuconazole age de modo similar ao propiconazole, que representa uma evolução no espectro de ação dos triazóis, por apresentar uma maior toxicidade em relação aos fungos imperfeitos. Este fato permitiu maior utilização em diferentes culturas como, cereais, olerícolas e ornamentais, não apenas para o controle de ferrugens e oídios, mas

principalmente ao controle das manchas foliares, causadas pelas espécies de *Alternaria* e *Cercospora*.

A utilização dos triazóis destina-se ao tratamento de sementes, a parte aérea e de raiz e dos fungos de solo para o controle de doenças de plantas.

Após o desenvolvimento de triazóis de amplo espectro de ação, como os propiconazole e o tebuconazole, a eficiência de controle foi ampliada às manchas foliares (helminthosporiose e septoriose) e as doenças de espigas como mancha da gluma e giberela (Forcelli, 1987). O controle das doenças também é eficaz nas doenças em fruteiras, pelos triazóis, como ferrugem em nectarina (Nogueira, 1991), cercosporiose em bananeira (Nogueira e Santos, 1992) e sarna da macieira (Brignani Neto et al., 1989).

A utilização desses fungicidas também se mostra eficaz na cultura do amendoim (Lopes et al., 1993), batata e feijão (Goulart, 1989) e em olerícolas, como alho (Costa e Ventura, 1989). Nesse sentido, os resultados experimentais têm demonstrado eficiência do difenoconazole (Dahmen e Staub, 1992) e do tebuconazole (Calvete et al., 1992), produtos com menor número de aplicações proporcionam ótimo controle de manchas causadas por *Alternaria*.

#### **4.5.3. Benzimidazóis**

Os principais benzimidazóis utilizados no controle de doenças de plantas são: bemonyl, carbendazim, tiabendazole; fungicidas tiofanatos: tiofanato, tiofanto metílico, NF-48 e fuberidazole.

O bemonyl é conhecido como metil-n-(1-butilcarbamoil)-2-benzimidazole carbamato. Possui atividade sistêmica, com função erradicante e protetora

contra grande espectro de doenças causadas por fungos nas mais variadas culturas, embora não possua ação acaricida, é ativo como ovicida de ácaros (Delp e Klöpping, 1968).

No Brasil, os fungicidas benzimidazóis têm seu emprego recomendado para a aplicação à parte aérea de diferentes culturas, no tratamento de sementes, em plantas ornamentais, em essências florestais, no tratamento de mudas, além de ser utilizado amplamente na pós colheita (Compêndio, 1993).

Os organismos vivos possuem alta capacidade de se adaptarem às condições do meio ambiente. Esta adaptabilidade dos seres vivos pode ocorrer devido as condições do ambiente, promovido pelas mudanças provocadas pelo homem, no caso, pela utilização de defensivos agrícolas. Casos muito conhecidos são os de adaptabilidade das bactérias a antibióticos, dos insetos a inseticidas e de fungos a fungicidas (Dekker, 1977). O surgimento de alguns fungos resistentes a fungicidas, que inicialmente eram eficientes no controle de certas doenças, ultimamente está se tornando um problema preocupante (Delp, 1980).

A resistência ao benomyl no controle do oídio das curcubitáceas, causado pelo fungo *Sphaerotheca fuliginea*, foi constatada por Schroeder e Provibente, em 1969, decorrido apenas um ano da introdução do fungicida no mercado. Bollen e Scholten (1971) relataram a resistência do fungo *Botrytis cinerea* ao fungicida benomyl, na cultura do ciclame, em condições de casa de vegetação na Alemanha, onde foram isolados de plantas doentes uma raça tolerante a altas concentrações do produto. Estes autores reportam que observaram a ocorrência de resistência cruzada também aos fungicidas tiabendazole, fuberidazole e ao tiofanato metílico. Vargas Jr. (1973) constatou resultados semelhantes com o fungo *Erysiphe graminis*, isolado de *Poa proatensis*. Clark et al. (1974), ao analisar isolados de



*Cercospora arachidicola* e de *Cercosporidium personatum*, provenientes de campos de amendoim infectados, constataram a tolerância ao benomyl em doses dez vezes mais elevadas que as normais. Georgopoulos e Dovas (1973) relataram sobre a resistência ao benomyl pelo fungo *Cercospora beticola* em beterraba açucareira, na Grécia, durante 1970 e 1972. Entretanto, em 1972, a doença aumentou rapidamente e não foi controlada devido ao surgimento de resistência a benzimidazóis. Dovas et al.(1976) concluíram que a adaptabilidade das linhagens resistentes não diferia das sensíveis, visto que sua frequência na população permanecia constante, mesmo na ausência do fungicida.

Estudando o mesmo problema nos Estados Unidos, Ruppel (1975) concluiu que as linhagens de *Cercospora beticola* resistentes a benzimidazóis não diferiam das sensíveis quanto ao crescimento e esporulação “in vitro” ou patogenicidade e esporulação “in vivo”. Mais tarde, Ruppel et al. (1980) verificaram que as linhagens resistentes apresentavam um alto grau de persistência na ausência do benomyl, mesmo em campos onde outros fungicidas estavam sendo usados.

A inibição do crescimento “in vitro” de *C. capsici* isolado de *Capsicum* foi testada em meio de cultura com nove fungicidas, em concentrações variando de 50-300ppm. Kore et al. (1989) observaram que o crescimento não foi inibido por oxiclreto de cobre, zineb, mancozeb, dithianon, iprodione e captafol a 50ppm, mas a inibição só ocorreu à altas concentrações. O carbendazin e o tiofanato não permitiram bom crescimento do *C. capsici* a 50 ppm.

Via de regra, as linhagens resistentes a um benzimidazol são resistentes aos outros do mesmo grupo, isto é, apresentam resistência cruzada (Miller e Fletcher, 1974; Davidse, 1982). O mecanismo responsável por esta correlação, segundo Georgopoulos (1982

a), deve-se ao fato dos benzimidazóis compartilharem de um mesmo modo de ação. Entretanto, há uma exceção, Tuyl et al.(1974) observaram a ocorrência de mutantes de *Aspergillus nidullans* , resistentes a benomyl, mas eram sensíveis a thiabendazol, e mutantes resistentes a thiabendazol eram mais sensíveis a benomyl do que outra linhagem.

Os problemas de resistência relacionados aos benzimidazóis não estão unicamente restrito ao seu uso intensivo, mas também pelo fato de atuarem em um único sítio específico do metabolismo do patógeno, e pela maioria dos fungos possuírem estirpes resistentes na sua população original (Delp, 1980). O fato da resistência aos benzimidazóis serem resultante de um processo de seleção natural também é relatado por Ghini (1987).

#### **4.6. Caracterização molecular**

A identificação e caracterização de fungos são os primeiros passos, para a realização do conhecimento aprofundado de um determinado patógeno. Tradicionalmente a identificação dos fungos é feita baseada em características morfológicas, mas que estas podem levar a controvérsias quanto à identificação de espécies, além destes não serem suficientemente acurados para separar indivíduos a nível subespecíficos. Atualmente técnicas moleculares são ferramentas importantes e com alto grau de precisão, sendo utilizada amplamente na taxonomia e na caracterização de fungos.

O objetivo da sistemática de fungos é organizá-los em grupos que facilitem a identificação de espécie e a possível correlação entre elas. Para se alcançar tal objetivo, o qual está diretamente ligado a quantidade de características disponíveis para a análise. Deve-se ressaltar que a espécie é a unidade fundamental para a classificação biológica, embora haja controvérsias devido a problemas teóricos e práticos. O conceito mais tradicional

é o que delimita a troca genética, denominado de genoespécie. Em fungos que possuem o ciclo sexual já descrito, as genoespécies são todas as populações que podem cruzar e produzir progênie viável. Este conceito é de difícil aplicação nos deuteromicetos, pois não possuem o ciclo sexual. Os organismos que apresentam similaridades gerais e que diferem substancialmente de outros grupos de indivíduos são denominados de taxoespécie. Quando os dois conceitos, genoespécie e taxoespécie se coincidem, forma-se o nomespécie (Bertioli et al., 1995).

Geralmente os fungos são classificados em espécies de acordo com as características morfológicas. Mas este tipo de análise é deficitária em termos de distinguir a homologia e convergência (Samuels e Siefert, 1995). Esta dificuldade é muito comum nos 95 % dos fungos, os quais não se conhecem a fase sexuada, antes agrupados na subdivisão Deuteromycotina e atualmente sendo considerados como fungos mitospóricos. Estes fungos são agrupados pela ausência do ciclo sexual, o que não indica uma relação filogenética, mas uma convergência de alguma característica (Bertioli, et al., 1995). Portanto, tais características não permitem a predição de relação filogenética entre os gêneros anamorfos ou ainda entre espécies do mesmo gênero (Samuels e Siefert, 1995).

A caracterização de fungos consiste na determinação da variabilidade genética interespecífica, assim como na identificação a nível de população, isolado ou linhagem. A caracterização de fungos tem vários objetivos, tais como: elucidação das reações filogenéticas das populações, identificação de linhagens por razões práticas, como: epidemiologia, monitoramento de patógenos, registro e patenteamento de linhagens modificadas geneticamente, autenticação de acessos em coleções fúngicas. É importante a determinação da variabilidade genética dos fungos fitopatogênicos, com a finalidade de

fornecer subsídios, para o desenvolvimento de cultivares de plantas que apresentam resistência duradoura a estes patógenos. Sendo que é vital a obtenção de isolados representativos de uma determinada espécie para serem usados nos bioensaios das plantas modificadas por engenharia genética.

Com o passar dos anos os processos envolvidos no estudo de fungos foram cada vez mais sofisticadas, incluindo o aprimoramento na microscopia ótica e eletrônica, o desenvolvimento de meios de culturas diferenciais, a capacidade de comparar enzimas e metabólitos secundários, o desenvolvimento de técnicas imunológica entre outras. Estes métodos avaliam características de expressão genômica, podendo ser muitas vezes de forma inconstante, devido a variações fisiológicas e/ou ambientais. A extrema plasticidade fenotípica, observada em vários tipos de quantificação, especialmente em fungos, pode prejudicar a precisão da análise (Bertioli et al., 1995).

O uso de critérios morfológicos é o primeiro passo para a identificação de alguns fungos, mas pode não ser completamente de forma precisa. Devido a algumas diferenças a nível subcelular podem não ser expressas à nível de características morfológicas e algumas diferenças nas características morfológicas podem ser pela instabilidade de isolado ou de condições de cultivo (Ferron, 1978; Schechter e Hall, 1973). Através desta afirmação, constata-se que os resultados obtidos com base nos critérios fenotípicos devem ser confirmados com as técnicas mais apuradas, como por exemplo através de métodos genéticos.

A análise direta de DNA ofereceu uma nova dimensão no agrupamento de taxa em características verdadeiras, não sujeitas a variações, podendo, portanto, diferenciar homologia de convergência. As análises de DNA oferecem maior precisão na

diferenciação intraespecífica, que via de regra, não pode ser alcançada de maneira consistente através de apenas análises morfológicas do fungo. É importante enfatizar que na maioria dos casos, as classificações baseadas em marcadores moleculares (DNA) colaboram diretamente nas classificações baseadas em dados morfológicos.

Os marcadores moleculares estão sendo cada vez mais utilizados para a caracterização das populações de fungos fitopatogênicos. Os marcadores podem ser usados para avaliar níveis de diversidade genética e relações filogenéticas inter e intra específicas, além de identificar raças e patótipos. Os marcadores que estão sendo localizados perto de genes de avirulência estão sendo mapeados visando a clonagem destes genes e a sua utilização em programas de melhoramento genético.

A reação de Polimerase em Cadeia (PCR) consiste na amplificação “*in vitro*” de regiões de DNA, flanqueadas por inibidores (*primers*), através da enzima Taq DNA polimerase. A reação é baseada em variações de temperaturas e consiste em três estágios: desnaturação do DNA - alvo (90 a 96°C), ligação do *primer* ao DNA-alvo (35 a 65°C) e extensão enzimática da fita de DNA recém amplificada, sendo que neste passo, dNTPs são adicionados as bases complementares da fita de DNA alvo pela Taq polimerase (72°C). Os componentes da reação são: DNA-alvo, *primers*, Taq polimerase, dNTPs e tampão da enzima (EDTA, Tris, detergente não-iônico e MgCl<sub>2</sub>). A amplificação do DNA por PCR permite a replicação *in vivo* de regiões selecionadas do DNA (Müllis e Fallona, 1987; Saiki et al., 1988).

A técnica do PCR proporcionou um avanço muito grande no ramo da taxonomia, isto por oferecer resultados rápidos, precisos para a identificação e caracterização de fungos do que qualquer outra técnica descrita. A utilização da técnica do PCR também pode ser utilizada para DNA fingerprinting, amplificando regiões aleatórias do genoma, oferecendo

padrões únicos para cada espécie ou para cada isolado (Caetano-Anollés et al., 1991; Welsh e McClelland, 1991; Willans et al., 1990). Além deste fato, esta técnica também pode ser utilizada para amplificar regiões de DNA de seqüência conhecidas, como genes que codificam rRNA, genes de mtDNA, genes de tRNA (Welsh e Mc Clelland, 1991), microsátélites (Charslesworth, 1994) e outro genes funcionais para a detecção específica. Com o desenvolvimento da técnica de PCR, polimorfismos podem ser observados pela clivagem de produtos de amplificação com enzimas de restrição. Os produtos de clivagem podem ser observados em gel de agarose corados com brometo de etídio, sem necessidade do Southern blot, simplificando a análise.

Recentemente, Williams et al. (1990) descreveram uma nova classe de marcadores moleculares chamada RAPD (Radom Amplified Polymorphic DNA). A técnica se originou através da modificação da técnica original de PCR (Polymerase Chain Reaction), descrita por Saiki et al. (1988). Ao invés de se utilizar um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) longos e especialmente desenvolvidos para amplificar uma seqüência específica, utiliza-se um único *primer* arbitrário de poucos pares de bases (9-10). Estes “*primers*” se ligam a vários locos diferentes, com a finalidade de amplificar seqüências aleatórias de um DNA alvo. Teoricamente, o número de fragmentos de DNA amplificados depende do comprimento do *primer* e do tamanho do genoma alvo. A amplificação é baseada na probabilidade de uma dada seqüência de DNA (complementar àquela do *primer*) ocorrer no genoma, em fitas opostas do DNA, em orientação oposta, e dentro de uma distância amplificável pela enzima Taq polimerase. Os *primers* utilizados são de seqüência aleatória, contém pelo menos 50% de G+C, e não apresentam seqüências repetidas e invertidas. Os produtos de amplificação são separados em eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz ultravioleta. Os polimorfismos resultam de trocas no sítio de ligação do *primer* (mutações

de ponto), que impossibilitam uma associação estável com o *primer*, ou por meio de trocas que alterem o tamanho ou a sequência do DNA alvo, como inversões, deleções e inserções (Waugh e Powell, 1992). Essa técnica, segundo Waugh e Powell (1992), possui várias vantagens por ser simples e rápida, utilizando pequenas quantidades de DNA, não envolvendo o uso de radioatividade, além de ser bastante apropriada para o uso em larga escala, isto é, no melhoramento de plantas e no estudo de genética de populações e de biodiversidade.

São várias as aplicações da técnica de RAPD, como por exemplo: na elaboração de mapas genéticos detalhados, de alta densidade, para diversos organismos diferentes, usando o mesmo conjunto de *primers* aleatórios (Tingey et al., 1991), possibilita acelerar programas de retrocruzamento, pois permite selecionar no DNA, nas populações segregantes, os indivíduos que mais se assemelham ao progenitor recorrente, diminuindo desta forma o número de retrocruzamentos necessários (Tanksley et al., 1989), permite elaborar estudos de variabilidade genética em vários organismos. Hu e Queiros (1991) utilizaram marcadores RAPD na identificação de cultivares de brócolis e couve-flor. Granjal-Martin et al. (1993) caracterizaram a raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* por meio do uso de marcadores moleculares RAPD. Guthrir et al. (1992) desenvolveram um sistema para a identificação de isolados de *Colletotrichum graminicola*, utilizando marcadores de RAPD, que permite a seleção de materiais por meio de identificação de marcadores moleculares ligados a genes de interesse. Também tem sido muito útil na identificação e classificação dos isolados de *Rhizoctonia solani* em grupos de anastomose (Duncan et al., 1993; Freeman e Rodriguez, 1995), na separação de espécies de *Colletotrichum* (*gloeosporioides*, *acutatum* e *fragariae*) responsáveis pela antracnose do morangueiro (Sreenivasaprasad et al., 1992) e na construção de mapa genético em *Neurospora crassa* (Williams, 1991)

O PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizadas como “*primers*”, que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes “*primers*” são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares específicas que flanqueiam a região alvo.



## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal - Setor Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP, campus de Botucatu - S.P..

### **5.1. Estabelecimento de coleção de isolados de *C. coffeicola* e manutenção de culturas**

#### **5.1.1. Coleção de isolados**

Para a realização dos experimentos, foram utilizados os isolados de *C. coffeicola*, provenientes de regiões produtoras de café (*Coffea arabica* L.) de diversos municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais, mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal - Setor Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP, campus de Botucatu - S.P (Quadro 1).

Quadro 1 Relação de isolados de *C. coffeicola*, com respectivos municípios e datas de isolamentos, mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Produção Vegetal - Setor Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP/Botucatu - S.P.

<b>Código dos isolados</b>	<b>Município de procedência</b>	<b>Data de isolamento</b>
C – 2568	Paracatú –MG	13/06/96
C – 2579	Paracatú – MG	23/07/96
C – 2579-1	Paracatú – MG	23/07/96
C – 2579-2	Paracatú – MG	23/07/96
C – 2581-B	Santa Juliana – MG	23/07/96
C – 2583-B	Santa Juliana – MG	23/07/96
C – 2584	Santa Juliana – MG	23/07/96
C – 2584-B	Santa Juliana – MG	23/07/96
C – 2585	Paracatú – MG	24/07/96
C – 2734-2	Santa Juliana – MG	15/05/98
C – 2734-3	Santa Juliana – MG	15/05/98
C – 2738-1	Botucatu – SP	05/06/98
C – 2738-2	Botucatu – SP	05/06/98
C – 2739-1	Botucatu – SP	05/06/98
C – 2739-2	Botucatu – SP	05/06/98
C – 2739-3	Botucatu – SP	05/06/98
C – 2751-1	São Manuel – SP	08/07/98
C – 2751-2	São Manuel – SP	08/07/98
C – 2751-C	São Manuel – SP	08/07/98
C – 2753-1	Patos de Minas – MG	17/07/98
C – 2753-3	Patos de Minas – MG	17/07/98
C – 2754-2	Patos de Minas - MG	17/07/98
C – 2754-3	Patos de Minas - MG	17/07/98
C – 2783-1	São Gotardo - MG	21/05/99
C – 2784-2	São Gotardo - MG	21/05/99
C – 2784-4	São Gotardo - MG	21/05/99
C – 2784-5	São Gotardo - MG	21/05/99
C – 2785-1	São Gotardo - MG	21/05/99
C – 2785-3	Patos de Minas - MG	21/05/99
C – 2785-4	Patos de Minas - MG	21/05/99
C – 2786-3	Santa Juliana - MG	21/05/99
C – 2787	Patos de Minas - MG	21/05/99

### 5.1.2. Isolamento a partir de tecidos vegetais infectados

Folhas de cafeeiro com sintomas típicos de cercosporiose foram coletadas nas regiões produtoras de café no Estado de São Paulo. Os materiais foram coletados nos seguintes municípios: Vera Cruz, Garça, Júlio de Mesquita, Pirajú, Marília, Manduri, Ribeirão do Sul, Álvaro de Carvalho, Guarantã, Ourinhos, Pirajuí e Presidente Alves. (Quadro 2.).

O isolamento do patógeno foi feito pelo método direto, no qual com o auxílio de um microscópio estereoscópio, para auxiliar na visualização das estruturas do fungo, e de uma agulha, os conídios foram transferidos das lesões, para os tubos de ensaio contendo meio de BDA (Menezes e Silva-Hanlin, 1997). A incubação foi feita em estufa tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand), sob regime de luz contínua, a 25°C, pelo período de 7 dias. Após um período de incubação, evidenciando-se o crescimento micelial típico de *Cercospora*, fragmentos da região da periferia da colônia foram retirados e transferidos para tubos de ensaio com meio de BDA inclinado. As transferências de fragmentos de hifas foram feitas em processos consecutivos até a obtenção de culturas puras e uniformes.

### 5.1.3. Preservação dos isolados

Os isolados foram preservados em tubos contendo meio de cultura de **PSA (Peptona Sacarose Ágar)** e cobertos com óleo mineral (Nujol) autoclavado e em frascos de penicilina com água destilada esterilizada, lacrados com tampa metálica (Castellani, 1967). Os tubos e frascos foram devidamente identificados e mantidos em temperatura ambiente.

Quadro 2. Relação de isolados de *C. coffeicola*, com respectivos municípios e datas dos isolamentos, coletados nas regiões produtoras da cultura no Estado de São Paulo

<b>Código dos isolados</b>	<b>Município de procedência</b>	<b>Data de isolamento</b>
C-2824	Vera Cruz (SP)	19/05/00
C-2825	Garça (SP)	19/05/00
C-2826	Garça (SP)	19/05/00
C-2827	Júlio de Mesquita (SP)	19/05/00
C-2828	Pirajú (SP)	19/05/00
C-2829	Ourinhos (SP)	19/05/00
C-2830	Marília (SP)	19/05/00
C-2831	Mandurí (SP)	19/05/00
C-2832	Pirajuí (SP)	19/05/00
C-2833	Presidente Alves (SP)	19/05/00
C-2834	Pirajú (SP)	19/05/00
C-2835	Pirajú (SP)	19/05/00
C-2836	Marília (SP)	19/05/00
C-2837	Ribeirão do Sul (SP)	19/05/00
C-2838	Limite de município entre Garça/Vera Cruz (SP)	19/05/00
C-2839	Limite de município entre Garça/Vera Cruz (SP)	19/05/00
C-2840	Limite de município entre Garça/Vera Cruz (SP)	19/05/00
C-2841	Álvaro de Carvalho (SP)	19/05/00
C-2842	Álvaro de Carvalho (SP)	19/05/00
C-2843	Guarantã (SP)	19/05/00
C-2844	Ourinhos (SP)	19/05/00
C-2845	Guarantã (SP)	19/05/00

## 5.2. Caracterização morfológica

### 5.2.1. Produção de conídios

Foram selecionados 21 isolados, provenientes de diferentes municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, para a mensuração dos conídios. Os isolados foram selecionados de acordo com a produção de conídios (Quadro 3.).

Para a obtenção do inóculo, transferiu-se uma porção da colônia de cada isolado, mantido pelo método de Castellani, para tubos de ensaio contendo meio de BDA. Após uma semana, três porções da colônia foram transferidas para placas de Petri, contendo meio de V-8 e incubados por sete dias, sob regime de luz contínua, com a temperatura oscilando de 22°C

a 25°C. A iluminação era feita com lâmpadas fluorescentes, tipo luz do dia, de 15 watts, situadas 45 cm acima das placas de Petri.

No início, com exceção de alguns isolados, a maioria apresentava baixa esporulação, mas formava grande quantidade de conidióforos. Para que houvesse a produção de conídios, foram feitos dois plaqueamentos sucessivos de conídios produzidos em meio de V-8 e incubados nas condições citadas anteriormente.

Quadro 3. Isolados de *C. coffeicola*, provenientes de diversos municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, para a caracterização morfológico.

<b>Código dos isolados</b>	<b>Município de procedência</b>
C – 2568	Paracatu (MG)
C – 2734-3	Santa Juliana (MG)
C – 2738-2	Botucatu (SP)
C – 2739-3	Botucatu (SP)
C – 2751-1	São Manuel (SP)
C – 2751-2	São Manuel (SP)
C – 2753-1	Patos de Minas (MG)
C – 2754-2	Patos de Minas (MG)
C – 2784-5	São Gotardo (MG)
C – 2785-1	São Gotardo (MG)
C – 2786-3	Santa Juliana (MG)
C – 2825	Garça (SP)
C – 2826	Garça (SP)
C – 2828	Piraju (SP)
C – 2835	Piraju (SP)
C – 2836	Marília (SP)
C – 2837	Ribeirão do Sul (SP)
C – 2838	Limite de município entre Garça/Vera Cruz (SP)
C – 2840	Limite de município entre Garça/Vera Cruz (SP)
C – 2844	Ourinhos (SP)
C – 2845	Guarantã (SP)

### 5.2.2. Mensuração de conídios dos isolados de *C. coffeicola*

Foram mensurados 50 conídios de cada isolado, considerando-se o comprimento (C), largura (L) e o número de septos (N.S.) Para este procedimento, utilizou-se microscópio ótico, com objetiva 40x e a ocular MQ 018 e as lâminas previamente preparadas contendo conídios do fungo e o corante lactofenol.

Dos resultados obtidos das mensurações, calcularam-se a média e o desvio padrão e verificaram-se as amplitudes máxima e mínima, para cada isolado. Para comparar os resultados obtidos dos 21 isolados, utilizaram-se dados quantitativos, os quais foram submetidos aos métodos multivariados de Análise de Agrupamento (AA) e Análise de Componentes Principais (ACP) (Sneath e Sokal, 1973), para caracterizar as amostras quanto suas dissimilaridades. Como indicadores ou variáveis originais, foram selecionados 21 isolados com taxas adequadas de esporulação (VI) do conjunto de 54 isolados utilizados. Com base nesta seleção, foram realizadas as AA e ACP para o número total de indivíduos caracterizados morfológicamente.

A Análise de Agrupamento foi efetuada entre os 21 isolados, empregando-se a Distância Euclidiana Média para cada conjunto de variáveis originais, utilizando-se o método de pareamento por média aritmética simples e o desvio padrão (algoritmo UPGMA-Rolph, 1970) e o resultado final apresentado sob a forma de dendrograma hierárquico.

Com base na matriz original de dados, foram também calculados os componentes principais padronizados,  $Y_1$  e  $Y_2$ , para cada amostragem, de forma a serem centrados na origem, conforme preconiza a ACP (Morrison, 1967). Esta análise possibilitou verificar a capacidade discriminatória das variáveis originais em processo de formação dos

agrupamentos, portanto, empregada para reduzir o conjunto de indicadores de cada amostragem, a duas novas variáveis não correlacionadas, que são os componentes principais  $Y_1$  e  $Y_2$ . A dispersão das amostragens entre os eixos ortogonais  $Y_1$  e  $Y_2$  foi expressa por meio de uma figura bidimensional. Os agrupamentos formados na AA e na ACP representam classes dentro das quais estão localizadas unidades (no caso, amostragens) que são similares entre si, por compartilharem características semelhantes (Curi, 1991).

### 5.3. Efeitos de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação

Esse estudo foi realizado em 11 dos 54 isolados (Quadro 4), em quatro meios de culturas (V-8, extrato de cenoura, extrato de pó de café e extrato de folhas de café). Para a seleção dos isolados, foram consideradas a sua procedência e esporulação.

Quadro 4. Isolados de *C. coffeicola* e sua procedência para estudo de crescimento micelial e esporulação em quatro meios de cultura.

<b>Código dos isolados</b>	<b>Município de procedência</b>
C – 2568	Paracatu (MG)
C – 2734-3	Santa Juliana (MG)
C – 2738-2	Botucatu (SP)
C – 2751-2	São Manuel (SP)
C – 2754-2	Patos de Minas (MG)
C – 2784-5	São Gotardo (MG)
C – 2825	Garça (SP)
C – 2828	Piraju (SP)
C – 2836	Marília (SP)
C – 2837	Ribeirão do Sul (SP)
C – 2842	Álvaro de Carvalho (SP)

Para a obtenção do inóculo, utilizaram-se os mesmos procedimentos descritos no item 5.2.1., a 25°C e sob luz constante com lâmpadas fluorescentes, tipo luz do dia, de 15watts, situadas 45cm acima das placas de Petri.

Após sete dias, transferiu-se um disco de micélio de 5mm de diâmetro para o centro de cada placa de Petri, contendo 20mL de cada um dos meios de culturas:

- **Meio de V-8:** CaCO<sub>3</sub> 3,0g, ágar 15g e água destilada 800mL

Após a autoclavagem, adicionaram-se assepticamente 200mL de suco de vegetais – V-8 e 5µg/mL de oxitetraciclina, para minimizar as contaminações bacterianas provenientes do suco, adaptação para o antibiótico utilizado por Del Peloso et al.(1989).

- **Meio de cenoura (CDA):** Extrato de cenoura 200g, dextrose 20g,

ágar 17g, água destilada q.s.p. 1000mL. Antes de autoclavar os ingredientes, obteve-se o extrato da cenoura em 400mL de água destilada, e a seguir coou-se em filtro de papel e completou-se o volume para 1000mL (Castro e Coêlho, 2000).

- **Extrato de pó de café - ágar (EPCA):** 21g de café torrado e

moído fino foram colocados em filtro “Melita” adaptados em um funil e em erlenmeyer e depois foram vertidos 250mL de água destilada fervente. Ao filtrado adicionaram-se 15g de ágar e água destilada até completar 1000mL (Del Peloso et al., 1989).

- **Extrato de folhas de café – agar (EFCA):** triturou-se 800g de

folhas sadias de café no liquidificador por 3 minutos em 2000mL de água destilada e levada ao fogo por 3 minutos, com a finalidade de extrair os extratos das folhas. Em 1000mL do extrato coado em papel “Melita” adicionou-se 15g de ágar .

Todos os meios de cultura preparados foram autoclavados a 121°C por 30 minutos.



Após a repicagem nesses meios de cultura, o fungo foi incubado nas mesmas condições já citadas anteriormente, a 25°C e sob a luz constante (luz fluorescente, tipo luz do dia, de 15 watts), posicionadas a 45 cm acima das placas de Petri.

As avaliações foram realizadas aos 7, 10 e 14 dias de incubação (El-Gholl et al., 1982). Em cada época de avaliação, mensurou-se, perpendicularmente, dois diâmetros de cada colônia, com auxílio de uma régua milimetrada, calculando-se depois a média (Rosa e Menezes, 2001). Posteriormente, retiraram-se quatro discos de micélio de 5mm da periferia da colônia com o auxílio de um vazador de rolha. Os discos foram colocados em um tubo de ensaio contendo 1mL de água destilada esterilizada e agitados por 3 minutos, com auxílio de um agitador de tubos AP-56 - Phoenix. Após este procedimento contou-se a quantidade de conídios por amostra em câmara de Neubauer.

Para cada isolado, realizaram-se três repetições e o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 11 x 3, correspondentes a 11 isolados e três períodos de avaliações, perfazendo um total de 33 tratamentos para cada meio de cultura testado e calculou-se, para cada meio de cultura, a correlação do crescimento da colônia e a quantidade de conídios ( $\times 10^4$  conídios/mL) de todos os isolados.

## **5.4. Teste de patogenicidade**

### **5.4.1. Obtenção das mudas**

Sementes de café (*Coffea arabica* L.), pertencentes ao cultivar Catuaí amarelo, foram plantadas em sacos de polietileno de 11 x 20cm (diâmetro x altura), que continham uma mistura autoclavada de 60% de solo argiloso (Latosolo roxo) e 40% de esterco

de gado curtido e 0,1% (p/v) da formulação 4-14-8. No período da obtenção das mudas em viveiro, não se realizaram pulverizações com defensivos agrícolas nem adubação complementar.

#### **5.4.2.Obtenção do inóculo**

Para o teste de patogenicidade, utilizaram-se todos os 49 isolados que estão relacionados nos Quadros 1 e 2.

Para a obtenção do inóculo, transferiu-se uma porção da colônia de cada isolado, conservado pelo método de Castellani (1967), para tubos de ensaio contendo meio de BDA. Após uma semana, três porções da colônia foram transferidas para placa de Petri contendo meio de V-8. Todos os isolados foram incubados por sete dias, condições de outras à 25°C e sob a luz constante (luz fluorescente, tipo luz do dia, de 15 watts), posicionadas a 45 cm acima das placas de Petri.

A inoculação foi obtida adicionando-se, em cada placa de Petri, 10mL de água destilada esterilizada contendo 0,01% de Tween-20. Para desalojar os conídios dos conidióforos, utilizou-se um pincel de cerdas macias. A operação foi repetida com mais 10mL de água esterilizada, logo após a primeira extração. Para a inoculação, as suspensões de conídios foram filtradas em dupla camada de gaze previamente esterilizada, com a finalidade de separar o micélio dos conídios. A quantificação dos conídios na suspensão foi feita com auxílio da lâmina de Neubauer e depois padronizados à concentração de  $10^5$  conídios/mL.

### **5.4.3. Inoculação**

As mudas com 4 a 6 pares de folhas foram mantidas em câmara úmida durante 48 horas antes da inoculação.

A inoculação foi realizada por aspersão de conídios na face abaxial da folha com auxílio de um pulverizador manual com capacidade de 500mL.

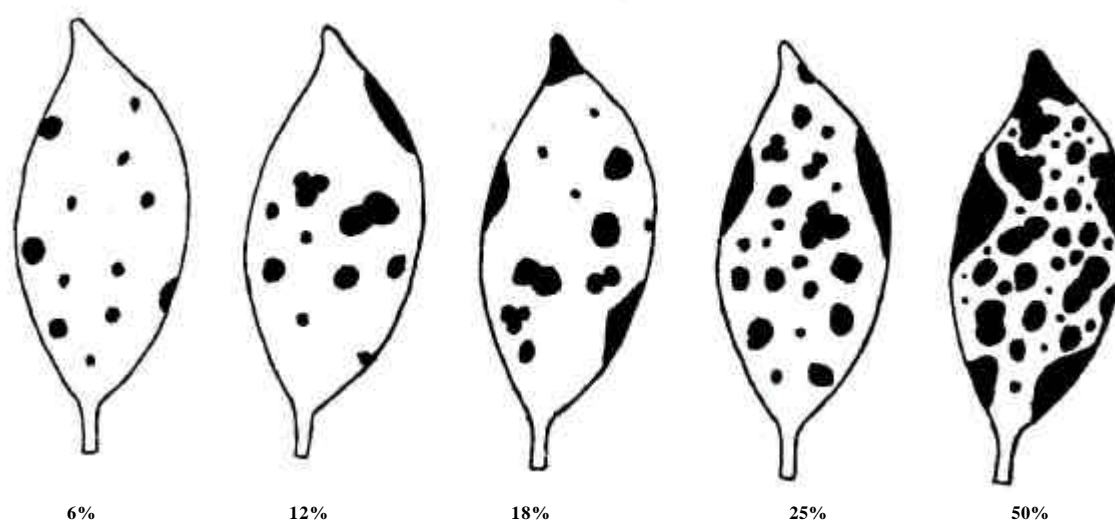
Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 horas em condição de casa-de-vegetação, com controle parcial de temperatura e umidade.

### **5.4.4. Avaliação**

Foram realizadas cinco avaliações a cada sete dias, a partir do 12º até o 40º dia após a inoculação. Os sintomas da doença foram avaliados nas folhas localizadas no terço médio das plantas.

Para as avaliações, adaptou-se o método utilizado por Fernandez (1988). Ao invés da porcentagem da área foliar afetada adotaram-se notas correspondentes a intervalos de área foliar afetada, conforme apresentadas na Figura 1 e Quadro 5.

Para cada isolado, foram realizadas três repetições, sendo cada parcela representada por um vaso contendo uma planta. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.



Quadro 5. Adaptação da escala diagramática da porcentagem de área foliar lesionada por *C. coffeicola* para notas.

Área foliar afetada (Fernandes, 1988)	% de área foliar afetada	Notas
	Sem sintomas	0
6%	até 6%	1
12%	6,1% a 12%	2
18%	12,1% a 18%	3
25%	18,1% a 25%	4
50%	25,1% a 50%	5
	Acima de 50% ou folha caída	6

Para complementar a análise de sobrevivência, calculou-se a média aritmética simples das 3 repetições de cada isolado, separadamente, por avaliação, e analisaram-se os resultados obtidos dos 49 isolados. Para tanto, utilizaram-se dados quantitativos e submetidos aos métodos multivariados de Análise de Agrupamento (AA) e a Análise de

Componentes Principais (ACP) (Sneath e Sokal, 1973), para caracterizar as amostras quanto as suas dissimilaridades.

A Análise de Agrupamento foi efetuada entre os 49 isolados, empregando-se a Distância Euclidiana Média para cada conjunto de variáveis originais, através do método de pareamento por média aritmética simples e o desvio padrão (algoritmo UPGMA-Rolph, 1970). O resultado final é apresentado sob a forma de dendrograma hierárquico.

Com base na matriz original de dados, foram também calculados os componentes principais padronizados,  $Y_1$  e  $Y_2$ , para cada amostragem, de forma a serem centrados na origem, conforme preconiza a ACP (Morrison, 1967). Esta análise possibilitou verificar a capacidade discriminatória das variáveis originais em processo de formação dos agrupamentos sendo, portanto, empregada para reduzir o conjunto de indicadores de cada amostragem, a duas novas variáveis não correlacionadas, que são os componentes principais,  $Y_1$  e  $Y_2$ . A dispersão das amostragens entre os eixos ortogonais  $Y_1$  e  $Y_2$  foi expressa por meio de uma figura bidimensional. Os agrupamentos formados na AA e na ACP representam classes dentro das quais estão localizadas unidades (no caso, amostragens) que são similares entre si, por compartilharem características semelhantes (Curi, 1991).

## 5.5. Caracterização dos isolados de *C. coffeicola* por marcadores moleculares

### RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

#### 5.5.1. Obtenção do inóculo

Para a caracterização molecular utilizaram-se 18 isolados que estão no Quadro 6.

Para a obtenção do inóculo, adotaram-se os mesmos procedimentos citados no item 5.2.1. Após uma semana, três porções da colônia foram transferidas para placa de Petri contendo meio de V-8.

Quadro 6. Isolados de *C. coffeicola*, provenientes de vários municípios dos Estados de São Paulo e de Minas Gerais, para a caracterização molecular.

<b>Código dos isolados</b>	<b>Município de procedência</b>
C – 2568	Paracatú (MG)
C – 2579-1	Paracatu (MG)
C – 2734-3	Santa Juliana (MG)
C – 2738-2	Botucatu (SP)
C – 2739-2	Botucatu (SP)
C – 2751-1	São Manuel (SP)
C – 2751-C	São Manuel (SP)
C – 2754-3	Patos de Minas (MG)
C – 2784-5	São Gotardo (MG)
C – 2785-3	Patos de Minas (MG)
C – 2786-3	Santa Juliana (MG)
C – 2824	Vera Cruz (SP)
C – 2825	Garça (SP)
C – 2826	Garça (SP)
C – 2828	Piraju (SP)
C – 2829	Ourinhos (SP)
C – 2830	Marília (SP)
C – 2835	Piraju (SP)

### 5.5.2.Extração do DNA total

Utilizou-se o protocolo aprimorado para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* (Kuramae-Izioka, 1997), adaptado para o *Cercospora*, onde três discos de micélio de 0,5cm de diâmetro foram retirados de culturas crescidas em V-8.

Os micélios dos isolados foram lavados três vezes com água destilada esterilizada, secos em Speed Vac e armazenados a - 20°C até a extração do DNA.

Para a extração do DNA total, os micélios foram triturados com auxílio do pistilo e almofariz em nitrogênio líquido e, após, ressuspensos com 70µl de tampão de extração (100mM Tris, pH 8,0, 50mM EDTA, Ph 8,0, 50mM NaCl, 20% sodium dodecyl sulfate). O homogenizado foi incubado por 30 minutos a 65°C, em banho-maria, sob agitação. Adicionou-se 500µl de acetato de potássio 5M às amostras e estas foram colocadas em banho de gelo por 30 minutos, sendo realizada a inversão a cada 5 minutos. Centrifugaram-se as amostras por 10 minutos a 12.000rcf. O sobrenadante foi extraído mais uma vez com clorofórmio álcool isoamílico (25:1). Em cada amostra, foi adicionado um volume de isopropanol para precipitar o DNA, sendo realizada nova centrifugação por 10 minutos a 12.000rcf. O “pellet” foi lavado com 700µl de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. Secou-se o “pellet” em Speedvac por 10 minutos. O DNA foi dissolvido em 1/10TE (10mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA) e tratados com 40 µg/ml de Rnase Dnase-free a 37°C, durante 3 horas. A quantificação do DNA foi feita em GenQuant (Pharmacia). Foi lida a razão  $A_{260nm}/A_{280nm}$  de todas as amostras de DNA, para determinar a qualidade do DNA, a qual estava entre 1,72 a 1,83 indicando que estavam livres de proteínas e carboidratos. Todas as amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento das reações de RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso).

### 5.5.3. Reações de RAPD

Os “primers” utilizados para as reações de RAPD foram OPG-04, OPG-09, OPG-13, OPG-14, OPG-18, OPP-05, OPP-19, provenientes dos “kits” G e P da Operon(Opeon Technologies Inc. Alameda, CA) (Quadro 7.). Os procedimentos para as reações de RAPD foram basicamente aqueles descritos por Willians et al. (1990). Foram utilizadas placas de ELISA com 96 células para as reações, onde cada uma continha 10X tampão PCR, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> ; 2,5mM de cada um dos quatro dNTPs, 5ng de “primer”, 5ng de DNA genômico e 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase. O volume de 20µl de reação foi coberto com 30µl de óleo mineral. Para as amplificações, o termociclador foi programado para um ciclo a 96°C por 2 minutos, seguido de 35ciclos a 96°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto, 72°C por 1,5 minuto e um ciclo a 72°C por 5 minutos.

Em cada tubo contendo 20 µl de reação e em 200ng do marcador molecular Ladder 1Kb foi adicionado 4,0µl de tampão de carregamento (40% de sacarose e 0,25% bromofenol azul) (Sambrook et al., 1989). Os produtos de RAPD e o marcador molecular foram separados em gel de agarose a 1,5% em TBE (0,1M de Tris-HCl, 0,1M de ácido bórico, 0,02mM de EDTA, pH 8,3) contendo 10mg/ml de brometo de etídio (Sambrook et al.,1989), numa voltagem aproximada de 5V/cm de gel. Os géis foram fotografados e impressos em branco e preto em aparelho “Eagle Eye” , para análise



Quadro 7. Sequência dos “primers” usados em reações de RAPD para determinar a similaridade genética entre os isolados de *C. coffeicola*.

<b>Código – OPERON</b>	<b>Sequência (5’ para 3’)</b>
OPG-04	AGCGTGTCTG
OPG-09	CTGACGTCAC
OPG-13	CTCTCCGCCA
OPG-14	GGATGAGACC
OPG-18	GGCTCATGTG
OPP-05	CTGAGACGGA
OPP-19	GGGAAGGACA

#### **5.5.4. Avaliação**

As análises dos dados do polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) foram realizadas no programa computacional NTSYS-pc 1.8, Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf, 1992).

Os dados foram registrados na forma de ausência/presença de bandas de gel. Bandas de mesmo comprimento foram consideradas como idênticas. Estes dados foram codificados na forma binária (1 para a presença e 0 para a ausência).

A distância genética entre os isolados de *C. coffeicola* foi determinada pelo coeficiente Sample Matching.

A matriz de distância foi, em seguida, transformada num dendrograma utilizando-se o método SAHN Clustering (sequential agglomerative, hierarchical and nested) sob procedimento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging).

### 5.6. Sensibilidade “in vitro” de *C. coffeicola* a diferentes fungicidas

Foram realizados dois experimentos “in vitro”, para determinar a fungitoxicidade dos produtos ao patógeno em estudo. Optou-se pelo teste de produtos tradicionalmente recomendados para o controle da doença, além de outros fungicidas não específicos. Os produtos testados com o nome comercial, princípio ativo, formulação e grupo químico encontram-se no Quadro 8.

No primeiro experimento, foi testado o comportamento de sete isolados do fungo (Quadro 9) aos produtos, nas mesmas concentrações de 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL. O segundo experimento foi realizado com base nos resultados obtidos na sensibilidade dos isolados aos fungicidas no primeiro experimento e utilizaram-se oito novos isolados (Quadro 10.) e mantendo-se apenas como isolados padrões, C-2568 e C-2734-3. As concentrações utilizadas para cada fungicida são apresentadas no Quadro 11.

Quadro 8. Nome comercial, princípio ativo, formulação e grupo químico dos fungicidas utilizados nos testes de sensibilidade “in vitro” dos isolados de *C. coffeicola*

<b>Nome comercial</b>	<b>Princípio ativo</b>	<b>Formulação</b>	<b>Grupo químico</b>
Amistar	Azoxystrobin	grânulos dispersíveis em água	estrobilurina
Benlate 500	Benomyl	pó-molhável	benzimidazol
Bravonil Ultrex	Chlorothalonil	grânulos dispersíveis em água	ftalonitrila
Daconil	Chlorothalonil	pó-molhável	ftalonitrila
Folicur	Tebuconazole	pó-molhável	triazol
Juno	Propiconazole	conc. Emulsionável	triazol
Reconil	Oxicloreto de cobre	pó-molhável	cúprico
Ridomil- Mancozeb	Metalaxyl+mancozeb	pó-molhável	alaninato + ditiocarbamato

Quadro 9. Isolados de *C. coffeicola* caracterizados quanto a sensibilidade aos fungicidas (Primeiro experimento).

<b>Código dos isolados</b>	<b>Município de procedência</b>
C – 2568	Paracatu (MG)
C – 2579-1	Paracatu (MG)
C – 2734-3	Santa Juliana (MG)
C – 2738-2	Botucatu (SP)
C – 2739-3	Botucatu (SP)
C – 2753-1	Patos de Minas (MG)
C – 2754-2	Patos de Minas (MG)

Quadro 10. Isolados de *C. coffeicola* caracterizados quanto a sensibilidade aos fungicidas (Segundo experimento).

<b>Código dos isolados</b>	<b>Município de procedência</b>
C – 2568	Paracatu (MG)
C – 2734-3	Santa Juliana (MG)
C – 2828	Pirajú (SP)
C – 2840	Garça/ Vera Cruz (SP)
C – 2836	Marília (SP)
C – 2825	Garça (SP)
C – 2835	Pirajú (SP)
C – 2844	Ourinhos (SP)
C – 2837	Ribeirão do Sul (SP)
C – 2845	Guarantã (SP)

**Quadro 11.** Fungicidas e suas concentrações utilizadas nos testes de sensibilidade “in vitro” dos isolados de *C. coffeicola* (Segundo experimento).

<b>Nome comercial</b>	<b>Princípio ativo</b>	<b>Concentrações de princípio ativo testados</b>			
Amistar	Azoxystrobin	0	10	100	
Benlate 500	Benomyl	0	1	100	
Daconil	Chlorothalonil	0	10	100	
Folicur	Tebuconazole	0	10	100	
Juno	Propiconazole	0	10	100	
Reconil	Oxicloreto de cobre	0	100	1000	1500
Ridomil-Mancozeb	Metalaxyl+mancozeb	0	10	100	

### 5.6.1. Obtenção dos discos de micélio

Para a obtenção dos discos de micélio, adotaram-se os mesmos procedimentos citados no item 5.2.1.

Cada disco de micélio de 5mm de diâmetro foi transferido para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura com fungicida. Os isolados foram incubados em estufa sem iluminação, a 25°C.

### 5.6.2. Preparo do meio de cultura com fungicidas

Os fungicidas foram adicionados ao meio de cultura de BDA, após a autoclavagem, para que apresentassem as concentrações finais de princípio ativo de cada produto conforme citados no item 5.6. O benomyl foi previamente dissolvido em acetona e depois diluído em água destilada esterilizada (Remiro e Kimati, 1978).

### 5.6.3. Avaliação

Nos dois experimentos, foram realizadas avaliações aos 5, 7 e 10 dias de incubação, através das medições perpendiculares dos diâmetros de cada colônia.

O delineamento experimental do primeiro experimento foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 5 x 3, correspondente as doses 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL e três períodos de avaliações, perfazendo um total de 15 tratamentos para cada isolado, com 4 repetições, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri.

O delineamento experimental do segundo experimento foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial com 4x 3 (oxicloreto de cobre) e 3 x 3 (para os demais) correspondentes as quatro e três doses, respectivamente, e três períodos de avaliações, perfazendo um total de 12 tratamentos (oxicloreto de cobre) e 9 (para os demais) para cada isolado, com 4 repetições, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri.

Para a análise estatística, os dados foram transformados em  $(0,5+X)^{1/2}$ , sendo x o valor do diâmetro médio da colônia e analisados em programa estatístico SANEST.

## 6 RESULTADOS

### 6.1. Caracterização morfológica

Os dados das médias, amplitudes, desvio padrão referentes ao comprimento, largura e número de septos dos conídios *C. coffeicola* são apresentados no Quadro 12.

A amplitude do comprimento de conídios entre os isolados variou de 12,04 $\mu$ , para o isolado C-2753-1, a 273,48 $\mu$  para o isolado C-2825. As maiores variações foram observadas nos isolados: C-2836 (91,59 $\mu$  - 244,89 $\mu$ ), C-2840 (102,56 $\mu$  - 218,01 $\mu$ ) e C-2785-1 (26,88 $\mu$  - 141,04 $\mu$ ) e as menores, para: C-2826 (22,15 $\mu$  - 63,00 $\mu$ ), C-2754-2 (15,05 $\mu$  - 59,77 $\mu$ ) e C-2751-1 (28,17 $\mu$  - 76,11 $\mu$ ).

Em relação à largura dos conídios, a maior foi observada no isolado C-2739-3 com 1,08 $\mu$  e a maior para C-2836 com a 4,95 $\mu$ . Os isolados que apresentaram maiores variações na largura, em ordem decrescente, foram: C-2836 (2,37 $\mu$  - 4,95 $\mu$ ), C-2835 (1,29 $\mu$  - 3,66 $\mu$ ) e C-2739-3 (1,08 $\mu$  - 3,44 $\mu$ ) e os com menores foram C-2786-3 (0,08 $\mu$  - 0,21 $\mu$ ), C-2753-1 (3,44 $\mu$  - 4,73 $\mu$ ) e C-2826 (1,08 $\mu$  - 2,37 $\mu$ ).

A amplitude no número de septos variou de 2 (C-2785-1) a 46 (C-2840). As maiores amplitudes apresentadas foram: 12-46 (C-2840), 11-29 (C-2753-1), 4-20 (C-2828) e 11-29 (C-2845); e as menores foram: 5-19 (C-2835), 4-10 (C-2568) e 3-9 (C-2784-5)

Os resultados obtidos com a utilização do método multivariado de análise estatística encontram-se no Quadro 13 e nas Figuras 2 e 3. O resultado da Análise de Agrupamento apresentado na forma de dendrograma (Figura 2) e mostra a constituição de três grupos principais. O grupo 1 (G<sub>1</sub>) é constituído pelos isolados de menor comprimento, largura e número de septos e abrange sete representantes: C-2568 (Paracatú - MG), C-2754-2 (Patos de Minas - MG), C-2825 (Garça - SP), C-2784-5 (São Gotardo - MG), C-2826 (Garça - SP), C-2751-1 e C-2751-2 (São Manuel - SP). Pode-se considerar que os isolados deste grupo apresentam, em média, os menores valores de amplitude e de média, maior desvio padrão, para o comprimento e largura, e menor desvio padrão, para o número de septos em comparação aos isolados dos grupos 2 e 3. O grupo 2 (G<sub>2</sub>) é constituído pelos isolados: C-2738-2 e C-2739-3 (Botucatu-SP), C-2828 e C-2835 (Piraju-SP), C-2838 (Limite dos municípios Garça/Vera Cruz-SP), C-2785-1 (São Gotardo-MG), C-2844 (Ourinhos-SP), C-2786-3 (Santa Juliana -MG), cujos valores são intermediários aos grupos 1 e 3, em relação a amplitude, média de comprimento, número de septos, maior valor de amplitude e média dos septos, o que comprova que o comprimento não possui correlação com a largura e com o número de septos. O grupo 3 é constituído pelos isolados C-2734-3 (Santa Juliana-MG), C-2837 (Ribeirão do Sul-SP), C-2836 (Marília-SP), C-2753-1 (Patos de Minas-MG), C-2845 (Guarantã-SP), C-2840(Limite de municípios Garça/Vera Cruz-SP) que possuem maior comprimento, largura e número de septos em relação aos outros dois grupos. O coeficiente de correlação cofenético foi de 0,89, evidenciando o bom ajuste da análise efetuada.

Quadro 12. Resultados médios obtidos na mensuração dos conídios de 21 isolados de *C. coffeicola*.

Isolados/ Fonte	Comprimento (m)	Largura (m)	Nº de septos
C – 2568	40,27+/-13,83 (21,93-75,47)	1,78+/-0,39 (1,29-2,80)	6,52+/-1,72 (4-10)
C – 2734-3	135,43+/-33,42 (85,36-189,20)	3,51+/-0,42 (2,80-4,52)	12,14+/-3,99 (7-20)
C – 2738-2	46,59+/-23,64 (21,72-104,28)	2,35+/-0,44 (1,51-3,23)	6,94+/-3,52 (3-17)
C – 2739-3	80,11+/-17,90 (42,57-109-65)	2,15+/-0,56 (1,08-3,44)	8,46+/-2,45 (4-15)
C – 2751-1	52,81+/-13,97 (28,17-76,11)	1,74+/-0,40 (1,08-2,58)	9,74+/-2,61 (6-16)
C – 2751-2	47,00+/-16,90 (24,72-87,72)	2,16+/-0,61 (1,51-5,00)	7,40+/-2,47 (4-16)
C – 2753-1	212,70+/-36,84 (162,11-273,48)	3,95+/-0,39 (3,44-4,73)	19,48+/-5,01 (11-29)
C – 2754-2	30,63+/-11,12 (15,05-59,77)	1,83+/-0,43 (1,08-3,01)	6,94+/-2,82 (3-14)
C – 2784-5	38,96+/-13,34 (26,02-79,34)	2,35+/-0,53 (1,08-3,01)	5,16+/-1,19 (3-9)
C – 2785-1	57,87+/-28,39 (26,88-141,04)	2,95+/-0,51 (1,94-3,66)	5,96+/-2,32 (2-10)
C – 2786-3	64,63+/-21,78 (45,05-124,49)	2,97+/-0,67 (1,72-4,09)	8,04+/-2,55 (4-13)
C – 2825	31,35+/-13,99 (12,04-61,06)	2,26+/-0,44 (1,29-3,01)	5,76+/-2,52 (3-12)
C – 2826	10,47+/-34,95 (22,15-63,00)	1,82+/-0,60 (1,08-2,37)	6,66+/-1,99 (3-11)
C – 2828	60,58+/-24,78 (17,20-99,12)	2,33+/-0,49 (1,72-3,44)	10,60+/-4,10 (4-20)
C – 2835	53,44+/-15,39 (32,47-80,84)	2,28+/-0,50 (1,29-3,66)	10,58+/-4,10 (5-19)
C – 2836	143,89+/-34,80 (91,59-244,89)	3,56+/-0,70 (2,37-4,95)	14,90+/-3,34 (10-22)
C – 2837	135,43+/-33,08 (85,36-187,91)	3,51+/-0,42 (2,80-4,52)	12,14+/-3,95 (7-20)
C – 2838	69,88+/-19,82 (44,51-115,46)	2,61+/-0,62 (1,51-3,66)	13,04+/-2,14 6-16
C – 2840	163,65+/-28,14 (102,56-218,01)	2,03+/-0,28 (1,51-2,58)	28,52+/-0,86 (12-46)
C – 2844	60,32+/-27,95 (22,15-122,34)	2,15+/-0,51 (1,29-2,58)	9,06+/-7,28 (4-18)
C – 2845	212,78+/-37,21 (162,11-269,61)	3,95+/-0,40 (3,23-4,73)	19,48+/-5,06 (11-29)



O Quadro 13 apresenta os coeficientes de correlação entre os 9 indicadores ou variáveis originais (amplitudes máxima, mínima e a média do comprimento, largura e número de septos dos conídios dos isolados) com maiores índices de Valor de Importância) aos dois componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ), bem como as porcentagens de informações retida (% de variância) e acumulada. As variáveis foram ordenadas quanto à sua contribuição para os componentes  $Y_1$  e  $Y_2$ , o que reflete seu poder discriminatório em relação às amostragens, expresso pelo seu valor absoluto.

Para o primeiro componente principal ( $Y_1$ ), as variáveis foram ordenadas de acordo com a variação do poder discriminatório. Neste caso, a variável com o maior poder discriminatório, para separar os isolados em grupos, foi o comprimento (médio, máximo e mínimo), seguidos pelo número de septos e, por último, pela largura.

Para o segundo componente principal ( $Y_2$ ), observou-se que a largura (mínima, média e máxima), seguidos pelo comprimento e número de septos, apresentaram, em ordem decrescente, maior poder discriminatório com 11,31% de valor da informação retida por este componente. A informação acumulada pelos dois primeiros componentes principais foi de 89,07%.

Quadro 13. Correlações entre as variáveis originais referentes à avaliação para o comprimento, largura e número de septos de 21 isolados de *C. coffeicola* aos dois componentes principais,  $Y_1$  e  $Y_2$ , a ordenação (ord.) das variáveis quanto ao seu poder discriminatório e porcentagem de informação retida e acumulada em  $Y_1$  e  $Y_2$ .

<b>Variáveis originais</b>	<b><math>Y_1</math> (ord.)</b>	<b><math>Y_2</math> (ord.)</b>
Comprimento médio dos conídios	0,9754 (1)	0,0935 (4)
Comprimento máximo dos conídios	0,9697 (2)	-0,0872 (6)
Comprimento mínimo dos conídios	0,9659 (3)	-0,0406 (5)
Largura média dos conídios	0,7610 (7)	0,3758 (3)
Largura máxima dos conídios	0,8733 (5)	0,3859 (2)
Largura mínima dos conídios	0,6926 (9)	0,5170 (1)
Nº médio de septos dos conídios	0,8447 (6)	-0,4233 (8)
Nº máximo de septos dos conídios	0,9042 (4)	-0,3586 (7)
Nº mínimo de septos dos conídios	0,7443 (8)	-0,5844 (9)
Informação Retida (%)	77,76	11,31
Informação Acumulada (%)	77,76	89,07

A dispersão gráfica das 21 amostras (Figura 3) utilizando-se os componentes principais  $Y_1$  e  $Y_2$ , mostra, à semelhança do dendrograma (Figura 2); uma distribuição seqüencial das amostragens. As amostragens do  $G_1$  se caracterizam por apresentar valores mínimos do comprimento, largura e número de septos dos conídios dos isolados. O  $G_2$  apresenta valores intermediários das variáveis em relação aos outros grupos. O  $G_3$  agrupa os isolados de maiores valores. De um modo geral, os grupos se dispersam no gráfico seqüencialmente, em sentido crescente em relação ao eixo  $Y_1$ , formando três grupos consideravelmente distintos entre si. Assim sendo, o isolado C-2751-2, encontra-se no extremo negativo do eixo  $Y_1$ , pois possui o menor valor de comprimento, e o isolado G2845 localiza-se no extremo positivo do eixo, pois possui o maior valor.

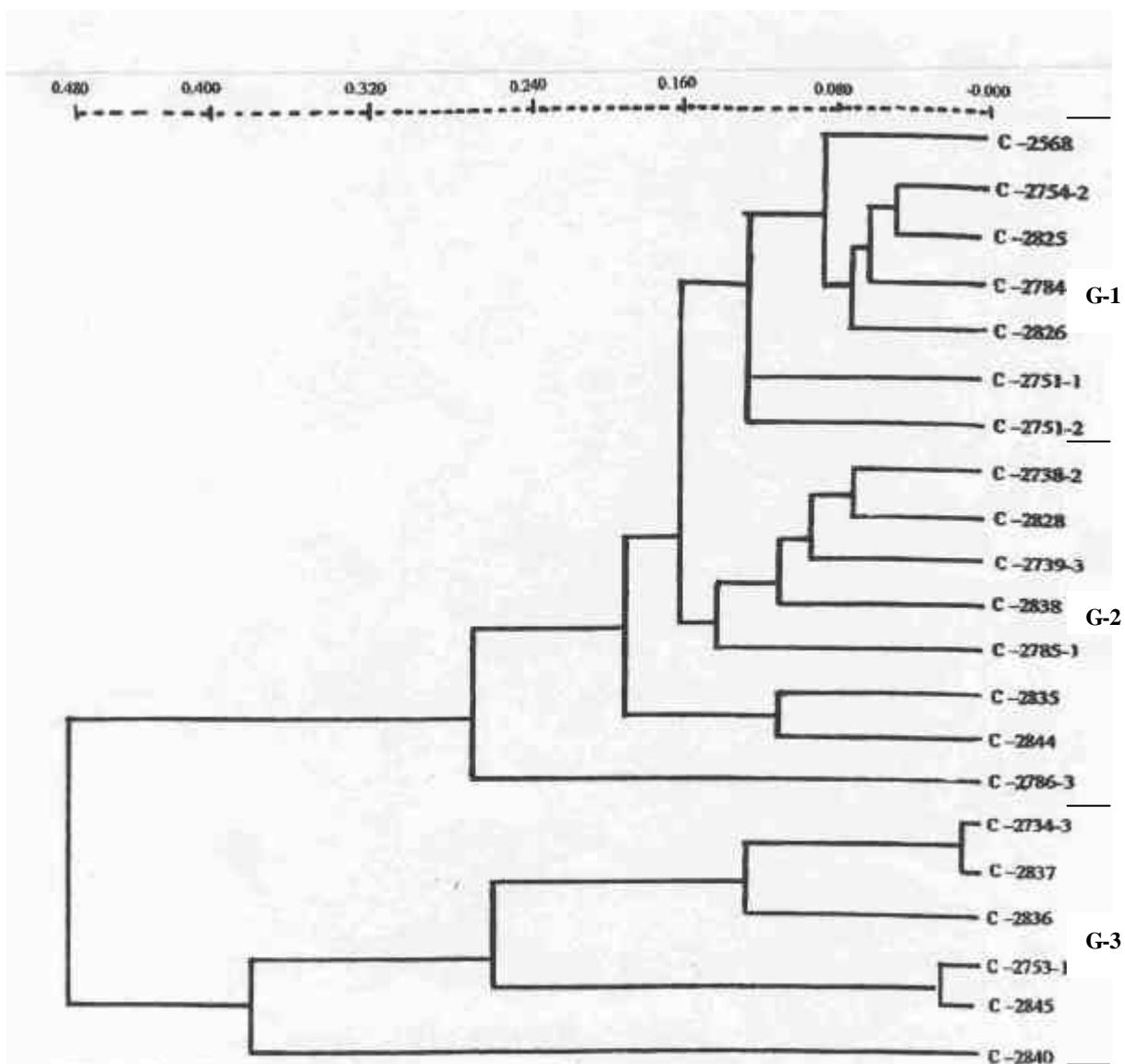


Figura 2. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento das mensurações dos conídios de isolados de *C. coffeicola*, utilizando-se a Distância Euclidiana Média.

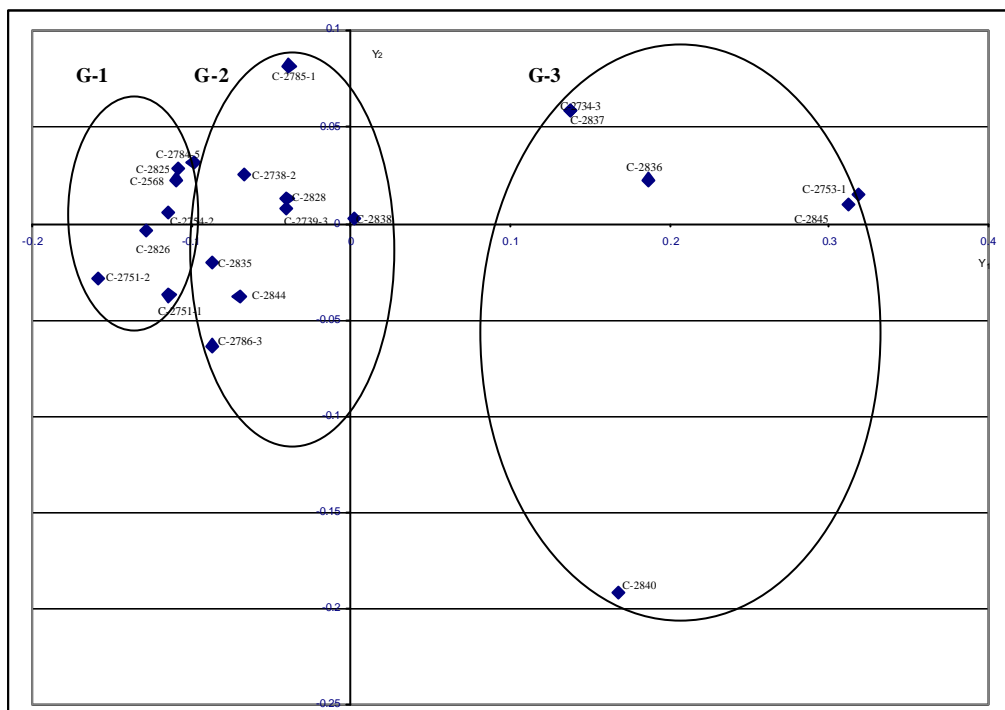


Figura 3. Dispersão gráfica dos 21 isolados de *C. coffeicola*, caracterizados quanto ao fator morfológico, utilizando-se os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ).

## 6.2. Meios de cultura para a esporulação do fungo

Os resultados obtidos da esporulação de 11 isolados de *C. coffeicola*, em quatro meios de cultura (V-8, meio de cenoura, pó de café ágar e extrato de folha de café), são apresentados nos Quadros 14 a 18 e Figura 4.

Os resultados das três épocas de avaliação (7, 10 e 14 dias após o plaqueamento) da esporulação do fungo, em quatro meios de cultura foram avaliados, separadamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. A maior esporulação dos isolados ocorreu aos 10 dias (2ª avaliação), em todos os meios de cultura.

Para se verificar o pico de esporulação dos isolados de *C. coffeicola*, realizou-se a análise estatística, utilizando-se o teste de Tukey a 5%, considerando-se as médias finais dos isolados, nos respectivos períodos de avaliação como sendo as repetições, razão pela qual as médias obtidas nas avaliações diferenciaram das médias obtidas no Quadro 14.

Com base nos resultados mostrados no Quadro 15, constatou-se que, entre os meios testados, o V-8 proporcionou maior esporulação do fungo.

Quadro 14. Produção média de conídios por onze isolados de *C. coffeicola*, avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias), em quatro meios de cultura.

Meios de cultura	Conídios produzidos ( $\times 10^4$ mL) nas avaliações			DMS (Tukey 5%)	CV(%)
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>		
<b>V-8</b>	11,29 B <sup>(1)</sup>	26,32 A	6,50 C	4,25	49,30
<b>CDA</b>	16,01 A	15,45 A	11,07 B	3,18	38,32
<b>EPCA</b>	21,76 A	18,98 A	7,06 B	4,02	43,09
<b>EFCA</b>	4,30 B	9,81 A	8,56 A	3,18	38,32

<sup>(1)</sup> Na linha, médias, seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

- V-8 – meio de V-8; CDA- meio de cenoura-ágar; ECA – meio de pó de café agar; EFCA – meio de extrato de folhas de café.

Os resultados da influência dos meios de cultura sobre a esporulação dos onze isolados encontram-se nos Quadros 15 a 18. No meio de V-8, o isolado mais esporulante, em média, foi o C-2738-2 ( $21,75 \times 10^4$  conídios/mL) e os menos esporulantes foram os C-2837 ( $10,69 \times 10^4$  conídios/mL) e C-2568 ( $10,47 \times 10^4$  conídios/mL) (Quadro 15). No meio de cenoura (Quadro 16) o isolado mais esporulante foi o C-2842 ( $20,38 \times 10^4$  conídios/mL) e os menos esporulantes foram C-2837 ( $11,08 \times 10^4$  conídios/mL) e C-2836 ( $11,36 \times 10^4$  conídios/mL). No meio de pó de café agar, o isolado C-2825 ( $22,03 \times 10^4$  conídios/mL) foi o que mais produziu esporos e o C-2842 ( $10,72 \times 10^4$  conídios/mL) menos esporulante (Quadro 17.). No Quadro 18

(meio de folha de café) observou-se que os isolados C-2568, C-2825 e C-2828, com médias de  $10,61 \times 10^4$  conídios/mL,  $10,36 \times 10^4$  conídios/mL e  $8,11 \times 10^4$  conídios/mL, respectivamente, foram os mais esporulantes enquanto que o isolado C-2837 apresentou média de  $4,86 \times 10^4$  conídios/mL.

Quadro 15. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de *C. coffeicola*, avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) no meio de V-8.

Isolados	Conídios produzidos ( $\times 10^4$ /mL) nas avaliações			Média
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	
C – 2568	4,58 fB	9,25 bB	17,58 cdA	<b>10,47 d</b>
C – 2734-2	36,00 aA	4,25 bB	8,25 deB	<b>16,16 abcd</b>
C – 2738-2	16,33 cdeB	2,75 bC	46,16 aA	<b>21,75 a</b>
C – 2751-2	32,83 abA	7,83 bB	4,16 eB	<b>14,94 bcd</b>
C – 2754-2	7,91 efC	28,41 aA	16,58 cdB	<b>17,63 abc</b>
C – 2784-5	7,91 efB	4,25 bB	26,16 bcA	<b>12,77 bcd</b>
C – 2825	22,66 bcA	7,00 bB	6,58 deB	<b>12,08 cd</b>
C – 2828	8,91 defB	23,33 aA	8,58 deB	<b>13,61 bcd</b>
C – 2836	18,75 cdeB	8,25 bC	29,33 bA	<b>18,77 ab</b>
C – 2837	8,91 defAB	6,50 bB	16,66 cdA	<b>10,69 d</b>
C – 2842	19,08 cdA	10,58 bA	10,16 deA	<b>13,27 bcd</b>
<b>Média</b>	<b>16,71 A</b>	<b>10,21 B</b>	<b>17,29 A</b>	

CV(%) = 27,64

- Na coluna e na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Quadro 16. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de *C. coffeicola*, avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) do meio de cenoura (CDA)

Isolados	Conídios produzidos ( $\times 10^4$ /mL) nas avaliações			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Média
<b>C – 2568</b>	8,83 deC	17,25 bB	21,16 bcA	<b>15,75 bc</b>
<b>C – 2734-2</b>	23,58 aA	11,08 cdC	15,25 defB	<b>16,63 b</b>
<b>C – 2738-2</b>	9,08 deB	7,75 deB	19,00 bcdA	<b>11,94 ef</b>
<b>C – 2751-2</b>	11,33 cdB	14,00 bcAB	16,66 deA	<b>14,00 cde</b>
<b>C – 2754-2</b>	5,66 eB	18,16 abA	18,83 cdA	<b>14,22 bcde</b>
<b>C – 2784-5</b>	11,16 cdB	9,16 deB	15,25 defA	<b>11,86 ef</b>
<b>C – 2825</b>	15,50 bcA	8,83 deB	14,08 efA	<b>12,80 def</b>
<b>C – 2828</b>	5,66 eC	11,16 cdB	29,00 aA	<b>15,27 bcd</b>
<b>C – 2836</b>	15,08 bcA	7,50 deB	11,50 fA	<b>11,36 f</b>
<b>C – 2837</b>	15,91 bA	5,83 eC	11,50 fB	<b>11,08 f</b>
<b>C – 2842</b>	16,00 bB	21,91 aA	23,50 bA	<b>20,38 a</b>
<b>Média</b>	<b>12,53 B</b>	<b>12,06 B</b>	<b>17,72 A</b>	

CV(%) = 11,36

Na coluna e na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Quadro 17. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de *C. coffeicola*, avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) do meio de pó de café (EPCA)

Isolados	Conídios produzidos ( $\times 10^4$ /mL) nas avaliações			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Média
<b>C – 2568</b>	12,16 deC	24,25 bA	19,16 bcdB	<b>18,52 b</b>
<b>C – 2734-2</b>	17,41 bcdB	38,08 Aa	7,25 fgC	<b>20,91 ab</b>
<b>C – 2738-2</b>	15,83 cdB	5,66 eC	23,83 abA	<b>15,11 c</b>
<b>C – 2751-2</b>	29,08 aA	17,00 cdB	10,91 efC	<b>19,00 ab</b>
<b>C – 2754-2</b>	5,83 fC	15,50 dB	21,08 abcA	<b>14,13 cd</b>
<b>C – 2784-5</b>	13,91 cdB	5,00 eC	25,66 aA	<b>14,86 cd</b>
<b>C – 2825</b>	22,19 bB	41,16 aA	2,75 gC	<b>22,03 a</b>
<b>C – 2828</b>	7,16 efB	13,08 dA	14,41 deA	<b>11,55 de</b>
<b>C – 2836</b>	18,66 bcA	11,91 dB	14,50 deAB	<b>15,02 c</b>
<b>C – 2837</b>	18,08 bcA	2,50 eB	16,50 cdeA	<b>12,36 cde</b>
<b>C – 2842</b>	6,75 efB	22,25 bcA	3,16 gB	<b>10,72 e</b>
<b>Média</b>	<b>15,19 B</b>	<b>17,85 A</b>	<b>14,47 B</b>	

CV(%) = 13,33

Na coluna e na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Quadro 18. Médias de conídios produzidos por 11 isolados de *C. coffeicola*, avaliados em três épocas (7, 10 e 14 dias) do meio de extrato de folhas de café-ágar (EFCA).

Isolados	Conídios produzidos ( $\times 10^4$ /mL) nas avaliações			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Média
<b>C – 2568</b>	12,41 abA	13,91 aA	5,50 cdB	<b>10,61 a</b>
<b>C – 2734-2</b>	9,50 cA	2,58 fB	3,25 deB	<b>5,11 cd</b>
<b>C – 2738-2</b>	4,41 dC	8,00 cdeB	11,83 aA	<b>8,08 b</b>
<b>C – 2751-2</b>	11,33 abcA	6,91 deB	2,83 deC	<b>7,02 b</b>
<b>C – 2754-2</b>	13,50 aA	8,41 cdeB	1,53 eC	<b>7,81 b</b>
<b>C – 2784-5</b>	6,58 dB	11,66 abA	5,00 cdB	<b>7,75 b</b>
<b>C – 2825</b>	11,33 abcA	8,91 cdB	10,83 aAB	<b>10,36 a</b>
<b>C – 2828</b>	12,41 abA	10,00 bcB	1,91 eC	<b>8,11 b</b>
<b>C – 2836</b>	5,00 dB	6,33 deB	9,25 abA	<b>6,86 b</b>
<b>C – 2837</b>	1,33 eB	6,16 eA	7,08 bcA	<b>4,86 d</b>
<b>C – 2842</b>	9,91 bcA	2,91 fC	6,91 bcB	<b>6,58 bc</b>
<b>Média</b>	<b>8,88 A</b>	<b>7,80 B</b>	<b>5,99 C</b>	

CV(%) = 13,33

Na coluna e na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

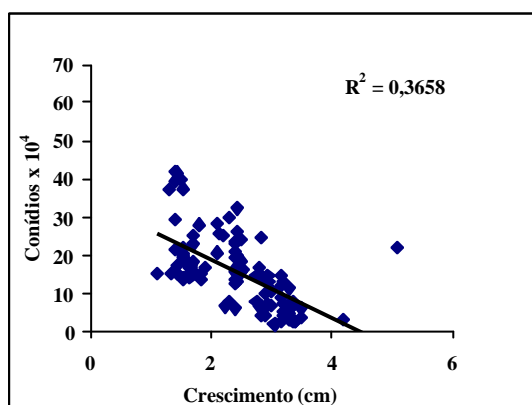
Examinando-se a Figura 4, observa-se que não houve correlação entre o crescimento micelial dos isolados e a produção de conídios. Esta informação pode ser constatada através dos valores de  $R^2$  (Coeficiente de Determinação), que variaram de 0,0032 a 0,3658. Para que a correlação fosse significativa, estes valores deveriam estar acima de 0,80.

Na Figura 4-1., observou-se que existiu uma forte tendência de queda na produção dos conídios com o crescimento micelial do fungo. No meio de folha de café (Figura 4-2), constatou-se que tendência para um pequeno aumento na esporulação dos isolados foi crescente até um determinado ponto, aproximadamente 3,0 cm de diâmetro, a partir do qual ocorreu uma estabilização na produção de conídios. Os isolados cultivados em meio de cenoura apresentaram uma tendência de pequena queda na esporulação (Figura 4-3) de acordo com o aumento do diâmetro da colônia. Quando as colônias atingiram aproximadamente 2,00cm de

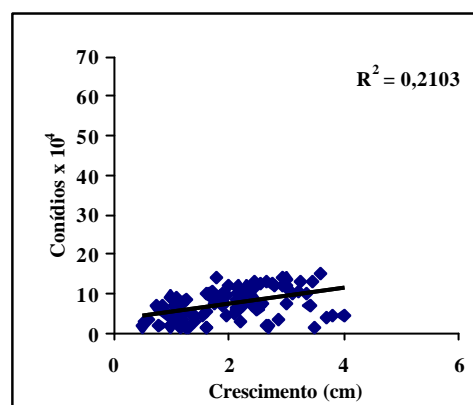


diâmetro alguns isolados apresentaram alta esporulação no meio de V-8 e depois não mantiveram o mesmo nível (Figura 4.4).

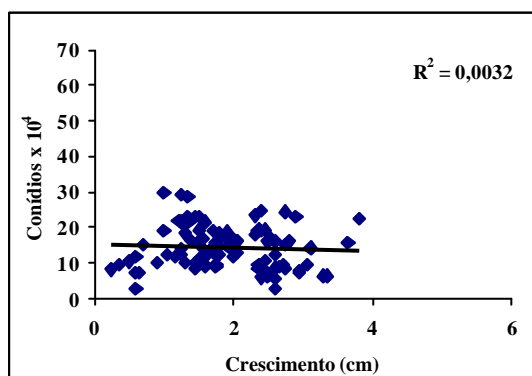
1)



2)



3)



4)

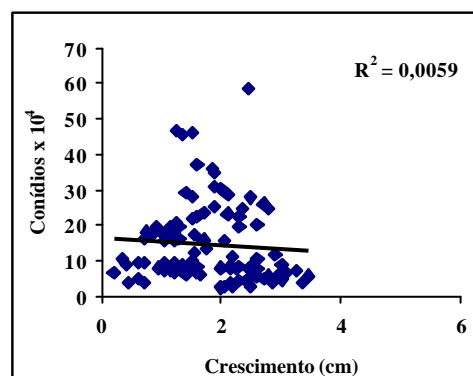


Figura 4. Correlação entre o crescimento da colônia e a quantidade de conídios ( $\times 10^4$  conídios/mL) de onze isolados de *C. coffeicola* nos meios de cultura: Pó de café (1), Folha de café (2), meio de cenoura (3) e meio de V-8 (4).

### 6.3. Teste de patogenicidade

Os resultados das cinco avaliações do teste de patogenicidade (Área foliar lesionada), de 49 isolados, encontram-se no Quadro 19. A Figura 5 ilustra a severidade dos isolados na mesma época de avaliação. Os resultados da utilização do método multivariado de análise estatística são apresentados no Quadro 20 e nas Figuras 6 e 7. A Análise de Agrupamento é apresentada na forma de dendrograma (Figura 7), onde é mostrada a constituição de três principais grupos.

O grupo 1 ( $G_1$ ) abrange dez isolados: C-2568, C-2751-1, C-2825, C-2734-3, C-2835, C-2826, C-2838, C-2837, C-2830 e C-2844. Estes isolados foram agrupados pelas características similares quanto à patogenicidade, onde o grau de severidade foi intermediária aos dois outros grupos, mas apresentando sintomas desde a primeira avaliação, realizada aos 12 dias após a inoculação. Neste grupo, as médias das notas da área foliar lesionada variaram de 0,00 a 0,33 (1ª avaliação), de 0,33 a 1,66 (2ª e 3ª avaliação), de 1,33 a 3,00 (4ª avaliação) e 2,33 a 3,00 (5ª avaliação).

Os 32 isolados do grupo 2 ( $G_2$ ) apresentaram dois comportamentos distintos, sendo que dezesseis dos isolados não foram patogênicos: C-2579, C-2581-B, C-2583-B, C-2584, C-2585, C-2738-1, C-2739-1, C-2739-3, C-2753-3, C-2754-3, C-2783-5, C-2784-2, C-2784-3, C-2784-4, C-2785-4 e C-2824. Os quinze isolados restantes apresentaram índice inferior de área foliar lesionada, em relação ao grupo 2, e os sintomas foram evidenciados a partir da segunda avaliação (19º dia após a inoculação).

O grupo 3 ( $G_3$ ), constituído pelos isolados: C-2828 (Pirajú - SP), C-2845 (Guarantã - SP), C - 2829 (Ourinhos - SP), C - 2836 (Marília - SP), C-2843 (Guarantã - SP), C-2842 (Álvaro de Carvalho - SP), apresentaram maior severidade em relação aos outros

dois. As médias das notas da área foliar lesionada foram: 0,33-1,00 (1ªavaliação), 1,66-3,66 (2ªavaliação), 2,00-5,00 (3ªavaliação), 3,66-5,33 (4ªavaliação) e a 4,33-5,33 (5ªavaliação). O coeficiente de correlação cofenético foi 0,89, evidenciando o bom ajuste da análise efetuada.

O quadro 20 apresenta os coeficientes de correlação entre os 5 indicadores ou variáveis originais (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª avaliações) com maiores índices de Valor de Importância aos dois componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ), bem como as porcentagens de informações retida (% de variância) e acumulada. As variáveis foram ordenadas quanto à sua contribuição para os componentes  $Y_1$  e  $Y_2$ , o que reflete seu poder discriminatório em relação às amostragens, expresso por seu valor absoluto.

Para o primeiro componente principal ( $Y_1$ ), as variáveis com maior poder discriminatório entre as amostragens, em ordem decrescente, estão: 4ªavaliação, 5ª avaliação, 3ª avaliação, 2ª avaliação e a 1ª avaliação. O componente principal  $Y_1$  foi responsável por 96,16% das informações contidas nas cinco variáveis analisadas.

Para o segundo componente principal ( $Y_2$ ), observa-se que as 2ª, 3ª, 5ª avaliações, apresentaram em ordem decrescente, maior poder discriminatório, sendo de 2,65% o valor da informação retida por este componente. A informação acumulada pelos dois primeiros componentes principais foi 98,81%.

A dispersão gráfica das 21 amostras (Figura 6), utilizando-se os componentes principais  $Y_1$  e  $Y_2$ , mostra, à semelhança do dendrograma (Figura 7), uma distribuição seqüencial das amostragens. As amostragens do G2 se caracterizam por apresentarem severidade intermediária aos dois grupos. No G1, 16 dos 32 isolados não se apresentaram patogênicos. Os isolados restantes foram inferiores na patogenicidade em relação a todos os isolados avaliados. Em G3, observa-se aumento progressivo dos valores de  $Y_1$ , o que

representa o aumento da severidade dos isolados, onde o isolado C-2842 foi o mais patogênico de todos.



**C-2568**



**C - 2734-2**



**C - 2844**



**C - 2842**

Figura 5. Folhas de café inoculadas com *C. coffeicola* e apresentando sintomas após 33 dias de inoculação (4ª avaliação).

Quadro 19. Severidade média de infecção de 49 isolados de *C. coffeicola*, em cinco épocas de avaliação

Isolados	Severidade				
	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação	4ª Avaliação	5ª Avaliação
C – 2568	0,33 <sup>a</sup>	0,33	0,33	2,00	2,33
C – 2579	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2579-1	0,00	0,33	0,33	1,33	1,66
C – 2581-B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2583-B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2584	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2585	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2734-2	0,33	1,00	1,00	1,00	1,00
C – 2734-3	0,00	1,00	2,00	2,66	3,66
C – 2738-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2738-2	0,33	0,33	0,33	1,00	1,00
C – 2739-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2739-2	0,00	0,33	0,33	1,00	1,00
C – 2739-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2751-1	0,33	0,66	0,66	1,33	2,66
C – 2751-2	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
C – 2751-c	0,00	0,66	1,33	1,33	1,66
C – 2753-1	0,00	0,66	1,00	1,00	1,33
C – 2753-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2754-2	0,33	0,66	0,66	1,00	1,00
C – 2754-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2783-1	0,00	0,00	0,33	1,00	1,00
C – 2783-5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2784-2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2784-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2784-4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2784-5	0,33	0,33	0,33	0,66	0,66
C – 2785-1	0,00	0,00	0,33	0,33	0,33
C – 2785-3	0,00	0,33	0,33	0,66	0,66
C – 2785-4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2786-3	0,33	0,33	0,33	1,00	1,00
C – 2787	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
C – 2824	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C – 2825	0,33	0,66	0,66	1,66	2,33
C – 2826	0,33	1,33	1,66	2,33	2,66
C – 2828	0,66	3,00	3,33	4,33	5,00
C – 2829	1,00	2,00	2,66	4,33	5,00
C – 2830	0,00	1,33	1,66	2,66	3,00
C – 2834	0,00	0,33	0,33	1,00	1,33
C – 2835	0,33	1,00	2,33	3,33	3,66
C – 2836	0,66	1,66	2,00	4,66	5,00
C – 2837	0,33	1,33	1,66	1,66	2,66
C – 2838	0,33	0,66	1,66	2,33	2,66
C – 2840	0,00	0,33	0,33	0,33	0,66
C – 2841	0,00	0,33	0,66	0,66	0,66
C – 2842	0,66	3,66	5,00	5,33	5,33
C – 2843	0,66	1,66	2,00	4,33	4,33
C – 2844	0,33	1,66	1,66	3,00	3,00
C – 2845	0,33	2,33	3,00	3,66	4,33
<b>Testemunha</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<sup>a</sup> Média de três repetições. Nota: (0- sem sintoma; 1 – até 6%; 2 – de 6,1 a 12%; 3- de 12,1 a 18%; 4 – 18,1 a 25%; 5 – 25,1 a 50%; 6 – acima de 50% de área foliar lesionada ou folha caída.

Quadro 20. Correlações entre as variáveis originais das avaliações da patogenicidade dos 49 isolados de *C. coffeicola* aos dois componentes principais  $Y_1$  e  $Y_2$ , a ordenação (ord.) das variáveis quanto ao seu poder discriminatório e porcentagem de informação retida e acumulada em  $Y_1$  e  $Y_2$ .

Variáveis originais	$Y_1$ (ord.)	$Y_2$ (ord.)
1ª Avaliação	0,8053 (5)	-0,0931 (4)
2ª Avaliação	0,9494 (4)	0,2704 (1)
3ª Avaliação	0,9583 (3)	0,2697 (2)
4ª Avaliação	0,9928 (1)	-0,0731 (5)
5ª Avaliação	0,9910 (2)	-0,1136 (3)
Informação Retida (%)	96,16	2,65
Informação Acumulada (%)	96,16	98,81

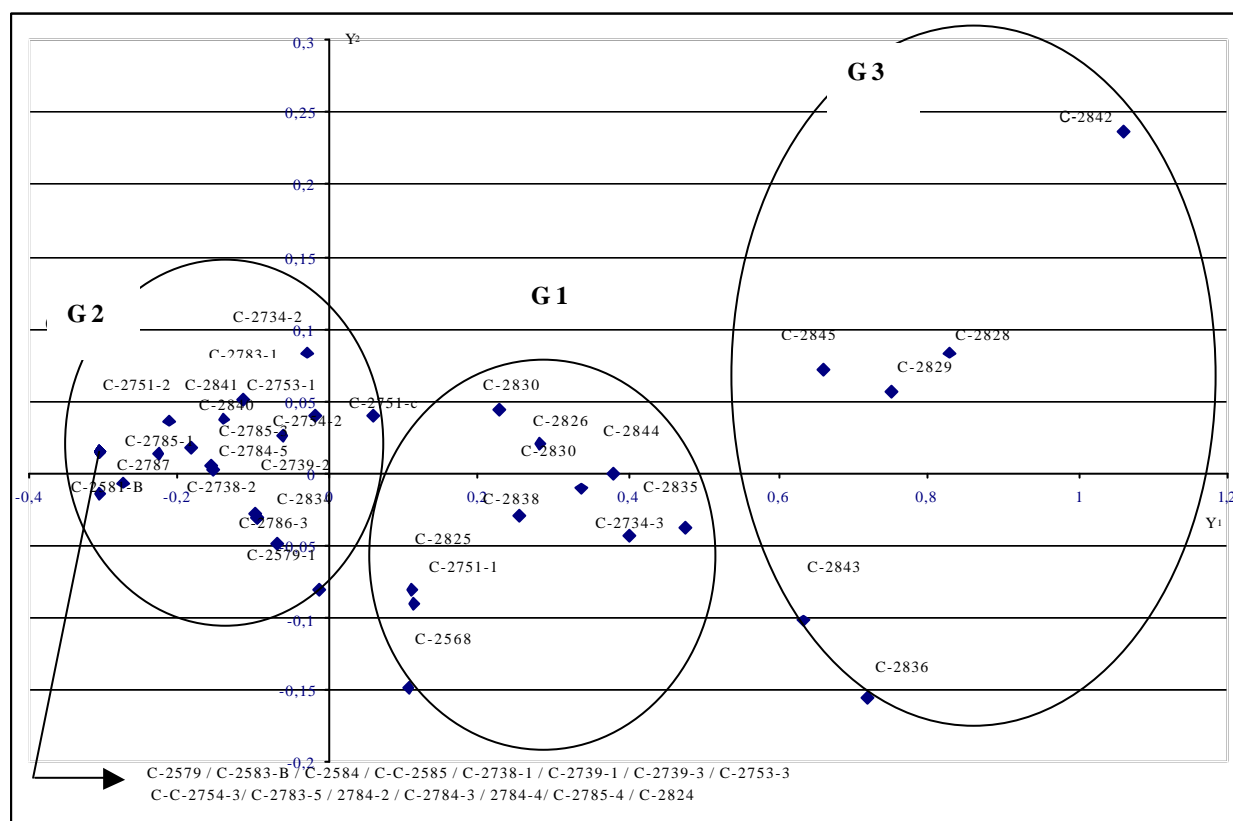


Figura 6 Dispersão gráfica dos 49 isolados de *C. coffeicola*, caracterizados quanto à patogenicidade, utilizando-se os dois componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ).

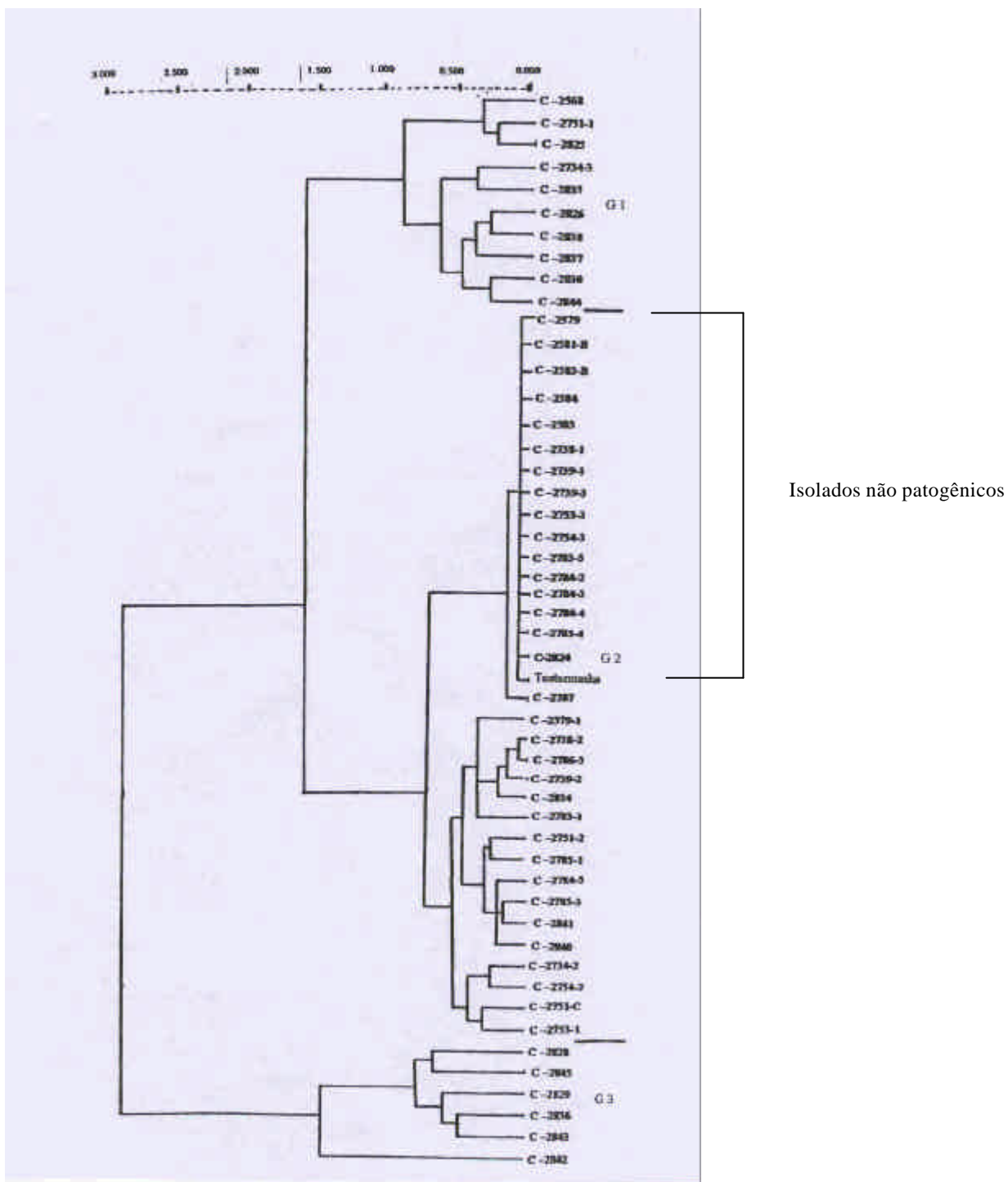


Figura 7. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das similaridades obtidas pelos isolados de *C. coffeicola* avaliados na caracterização patogênica

#### 6.4. Caracterização dos isolados de *C. coffeicola* por marcadores molculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Os dezoito isolados de *Cercospora coffeicola* foram caracterizados individualmente, na tentativa de se identificar a variabilidade existente entre eles. O isolado C-2568 foi o único caracterizado em duplicidade, com a finalidade de proporcionar garantia de que o método é confiável.

Antes da realização do RAPD quantificou-se a qualidade do DNA dos isolados no GenQuant (Pharmacia), onde foi lida a razão de  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , a qual estava entre 1,72 e 1,83, indicando que estes estavam livres de proteínas e carboidratos (Quadro 21.).

Quadro 21. Concentrações de DNA e suas respectivas razões obtidas no aparelho Genquant

Identificação do Isolado	Concentração do DNA/RNA	Razão
C-2568	7.6	1.74
C-2568	7.9	1.75
C-2579-1	3.9	1.70
C-2734-3	8	1.74
C-2738-2	8.4	1.76
C-2739-2	4.2	1.72
C-2751-C	4.2	1.75
C-2751-1	5.3	1.76
C-2754-3	5.9	1.76
C-2756-3	0.6	1.74
C-2784-5	5.8	1.78
C-2785-3	4.4	1.75
C-2826	2.6	1.83
C-2828	3.7	1.74
C-2829	6.3	1.77
C-2830	2.4	1.76
C-2824	3.5	1.79
C-2835	3.7	1.83



As amostras de DNA dos 18 isolados foram amplificadas utilizando-se 7 "primers" aleatórios (OPG-04, OPG-09, OPG-13, OPG-14, OPG-18, OPP-05, OPP-19), que produziram bandas polimórficas de DNA, por "primer", para cada isolado. As Figura 9 e 10 ilustram um padrão típico de amplificação pelos "primers" OPG-04 e OPG-13, respectivamente. As bandas mais intensas e consistentes foram consideradas nos estudos de similaridade, gerando a matriz de distância genética (Quadro19), que foi utilizada para a elaboração do dendrograma (Figura 8).

O dendrograma mostra claramente que os isolados foram agrupados em quatro grupos distintos.

Os coeficientes de similaridade, obtidos através da análise de diferentes padrões de bandas, para cada par combinado de isolados mostram valores que variam em torno de 40 a 100% de similaridade (Figura 8).

O valor de 70% de similaridade separa os isolados em quatro grupos: Grupo 1 composto pelos isolados: C-2568, C-2579-1, C-2830, C-2751-1, C-2829, C-2835, C-2826, C-2824, C-2825; Grupo 2: C-2738-2, C-2751-C, C-2828, C-2739-2, C-2784-5, C-2785-3; Grupo 3: C-2754-3 e C-2756-3 e o Grupo 4.

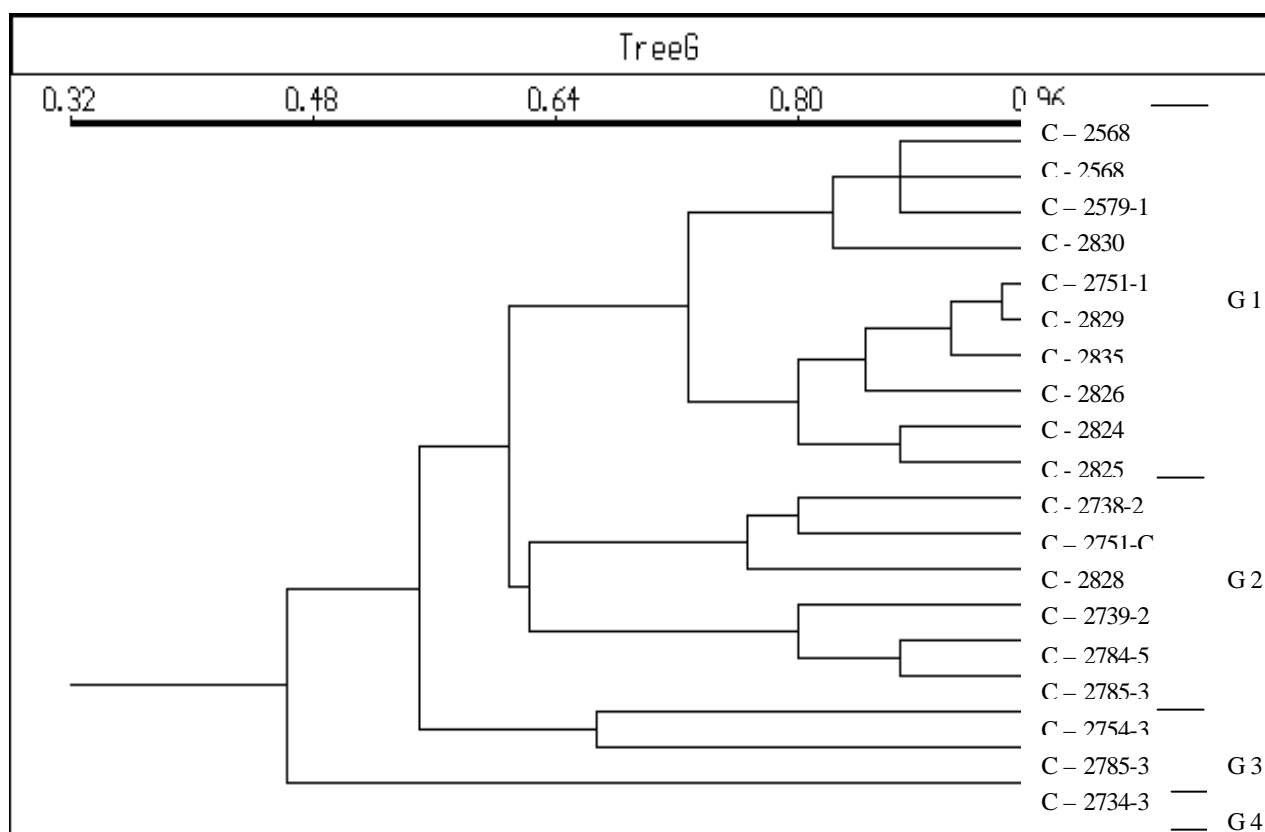


Figura 8. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD, em análise dos 18 isolados de *C. coffeicola*.

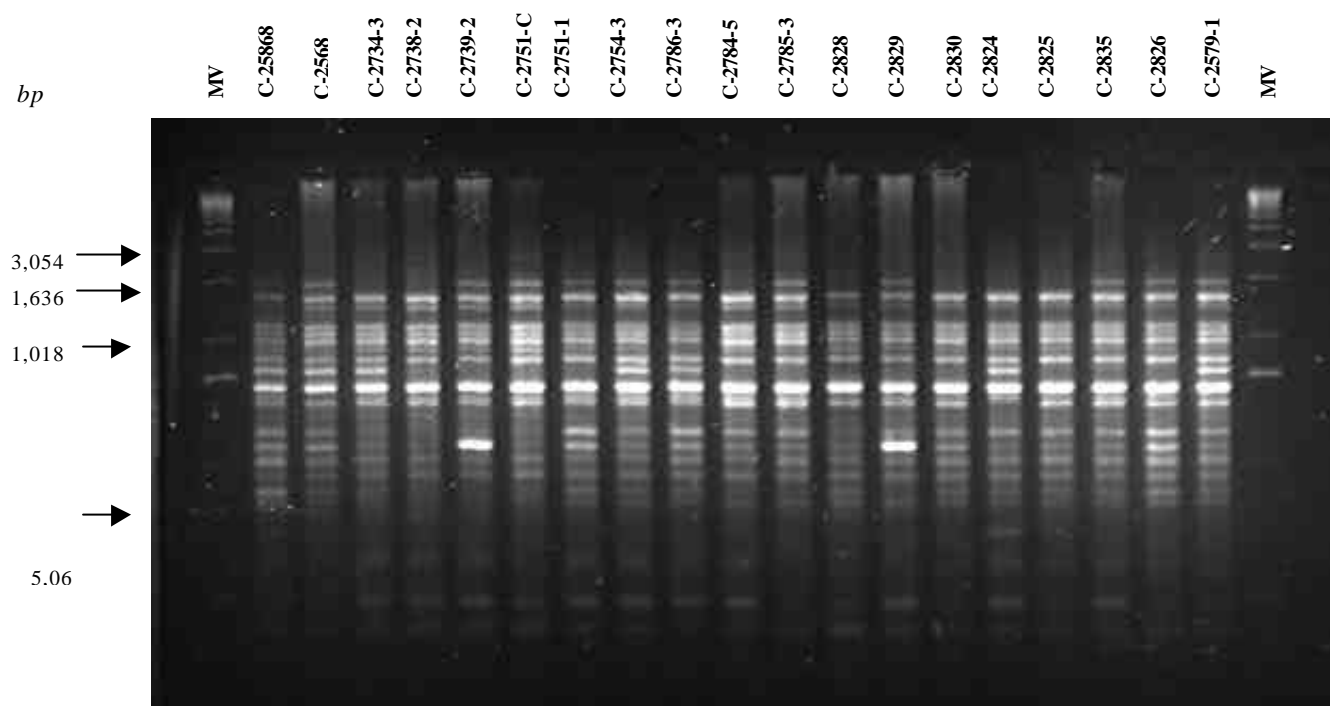


Figura 9. Padrão gerado pelo polimorfismos das bandas de DNA amplificado ao acaso com Primer OPG-04 , entre os isolados de *C. coffeicola*. MV =marcado molecular Ladder 1Kb

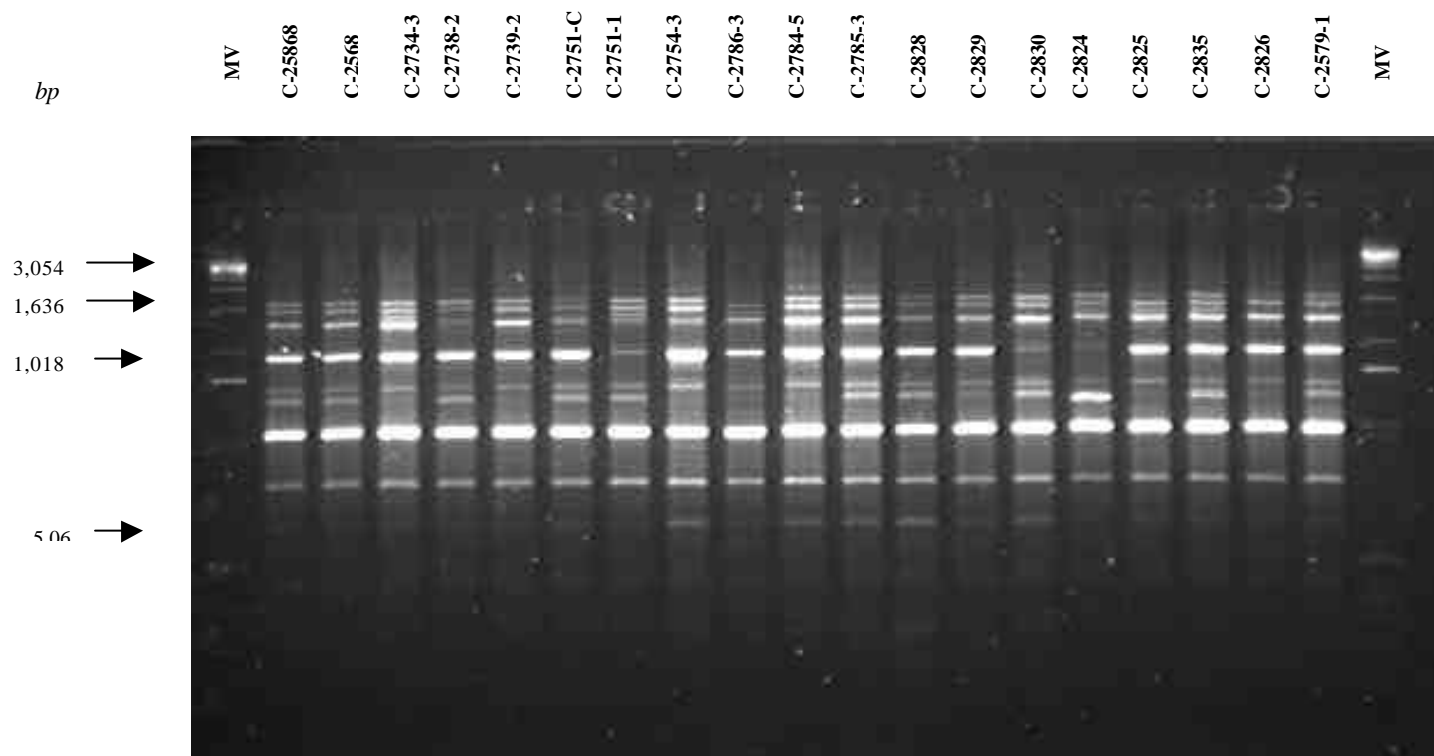


Figura 10. Padrão gerado pelo polimorfismos das bandas de DNA amplificado ao acaso com Primer OPG-13, entre os isolados de *C. coffeicola*. MV =marcado molecular Ladder 1Kb

Quadro 22 Matriz gerada pelo programa NTSYS 1.5 referente ao RAPD dos isolados de *Cercospora coffeicola* .

C-2568	C-2568	C-2734-3	C-2738-2	C-2739-2	C-2751-C	C-2751-1	C2754-3	C-2786-3	C-27845	C-27853	C-2828	C-2829	C-2830	C-2824	C-2825	C-2835	C-2826	C-25791
1.0000000																		
0.8666667	1.0000000																	
0.4666667	0.4666667	1.0000000																
0.7333333	0.6000000	0.6000000	1.0000000															
0.5333333	0.6666667	0.6666667	0.6666667	1.0000000														
0.6666667	0.6666667	0.5333333	0.8000000	0.7333333	1.0000000													
0.6666667	0.8000000	0.4000000	0.5333333	0.6000000	0.6000000	1.0000000												
0.6000000	0.7333333	0.4666667	0.3333333	0.5333333	0.4000000	0.6666667	1.0000000											
0.5333333	0.6666667	0.5333333	0.2666667	0.4666667	0.4666667	0.6000000	0.6666667	1.0000000										
0.7333333	0.7333333	0.6000000	0.6000000	0.8000000	0.6666667	0.6666667	0.6000000	0.5333333	1.0000000									
0.6000000	0.7333333	0.4666667	0.4666667	0.8000000	0.6666667	0.6666667	0.6000000	0.5333333	0.8666667	1.0000000								
0.6666667	0.6666667	0.5333333	0.8000000	0.6000000	0.7333333	0.7333333	0.5333333	0.3333333	0.6666667	0.5333333	1.0000000							
0.7333333	0.8666667	0.3333333	0.6000000	0.6666667	0.6666667	0.9333333	0.7333333	0.5333333	0.7333333	0.7333333	0.8000000	1.0000000						
0.8666667	0.7333333	0.3333333	0.7333333	0.5333333	0.6666667	0.8000000	0.6000000	0.4000000	0.7333333	0.6000000	0.8000000	0.8666667	1.0000000					
0.7333333	0.7333333	0.4666667	0.4666667	0.4000000	0.4000000	0.8000000	0.6000000	0.5333333	0.6000000	0.4666667	0.6666667	0.7333333	0.7333333	1.0000000				
0.6000000	0.6000000	0.4666667	0.4666667	0.4000000	0.4000000	0.8000000	0.6000000	0.5333333	0.6000000	0.4666667	0.6666667	0.7333333	0.7333333	0.8666667	1.0000000			
0.6000000	0.7333333	0.3333333	0.4666667	0.5333333	0.5333333	0.9333333	0.6000000	0.5333333	0.6000000	0.6000000	0.6666667	0.8666667	0.7333333	0.8666667	0.8666667	1.0000000		
0.6000000	0.7333333	0.3333333	0.4666667	0.5333333	0.5333333	0.8000000	0.7333333	0.5333333	0.6000000	0.6000000	0.6666667	0.8666667	0.7333333	0.7333333	0.8666667	0.8666667	1.0000000	
0.8666667	0.8666667	0.3333333	0.6000000	0.5333333	0.6666667	0.8000000	0.7333333	0.5333333	0.6000000	0.6000000	0.6666667	0.8666667	0.8666667	0.7333333	0.6000000	0.7333333	0.7333333	1.0000000

## 6.5. Sensibilidade “in vitro” de sete isolados de *C. coffeicola* a oito fungicidas (Primeiro experimento)

As médias das três avaliações do crescimento micelial dos sete isolados, em meio de cultura, em doses crescentes de cada princípio ativo estão apresentados, separadamente, nos Quadros 23 a 30.

O propiconazole (Quadro 23) inibiu o crescimento de todos os isolados testados a partir das concentrações de 1 a 10 $\mu$ g/mL.

Os resultados referentes a sensibilidade, "in vitro", de sete isolados ao oxiclreto de cobre são apresentados no Quando 24. No geral, até 10 $\mu$ g/mL não houve diferença significativa com a testemunha, enquanto que as de 50 e 100 $\mu$ g/mL diferiram entre si e das demais doses. Todos os isolados avaliados não diferiram significativamente dentro das três avaliações, com exceção do isolado C-2579-1.

Para o benomyl (Quadro 25) os isolados C-2579-1, C-2734-3, C-2738-2 e C-2753-1 foram totalmente inibidos em todas as concentrações testadas, enquanto que os isolados C-2568, C-2739-3 e C-2754-2 apresentaram pequena inibição, mesmo a 100 $\mu$ g/mL.

Os resultados das avaliações da inibição promovida pelo chlorothalonil encontram-se no Quadro 26. Todos os isolados apresentaram significativa redução no crescimento micelial à medida que a sua concentração foi aumentada, com exceção dos isolados C-2568, C-2739-3 e C-2753-1. Os isolados C-2579-1 e C-2753-1 foram os únicos que não foram totalmente inibidos até a 50 $\mu$ g/mL.

Para o azoxystrobin (Quadro 27), as quatro concentrações usadas não inibiram significativamente o diâmetro das colônias dos isolados C-2568, C-2738-2 e C-2753-1 e não diferiu da testemunha. O isolado C-2734-3 foi totalmente inibido em todas as

concentrações testadas, enquanto que o isolado C-2739-3 foi inibido por completo apenas na concentração de 100µg/mL. Os isolados C-2568, C-2579-1 e C-2754-2 apresentaram diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos, sendo gradativamente inibidos com o aumento das concentrações, mas não por completo.

O efeito inibitório do chlorothalonil sobre o crescimento micelial de sete isolados é apresentado no Quadro 28. O isolado C-2734-3 foi o único totalmente inibido a 50 e 100µg/mL, enquanto que o C-2568, C-2579-1 e C-2739-3 não foram inibidos significativamente em relação a testemunha.

Para metalaxyl-mancozeb (Quadro 29), verifica-se redução no crescimento micelial em concentrações mais altas, principalmente a 50 e 100µg/mL.

O efeito do tebuconazole reduziu muito o crescimento micelial de todos os isolados a partir de 1µg/mL e a 50µg/mL, os isolados C-2579-1, C-2738-2, C-2739-3 e C-2754-2 foram completamente inibidos (Quadro 30). A 100µg/mL, todos os sete isolados não se desenvolveram.

Quadro 23. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de propiconazole e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (µg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
<b>C – 2568</b>	1 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,15 a</b>
	2 <sup>a</sup>	1,11 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,17 a</b>
	3 <sup>a</sup>	1,16	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,17 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,09 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
<b>C – 2579-1</b>	1 <sup>a</sup>	0,95 cA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,15 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,29 bA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,30 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,09 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,39 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,03 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
<b>C - 2734-3</b>	1 <sup>a</sup>	0,80 cA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,12 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,45 bA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,21 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,34 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,31 a</b>
	<b>Média</b>	<b>0,80 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
<b>C - 2738-2</b>	1 <sup>a</sup>	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,16 a</b>
	2 <sup>a</sup>	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,21 a</b>
	3 <sup>a</sup>	1,53	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,22 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,34 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
<b>0C - 2739-3</b>	1 <sup>a</sup>	1,00 cA	0,00 bB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,15 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,81 bA	0,03 bB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,37 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,48 aA	0,20 aB	0,00 aC	0,00 aC	0,00 Ac	<b>0,48 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>0,07 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
<b>C - 2753-1</b>	1 <sup>a</sup>	0,98 cA	0,00 cB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,55 a</b>
	2 <sup>a</sup>	2,58 bA	0,30 bB	0,00 aC	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,41 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,34 aA	0,62 aB	0,00 aC	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,15 c</b>
	<b>Média</b>	<b>2,20 A</b>	<b>0,29 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
<b>C - 2754-2</b>	1 <sup>a</sup>	0,92 cA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,14 a</b>
	2 <sup>a</sup>	2,18 bA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,29 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,38 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,95 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	

CV(%) = 5,40

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.



Quadro 24. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de oxiclreto de cobre e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento)

Isolados	Épocas de Avaliação	Concentrações (µg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	2,23 <sup>a</sup>	2,46	2,04	1,44	1,41	<b>1,90 c</b>
	2 <sup>a</sup>	3,22 <sup>b</sup>	3,66	2,88	2,13	1,92	<b>2,73 b</b>
	3 <sup>a</sup>	4,42	5,01	3,93	2,78	2,65	<b>3,71 a</b>
	<b>Média</b>	<b>3,24 AB</b>	<b>3,64 A</b>	<b>2,91 B</b>	<b>2,09 C</b>	<b>1,97 C</b>	
C - 2579-1	1 <sup>a</sup>	1,99 <sup>cA</sup>	2,07 <sup>cA</sup>	2,08 <sup>cA</sup>	1,84 <sup>cA</sup>	0,00 <sup>cB</sup>	<b>1,47 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,92 <sup>bAB</sup>	3,10 <sup>bA</sup>	3,08 <sup>bA</sup>	2,73 <sup>bB</sup>	1,48 <sup>bC</sup>	<b>2,63 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,78 <sup>aAB</sup>	3,98 <sup>aAB</sup>	4,04 <sup>aA</sup>	3,85 <sup>aAB</sup>	3,66 <sup>aB</sup>	<b>3,86 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,86 AB</b>	<b>3,01 A</b>	<b>3,02 A</b>	<b>2,76 B</b>	<b>1,41 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,91	2,12	2,07	2,01	2,04	<b>2,03 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,77	2,95	2,87	2,82	2,69	<b>2,82 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,77	4,07	3,81	3,74	3,91	<b>3,86 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,77 A</b>	<b>3,00 A</b>	<b>2,88 A</b>	<b>2,82 A</b>	<b>2,84 A</b>	
C - 2738-2	1 <sup>a</sup>	2,20	2,13	1,98	1,30	1,27	<b>1,77 c</b>
	2 <sup>a</sup>	3,10	3,06	3,00	2,98	2,40	<b>2,90 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,80	3,72	3,50	3,38	2,22	<b>3,32 a</b>
	<b>Média</b>	<b>3,03 A</b>	<b>2,97 A</b>	<b>2,82 A</b>	<b>2,55 A</b>	<b>1,96 A</b>	
C - 2739-3	1 <sup>a</sup>	2,30	1,93	2,10	2,01	1,58	<b>1,98 c</b>
	2 <sup>a</sup>	3,16	3,09	3,46	3,07	2,43	<b>3,03 b</b>
	3 <sup>a</sup>	4,21	4,10	4,51	3,71	2,78	<b>3,84 a</b>
	<b>Média</b>	<b>3,18<sup>AB</sup></b>	<b>2,98 AB</b>	<b>3,29 A</b>	<b>2,89 B</b>	<b>2,24 C</b>	
C - 2753-1	1 <sup>a</sup>	2,14	2,32	2,14	2,43	1,47	<b>2,09 c</b>
	2 <sup>a</sup>	3,03	3,31	3,38	3,28	2,08	<b>3,00 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,97	4,38	4,54	4,52	2,89	<b>4,04 a</b>
	<b>Média</b>	<b>3,00 A</b>	<b>3,29 A</b>	<b>3,29 A</b>	<b>3,36 A</b>	<b>2,12 B</b>	
C - 2754-2	1 <sup>a</sup>	2,04	2,29	2,29	1,46	1,08	<b>1,81 c</b>
	2 <sup>a</sup>	3,04	3,13	3,41	2,54	1,70	<b>2,73 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,99	3,89	3,21	3,44	2,32	<b>3,54 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,98 A</b>	<b>3,08 A</b>	<b>3,26 A</b>	<b>2,42 B</b>	<b>1,67 C</b>	

CV(%) = 4,30

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 25. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de benomyl e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento).

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	1,47 <sup>a</sup>	1,19	1,24	1,02	1,33	1,24 c
	2 <sup>a</sup>	2,23 <sup>b</sup>	1,66	1,81	1,63	2,04	1,86 b
	3 <sup>a</sup>	3,74	3,11	3,21	2,96	3,57	3,31 a
	Média	<b>2,34 A</b>	<b>1,86 C</b>	<b>1,96 C</b>	<b>1,74 D</b>	<b>2,17 B</b>	
C - 2579-1	1 <sup>a</sup>	1,26 Ca	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,19 c
	2 <sup>a</sup>	2,08 bA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,28 b
	3 <sup>a</sup>	3,39 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,42 a
	Média	<b>2,17 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,74 cA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,24 c
	2 <sup>a</sup>	2,43 bA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,32 b
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,43 a
	Média	<b>2,51 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C - 2738-2	1 <sup>a</sup>	2,47 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,32 b
	2 <sup>a</sup>	3,37 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,42 a
	3 <sup>a</sup>	3,64 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,46 a
	Média	<b>3,14 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,02 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C - 2739-3	1 <sup>a</sup>	0,27 cB	1,21 bA	0,00 cB	1,20 bA	1,32 cA	0,73 c
	2 <sup>a</sup>	1,49 bB	1,72 bAB	1,79 bAB	1,64 bAB	2,24 bA	1,77 b
	3 <sup>a</sup>	3,92 aA	2,97 aB	2,95 aB	2,82 aB	2,93 aB	3,11 a
	Média	<b>1,64 BC</b>	<b>1,91 AB</b>	<b>1,35 C</b>	<b>1,84 AB</b>	<b>2,12 A</b>	
C - 2753-1	1 <sup>a</sup>	1,77 cA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,17 c
	2 <sup>a</sup>	2,53 bA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,21 b
	3 <sup>a</sup>	3,98 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,27 a
	Média	<b>2,63 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C - 2754-2	1 <sup>a</sup>	1,43 bA	1,11 cB	0,83 cC	0,79 cC	0,69 cC	0,96 c
	2 <sup>a</sup>	1,60 bA	1,55 bAB	1,29 bBC	1,34 bABC	1,24 Bc	1,40 b
	3 <sup>a</sup>	3,74 aA	2,59 aB	1,98 aD	2,02 aCD	2,35 aBC	2,51 a
	Média	<b>2,17 A</b>	<b>1,71 B</b>	<b>1,34 C</b>	<b>1,35 C</b>	<b>1,37 C</b>	

CV(%) = 5,07

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 26. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de chlorothalonil e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	1,76 <sup>a</sup>	1,61	0,74	0,00	0,00	<b>0,70 b</b>
	2 <sup>a</sup>	2,23 <sup>b</sup>	2,11	0,98	0,00	0,00	<b>0,89 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,20	3,02	1,38	0,00	0,00	<b>1,23 a</b>
	Média	<b>2,36 A</b>	<b>2,21 A</b>	<b>1,02 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2579-1	1 <sup>a</sup>	1,83 cA	1,77 cA	1,66 bA	0,10 aB	0,00 aB	<b>0,93 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,51 bA	2,39 bA	2,28 aA	0,28 aB	0,00 aC	<b>1,29 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,53 aA	3,40 aA	2,70 aB	0,21 aC	0,00 aC	<b>1,64 a</b>
	Média	<b>2,59 A</b>	<b>2,48 AB</b>	<b>2,20 B</b>	<b>0,20 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,61 bA	1,17 bAB	0,71 bB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,60 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,03 bA	1,66 bAB	1,20 bB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,83 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,84 aAB	3,47 aA	2,37 aB	0,00 aC	0,00 aC	<b>1,42 a</b>
	Média	<b>2,14 A</b>	<b>2,01 A</b>	<b>1,37 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2738-2	1 <sup>a</sup>	2,16 cA	1,62 cB	1,01 bC	0,00 aD	0,00 aD	<b>0,81 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,87 bA	2,54 bA	1,14 bB	0,00 aC	0,00 aC	<b>1,07 b</b>
	3 <sup>a</sup>	4,19 aA	3,51 aA	2,56 aB	0,00 aC	0,00 aC	<b>1,65 a</b>
	Média	<b>3,02 A</b>	<b>2,51 B</b>	<b>1,51 C</b>	<b>0,00 D</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2739-3	1 <sup>a</sup>	1,92	1,32	0,57	0,00	0,00	<b>0,64 a</b>
	2 <sup>a</sup>	2,59	1,74	0,58	0,00	0,00	<b>0,80 a</b>
	3 <sup>a</sup>	2,82	2,49	0,70	0,00	0,00	<b>0,97 a</b>
	Média	<b>2,43 A</b>	<b>1,83 A</b>	<b>0,62 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2753-1	1 <sup>a</sup>	1,80	1,81	0,47	0,00	0,00	<b>0,68 b</b>
	2 <sup>a</sup>	2,57	2,53	0,90	0,15	0,00	<b>1,03 a</b>
	3 <sup>a</sup>	3,73	2,38	1,55	0,24	0,00	<b>1,32 a</b>
	Média	<b>2,65 A</b>	<b>2,23 A</b>	<b>0,94 B</b>	<b>0,13 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2754-2	1 <sup>a</sup>	2,25 cA	1,74 cA	0,75 bB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,79 c</b>
	2 <sup>a</sup>	3,00 bA	2,32 bAB	1,61 aB	0,00 aC	0,00 aC	<b>1,14 b</b>
	3 <sup>a</sup>	4,30 aA	3,29 aB	1,71 aC	0,00 aD	0,00 aD	<b>1,48 a</b>
	Média	<b>3,14 A</b>	<b>2,42 B</b>	<b>1,33 C</b>	<b>0,00 D</b>	<b>0,00 D</b>	

CV(%) = 11,91

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 27. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de azoxystrobin e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	0,99 aA <sup>a</sup>	0,68 aA	0,24 bB	0,19 bB	0,20 aB	<b>0,44 b</b>
	2 <sup>a</sup>	1,11 aA <sup>b</sup>	0,77 aAB	0,45 abBC	0,64 aB	0,30 aC	<b>0,64 a</b>
	3 <sup>a</sup>	1,16 aA	0,54 aC	0,70 aBC	0,96 aAB	0,42 aC	<b>0,74 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,09 A</b>	<b>0,66 B</b>	<b>0,46 CD</b>	<b>0,57 BC</b>	<b>0,30 D</b>	
C - 2579-1	1 <sup>a</sup>	0,93 cA	0,34 bB	0,22 cB	0,30 bB	0,00 cB	<b>0,33 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,18 bA	0,46 bB	0,67 bB	0,81 aB	0,57 bB	<b>0,88 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	0,91 aB	0,91 aB	0,89 aB	0,71 aB	<b>1,63 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,95 A</b>	<b>0,56 C</b>	<b>0,58 BC</b>	<b>0,65 B</b>	<b>0,39 D</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	0,80 cA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,12 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,45 bA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,21 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,34 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,31 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,48 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C - 2738-2	1 <sup>a</sup>	1,05	0,58	0,44	0,17	0,23	<b>0,47 b</b>
	2 <sup>a</sup>	1,45	0,61	0,54	0,22	0,59	<b>0,65 a</b>
	3 <sup>a</sup>	1,53	0,63	0,64	0,27	0,87	<b>0,76 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,34 A</b>	<b>0,61 B</b>	<b>0,54 B</b>	<b>0,22 C</b>	<b>0,55 B</b>	
C - 2739-3	1 <sup>a</sup>	1,00 cA	0,20 bB	0,17 bB	0,00 cC	0,00 aC	<b>0,23 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,81 bA	0,30 abB	0,23 bB	0,33 bB	0,00 aC	<b>0,57 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,48 aA	0,40 aB	0,41 aB	0,60 aB	0,00 aC	<b>0,77 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>0,29 B</b>	<b>0,26 B</b>	<b>0,29 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2753-1	1 <sup>a</sup>	0,98	0,48	0,48	0,47	0,37	<b>0,55 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,58	1,26	1,10	1,33	0,71	<b>1,35 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,34	1,99	1,65	2,10	1,36	<b>2,05 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,20 A</b>	<b>1,19 BC</b>	<b>1,04 BC</b>	<b>1,23 B</b>	<b>0,78 C</b>	
C - 2754-2	1 <sup>a</sup>	0,92 cA	0,34 bB	0,22 cB	0,30 bB	0,00 cC	<b>0,33 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,18 bA	0,46 bD	0,67 bBC	0,81 aB	0,57 bCD	<b>0,88 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	0,91 aB	0,91 aB	0,89 aB	0,71 aC	<b>1,20 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,95 A</b>	<b>0,56 C</b>	<b>0,58 BC</b>	<b>0,65 B</b>	<b>0,39 D</b>	

CV(%) = 6,69

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 28. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de chlorothalonil e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	1,76 <sup>a</sup>	1,69	1,44	1,24	1,16	1,45 c
	2 <sup>a</sup>	2,23 <sup>b</sup>	2,18	1,91	1,73	1,64	1,93 b
	3 <sup>a</sup>	3,20	3,14	2,72	2,42	2,25	2,74 a
	Média	<b>2,36 A</b>	<b>2,31 A</b>	<b>2,00 B</b>	<b>1,77 C</b>	<b>1,66 C</b>	
C - 2579-1	1 <sup>a</sup>	1,83	1,76	1,80	1,15	1,14	1,52 c
	2 <sup>a</sup>	2,51	2,40	2,48	1,69	1,15	2,02 b
	3 <sup>a</sup>	3,53	3,43	3,62	2,54	2,03	3,00 a
	Média	<b>2,59 A</b>	<b>2,49 A</b>	<b>2,59 A</b>	<b>1,76 B</b>	<b>1,42 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,61 bA	1,43 cA	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	0,48 c
	2 <sup>a</sup>	2,03 bA	2,27 bA	0,60 aB	0,00 aC	0,00 aC	1,14 b
	3 <sup>a</sup>	2,84 aA	3,50 aA	0,71 aB	0,00 aC	0,00 aC	1,11 a
	Média	<b>2,14 A</b>	<b>2,34 A</b>	<b>0,40 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2738-2	1 <sup>a</sup>	2,16 cA	1,48 cB	0,95 bC	0,00 bD	0,00 bD	0,78 c
	2 <sup>a</sup>	2,87 bA	2,58 bA	2,09 aB	1,58 aC	1,53 aC	2,10 b
	3 <sup>a</sup>	4,19 aA	3,43 aB	2,18 aC	1,78 aCD	1,63 aD	2,57 a
	Média	<b>3,02 A</b>	<b>2,44 B</b>	<b>1,70 C</b>	<b>0,99 D</b>	<b>0,93 D</b>	
C - 2739-3	1 <sup>a</sup>	1,92	1,82	1,81	1,43	1,17	1,62 c
	2 <sup>a</sup>	2,59	2,41	2,40	2,17	1,71	2,25 b
	3 <sup>a</sup>	3,78	3,36	3,23	2,81	2,30	3,08 a
	Média	<b>2,72 A</b>	<b>2,49 A</b>	<b>2,45 AB</b>	<b>2,11 B</b>	<b>1,70 C</b>	
C - 2753-1	1 <sup>a</sup>	1,80 cA	1,93 cA	1,71 cA	1,17 cB	1,19 cB	1,55 c
	2 <sup>a</sup>	2,53 bAB	2,69 bA	2,27 bB	1,73 bC	1,76 bC	2,18 b
	3 <sup>a</sup>	3,73 aA	3,98 aA	3,14 aB	2,57 aC	2,43 aC	3,15 a
	Média	<b>2,64 B</b>	<b>2,82 A</b>	<b>2,34 C</b>	<b>1,79 D</b>	<b>1,77 D</b>	
C - 2754-2	1 <sup>a</sup>	2,25 cA	1,96 bA	1,39 bB	0,00 cC	0,00 cC	0,94 c
	2 <sup>a</sup>	3,00 bA	2,20 bB	1,58 bC	0,51 bD	0,62 bD	1,47 b
	3 <sup>a</sup>	4,30 aA	3,93 aA	2,87 aB	2,22 aC	2,14 aC	3,04 a
	Média	<b>3,14 A</b>	<b>2,64 B</b>	<b>1,91 C</b>	<b>0,75 D</b>	<b>0,78 D</b>	

CV(%) = 4,89

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 29. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de methalaxyl-mancozeb e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	2,23 cA <sup>a</sup>	2,12 cA	1,32 cB	0,00 bC	0,00 aC	0,95 c
	2 <sup>a</sup>	3,22 bA <sup>b</sup>	3,09 bA	2,15 bB	0,00 bC	0,00 aC	1,38 b
	3 <sup>a</sup>	4,42 aA	4,28 aA	2,98 aB	0,71 aC	0,00 aD	2,11 a
	Média	<b>3,24 A</b>	<b>3,11 A</b>	<b>2,11 B</b>	<b>0,20 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2579-1	1 <sup>a</sup>	1,99	2,04	0,94	0,00	0,00	0,84 b
	2 <sup>a</sup>	2,92	2,87	1,47	0,00	0,00	1,19 b
	3 <sup>a</sup>	3,78	4,16	1,96	1,09	2,42	2,57 a
	Média	<b>2,86 A</b>	<b>2,97 A</b>	<b>1,43 B</b>	<b>0,29 C</b>	<b>0,58 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,91	1,91	0,00	0,00	0,00	0,59 b
	2 <sup>a</sup>	2,77	2,76	0,81	0,00	0,00	1,02 a
	3 <sup>a</sup>	3,77	3,67	0,96	0,23	0,00	1,39 a
	Média	<b>2,77 A</b>	<b>2,74 A</b>	<b>0,54 B</b>	<b>0,07 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2738-2	1 <sup>a</sup>	2,04	2,35	1,17	0,18	0,00	0,99 c
	2 <sup>a</sup>	3,04	2,98	1,81	0,29	0,00	1,38 b
	3 <sup>a</sup>	3,99	4,02	1,71	0,74	0,00	1,78 a
	Média	<b>2,98 A</b>	<b>3,08 A</b>	<b>1,55 B</b>	<b>0,38 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2739-3	1 <sup>a</sup>	2,30 cA	2,02 cA	1,03 bB	0,13 bC	0,00 aC	0,94 c
	2 <sup>a</sup>	3,16 bA	3,06 bA	3,25 aA	0,32 abB	0,00 aB	1,66 b
	3 <sup>a</sup>	4,21 aA	4,19 aA	3,25 aB	0,53 aC	0,13 aD	2,11 a
	Média	<b>3,16 S</b>	<b>3,03 A</b>	<b>2,40 B</b>	<b>0,32 C</b>	<b>0,04 D</b>	
C - 2753-1	1 <sup>a</sup>	2,14 cA	1,73 cB	0,78 cC	0,00 aD	0,00 aD	0,78 c
	2 <sup>a</sup>	3,03 bA	2,76 bA	1,61 bB	0,00 aC	0,00 aC	1,21 b
	3 <sup>a</sup>	3,84 aA	3,73 aA	2,43 aB	0,00 aC	0,00 aC	1,61 a
	Média	<b>2,97 A</b>	<b>2,69 B</b>	<b>1,55 C</b>	<b>0,00 D</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2754-2	1 <sup>a</sup>	2,34 cA	1,71 cB	1,07 cC	0,09 abD	0,00 aD	0,89 c
	2 <sup>a</sup>	3,09 bA	2,76 bA	1,79 bB	0,17 aC	0,00 aC	1,32 b
	3 <sup>a</sup>	4,42 aA	3,59 aB	2,63 aC	0,00 bD	0,06 aD	1,73 a
	Média	<b>3,24 A</b>	<b>2,64 B</b>	<b>1,78 C</b>	<b>0,08 D</b>	<b>0,02 D</b>	

CV(%) = 9,98

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 30. Crescimento micelial de sete isolados de *C. coffeicola*, em meio de cultura, contendo 0, 1, 10, 50 e 100µg/mL de tebuconazole e avaliados em três épocas (3, 7 e 10 dias após o plaqueamento)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)					Média
		0	1	10	50	100	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	1,47 cA <sup>a</sup>	0,33 cB	0,12 bBC	0,12 bBC	0,00 aC	<b>0,34 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,23 bA <sup>b</sup>	0,69 bB	0,33 bC	0,22 bCD	0,00 aD	<b>0,58 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,74 aA	1,63 aB	0,66 aC	0,56 aC	0,00 aD	<b>1,10 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,41 A</b>	<b>0,83 B</b>	<b>0,35 C</b>	<b>0,29 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2579-1	1 <sup>a</sup>	1,26 cA	0,00 cB	0,00 cB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,19 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,08 bA	0,21 bB	0,24 bB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,39 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,39 aA	0,47 aB	0,54 aB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,66 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,17 A</b>	<b>0,24 B</b>	<b>0,21 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,74 cA	0,23 bB	0,00 cB	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,30 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,43 bA	0,37 bB	0,32 bB	0,00 bC	0,00 aC	<b>0,48 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	0,80 aB	0,75 aB	0,46 aB	0,00aC	<b>0,91 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,51 A</b>	<b>0,44 B</b>	<b>0,34 B</b>	<b>0,13 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2738-2	1 <sup>a</sup>	2,47 bA	0,45 bB	0,00 aC	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,43 c</b>
	2 <sup>a</sup>	3,37 aA	0,65 bB	0,06 aC	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,58 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,64 aA	1,14 aB	0,18 aC	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,73 a</b>
	<b>Média</b>	<b>3,14 A</b>	<b>0,73 B</b>	<b>0,08 C</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2739-3	1 <sup>a</sup>	0,27 cA	0,14 bA	0,13 bA	0,00 aA	0,00 aA	<b>0,10 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,49 bA	0,33 bB	0,33 bB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,36 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,92 aA	0,87 aB	1,28 aB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,95 a</b>
	<b>Média</b>	<b>1,64 A</b>	<b>0,53 B</b>	<b>0,42 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2753-1	1 <sup>a</sup>	1,77 cA	0,42 cB	0,14 bB	0,00 bC	0,00 aC	<b>0,37 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,53 bA	0,66 bB	0,16 bC	0,16 aC	0,00 aC	<b>0,56 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,98 aA	1,08 aB	0,49 aC	0,31 aC	0,00 aD	<b>0,93 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,70 A</b>	<b>0,70 B</b>	<b>0,25 C</b>	<b>0,15 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2754-2	1 <sup>a</sup>	1,01 aA	0,22 aB	0,09 aB	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,22 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA	0,37 aB	0,14 aBC	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,42 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,74 cA	0,50 aB	0,32 aB	0,00 aC	0,00 aC	<b>0,66 c</b>
	<b>Média</b>	<b>2,22 A</b>	<b>0,36 B</b>	<b>0,82 B</b>	<b>0,00 C</b>	<b>0,00 C</b>	

CV(%) = 7,73

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

## 6.6. Sensibilidade “in vitro” de dez isolados de *C. coffeicola* a sete fungicidas (Segundo experimento)

As médias de três avaliações do crescimento micelial de dez isolados, em meio de cultura, em doses crescentes de princípios ativos estão apresentados nos Quadros 31 a 37.

O propiconazole, reduziu drasticamente o crescimento micelial dos isolados, sendo que a 10µg/mL e 100µg/mL não houve nenhum crescimento (Quadro 31).

O oxicloreto de cobre reduziu significativamente o crescimento micelial de todos os dez isolados do fungo com o aumento da sua concentração no meio de cultura (Quadro 32). A 1500µg/mL, o crescimento micelial de todos os isolados foram totalmente inibidos.

Para o benomyl, os isolados C-2734-3, C-2835, C-2836, C-2837 e C-2845 foram totalmente inibidos a 1µg/mL nas duas primeiras avaliações e por completo a 100µg/mL, enquanto que os isolados C-2828 e C-2844 apresentaram crescimento micelial mesmo a 100µg/mL, embora tenha reduzido em cerca de 50% em relação a ausência do produto (Quadro 33).

A 100µg/mL, o chlorothalonil inibiu totalmente o crescimento de todos os dez isolados. Na concentração de 10µg/mL, o crescimento de todos os isolados foi inibido significativamente em relação à testemunha (Quadro 34).

O azoxystrobin reduziu significativamente o crescimento micelial de todos os isolados em relação à testemunha (Quadro 35). O isolado C-2734-3 foi o único totalmente inibido a 10 e 100µg/mL.



O metalaxyl-mancozeb reduziu significativamente o crescimento micelial de todos os isolados com o aumento da sua concentração no meio da cultura a 100µg/mL, todos os isolados foram completamente inibidos (Quadro 36).

O tebuconazole inibiu completamente o crescimento micelial dos dez isolados nas concentrações testadas de 10 e 100µg/mL (Quadro 37).

Quadro 31. Efeito do propiconazole nas concentrações de 0, 10 e 100 µg/mL, em dez isolados de *C. coffeicola*, em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)			
		0	10	100	Média
C – 2568	1 <sup>a</sup>	1,61 cA <sup>a</sup>	0,36 cB	0,00 aC	<b>0,56 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA <sup>b</sup>	0,84 bB	0,00 aC	<b>0,88 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,72 aA	1,32 aB	0,00 aC	<b>1,37 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,46 A</b>	<b>0,81 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,36 cB	0,00 aC	<b>0,60 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,48 bA	0,49 bB	0,00 aC	<b>0,81 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	1,10 aB	0,00 aC	<b>1,11 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,55 A</b>	<b>0,51 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2825	1 <sup>a</sup>	1,51 cA	0,02 bB	0,00 aB	<b>0,40 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,11 bA	0,41 aB	0,00 aC	<b>0,69 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	0,67 aB	0,00 aC	<b>1,02 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,22 A</b>	<b>0,34 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2828	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,28 cB	0,00 aC	<b>0,57 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,33 bA	0,54 bB	0,00 aC	<b>0,79 b</b>
	3 <sup>a</sup>	1,78 aA	1,17 aB	0,00 aC	<b>1,26 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,47 A</b>	<b>0,64 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2835	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	0,92 abB	0,00 aC	<b>0,80 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,89 bB	0,00 aC	<b>0,93 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	1,13 aB	0,00 aC	<b>1,19 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,44 A</b>	<b>0,98 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2836	1 <sup>a</sup>	1,68 cA	0,29 cB	0,00 aC	<b>0,55 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,46 bB	0,00 aC	<b>0,78 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,22 aA	0,74 aB	0,00 aC	<b>1,06 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,41 A</b>	<b>0,49 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2837	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,43 bB	0,00 aC	<b>0,54 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,51 bB	0,00 aC	<b>0,79 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	1,06 aB	0,00 aC	<b>1,20 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>0,65 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2840	1 <sup>a</sup>	1,24 cA	0,24 cB	0,00 aC	<b>0,43 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,87 bA	0,61 bB	0,00 aC	<b>0,71 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,47 aA	1,14 aB	0,00 aC	<b>1,26 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,12 A</b>	<b>0,64 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2844	1 <sup>a</sup>	1,71 cA	0,00 cB	0,00 aB	<b>0,43 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,41 bA	0,22 bB	0,00 aC	<b>0,68 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	0,83 aB	0,00 aC	<b>1,04 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,34 A</b>	<b>0,31 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2845	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	0,92 abB	0,00 aC	<b>0,80 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,89 bB	0,00 aC	<b>0,93 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	1,13 aB	0,00 aC	<b>1,19 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,44 A</b>	<b>0,98 B</b>	<b>0,00 C</b>	

CV(%) = 3.43

- (a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.  
 b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 32. Efeito do oxiclreto de cobre nas concentrações de 0, 100, 1000, 1500 µg/mL, em dez isolados de *C. coffeicola*, em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)				Média
		0	100	1000	1500	
C - 2568	1 <sup>a</sup>	1,61 cA <sup>a</sup>	0,50 cB	0,07 cC	0,00 aC	<b>0,45 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA <sup>b</sup>	1,47 bB	0,20 bC	0,00 aD	<b>0,82 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,72 aA	1,94 aB	0,30 aC	0,00 aD	<b>1,20 a</b>
	Média	<b>2,46 A</b>	<b>1,25 B</b>	<b>0,18 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,46 cB	0,08 cC	0,00 aD	<b>0,48 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,48 bA	2,17 bB	0,20 bC	0,00 aD	<b>1,00 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	2,59 aB	0,30 aC	0,00 aD	<b>1,29 a</b>
	Média	<b>2,55 A</b>	<b>1,62 B</b>	<b>0,19 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2825	1 <sup>a</sup>	1,51 cA	0,77 cB	0,00 cC	0,00 aC	<b>0,48 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,11 bA	1,33 bB	0,16 bC	0,00 aD	<b>0,76 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	1,53 aB	0,32 aC	0,00 aD	<b>1,03 a</b>
	Média	<b>2,22 A</b>	<b>1,20 B</b>	<b>0,15 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2828	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,47 cB	0,10 bC	0,00 aD	<b>0,49 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,33 bA	1,63 bB	0,22 aC	0,00 aD	<b>0,88 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,42 aA	2,31aB	0,30 aC	0,00 aD	<b>1,22 a</b>
	Média	<b>2,47 A</b>	<b>1,39 B</b>	<b>0,20 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2835	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	0,61 bB	0,16 bC	0,00 aD	<b>0,52 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	1,19 aB	0,26 aC	0,00 aD	<b>0,86 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	1,47 aB	0,32 aC	0,00 aD	<b>1,02 a</b>
	Média	<b>2,44 A</b>	<b>1,03 B</b>	<b>0,24 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2836	1 <sup>a</sup>	1,68 cA	0,32 cB	0,52 aC	0,00aD	<b>0,44 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	1,33 bB	0,22 bC	0,00 aD	<b>0,83 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,22 aA	1,57 aB	0,12 cC	0,00aD	<b>1,11 a</b>
	Média	<b>2,41 A</b>	<b>1,02B</b>	<b>0,28C</b>	<b>0,00D</b>	
C - 2837	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,50 bB	0,12 bC	0,00 aD	<b>0,44 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	1,39 aB	0,18 bC	0,00 aD	<b>0,83 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	1,49 aB	0,30 aC	0,00 aD	<b>1,04 a</b>
	Média	<b>2,32 A</b>	<b>1,09 B</b>	<b>0,20 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2840	1 <sup>a</sup>	1,24 bA	0,92 aAB	0,42 aBC	0,00 aC	<b>0,59 b</b>
	2 <sup>a</sup>	1,87 bA	1,37 aA	0,22 aB	0,00 aB	<b>0,73 ab</b>
	3 <sup>a</sup>	3,47 aA	0,92 aB	0,17 aC	0,00 aC	<b>1,05 a</b>
	Média	<b>2,12 A</b>	<b>1,27 B</b>	<b>0,27 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2844	1 <sup>a</sup>	1,71 cA	0,52 bB	0,12 bC	0,00 aD	<b>0,49 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,41 bA	1,33 aB	0,28 aC	0,00 aD	<b>0,85 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	1,46 aB	0,32 aC	0,00 aD	<b>0,98 a</b>
	Média	<b>2,34 A</b>	<b>1,07 B</b>	<b>0,24 C</b>	<b>0,00 D</b>	
C - 2845	1 <sup>a</sup>	1,73 cA	1,23 bB	0,23 bC	0,00 aD	<b>0,69 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	1,49 abB	0,34 abC	0,00 aD	<b>0,90 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,28 aA	1,73 aB	0,44 aC	0,00 aD	<b>1,13 a</b>
	Média	<b>2,73 A</b>	<b>1,48 B</b>	<b>0,34 C</b>	<b>0,00 D</b>	

CV(%) = 3,95

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 33. Efeito do benomyl nas concentrações de 0, 1, 100 µg/mL, em dez isolados de *C. coffeicola*, em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)			Média
		0	1	100	
C – 2568	1 <sup>a</sup>	1,61 cA <sup>a</sup>	1,18 bB	0,00 bC	<b>0,82 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA <sup>b</sup>	1,32 bB	0,00 bC	<b>1,03 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,72 aA	1,61 aB	0,97 aC	<b>1,98 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,46 A</b>	<b>1,37 B</b>	<b>0,26 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,45 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,48 bA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,59 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	0,71 aB	0,00 aC	<b>1,11 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,55 A</b>	<b>0,20 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2825	1 <sup>a</sup>	1,51 cA	1,02 bB	0,00 aC	<b>0,75 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,11 bA	1,08 bB	0,00 aC	<b>0,92 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	1,65 aB	0,00 aC	<b>1,36 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,22 A</b>	<b>1,74 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2828	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	1,17 cB	0,47 cC	<b>1,09 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,33 bA	1,63 bB	1,19 bC	<b>1,69 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,42 aA	2,31 aB	1,77 aC	<b>2,46 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,47 A</b>	<b>1,68 B</b>	<b>1,10 C</b>	
C – 2835	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,45 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,58 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	1,13 aB	0,00 aC	<b>1,19 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,44 A</b>	<b>0,30 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2836	1 <sup>a</sup>	1,68 cA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,43 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,58 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,22 aA	0,74 aB	0,00 aC	<b>1,06 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,41 A</b>	<b>0,21 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2837	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,37 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,57 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	1,06 aB	0,00 aC	<b>1,20 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>0,28 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2840	1 <sup>a</sup>	1,24 cA	1,14 bA	0,00 bB	<b>0,72 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,87 bA	1,23 abB	0,00 bC	<b>0,91 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,47 aA	1,33 aB	0,77 aC	<b>1,72 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,12 A</b>	<b>1,23 B</b>	<b>0,21 C</b>	
C – 2844	1 <sup>a</sup>	1,71 cA	0,61 bB	0,52 bB	<b>0,90 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,41 bA	1,39 aB	1,33 aB	<b>1,69 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	1,561 aB	1,46 aB	<b>1,93 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,34 A</b>	<b>1,15 B</b>	<b>1,07 B</b>	
C – 2845	1 <sup>a</sup>	1,73 cA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,44 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,00 bB	0,00 aB	<b>0,57 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,28 aA	1,26 aB	0,00 aC	<b>1,25 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,43 A</b>	<b>0,33 B</b>	<b>0,00 C</b>	

CV(%) = 2,75

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 34. Efeito do chlorothalonil nas concentrações de 0, 10, e 100 µg/mL, em dez isolados de *C. coffeicola*, em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)			
		0	10	100	Média
C – 2568	1 <sup>a</sup>	1,61 cA <sup>a</sup>	1,22 bB	0,00 aC	<b>0,83 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA <sup>b</sup>	2,24 aA	0,00 aB	<b>1,29 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,72 aA	2,37 aB	0,00 aC	<b>1,70 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,46 A</b>	<b>1,91 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,68 cB	0,00 aC	<b>0,71 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,48 bA	1,87 bB	0,00 aC	<b>1,25 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	3,44 aA	0,00 aB	<b>1,94 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,55 A</b>	<b>1,86 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2825	1 <sup>a</sup>	1,51 cA	0,36 cB	0,00 aC	<b>0,53 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,11 bA	2,04 bA	0,00 aB	<b>1,20 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	2,26 aB	0,00 aC	<b>1,64 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,22 A</b>	<b>1,44 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2828	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,31 cB	0,00 aC	<b>0,58 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,33 bA	2,28 bA	0,00 aB	<b>1,33 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,42 aA	2,86 aB	0,00 aC	<b>1,77 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,47 A</b>	<b>1,65 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2835	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	1,26 aB	0,00 aC	<b>0,90 b</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,46 bB	0,00 aC	<b>0,78 c</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	1,22 aB	0,00 aC	<b>1,22 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,44 A</b>	<b>0,96 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2836	1 <sup>a</sup>	1,68 cB	2,00 bA	0,00 aC	<b>1,07 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	1,94 bB	0,00 aC	<b>1,26 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,22 aA	2,56 aB	0,00 aC	<b>1,63 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,41 A</b>	<b>2,16 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2837	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,96 cB	0,00 aC	<b>0,71 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	2,03 bB	0,00 aC	<b>1,27 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	2,28 aB	0,00 aC	<b>1,58 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>1,72 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2840	1 <sup>a</sup>	1,24 cB	1,87 cA	0,00 aC	<b>0,91 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,87 bB	2,36 bA	0,00 aC	<b>1,22 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,47 aA	2,69 aB	0,00 aC	<b>1,73 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,12 B</b>	<b>2,30 A</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2844	1 <sup>a</sup>	1,71 cA	1,37 aB	0,00 aC	<b>0,91 b</b>
	2 <sup>a</sup>	2,41 bA	0,83 bB	0,00 aC	<b>0,91 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	1,39 aB	0,00 aC	<b>1,23 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,34 A</b>	<b>1,19 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2845	1 <sup>a</sup>	1,73 cA	0,84 cB	0,00 aC	<b>0,75 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	1,32 bB	0,00 aC	<b>1,06 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,28 aA	1,62 aB	0,00 aC	<b>1,37 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,43 A</b>	<b>1,25 B</b>	<b>0,00 C</b>	

CV(%) = 3,02

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 35. Efeito do azoxystrobin nas concentrações de 0, 10, e 100 µg/mL, em dez isolados de *C. coffeicola*, em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)			Média
		0	10	100	
C – 2568	1 <sup>a</sup>	1,61 cA <sup>a</sup>	0,76 bB	0,30 bC	<b>0,84 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA <sup>b</sup>	1,12 aB	1,06 aB	<b>1,44 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,72 aA	1,16 aB	1,20 aB	<b>1,99 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,46 A</b>	<b>1,01 B</b>	<b>0,82 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,31 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,48 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,41 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,55 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,54 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2825	1 <sup>a</sup>	1,51 cA	0,49 aB	0,43 aB	<b>0,77 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,11 bA	0,58 aB	0,66 aB	<b>1,05 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	0,65 aB	0,68 aB	<b>1,34 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,22 A</b>	<b>0,57 B</b>	<b>0,59 B</b>	
C – 2828	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,32 bB	0,13 bC	<b>0,58 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,33 bA	0,33 bB	0,31 aB	<b>0,80 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,42 aA	0,54 aB	0,24 aA	<b>1,07 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,47 A</b>	<b>0,39 B</b>	<b>0,22 C</b>	
C – 2835	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	0,40 aB	0,00 cC	<b>0,62 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,46 aB	0,17 bC	<b>0,87 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	0,53 aB	0,42 aB	<b>1,18 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,44 A</b>	<b>0,46 B</b>	<b>0,18 C</b>	
C – 2836	1 <sup>a</sup>	1,68 cA	0,46 bB	0,16 bC	<b>0,69 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,47 bB	0,32 aC	<b>0,94 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,22 aA	0,67 aB	0,38 aC	<b>1,23 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,41 A</b>	<b>0,53 B</b>	<b>0,28 C</b>	
C – 2837	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,33 bB	0,19 bB	<b>0,59 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,58 aB	0,43 aB	<b>1,02 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	0,74 aB	0,59 aB	<b>1,38 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>0,54 B</b>	<b>0,40 C</b>	
C – 2840	1 <sup>a</sup>	1,24 cA	0,29 bB	0,00 cC	<b>0,44 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,87 bA	0,28 bB	0,22 bB	<b>0,69 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,47 aA	0,52 aB	0,39 aB	<b>1,23 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,12 A</b>	<b>0,36 B</b>	<b>0,19 C</b>	
C – 2844	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,33 bB	0,19 bB	<b>0,59 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,58 aB	0,43 aB	<b>1,02 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	0,74 aB	0,59 aB	<b>1,38 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>0,54 B</b>	<b>0,40 C</b>	
C – 2845	1 <sup>a</sup>	1,73 cA	0,27 aB	0,21 bB	<b>0,65 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,32 aB	0,25 abB	<b>0,84 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,28 aA	0,39 aB	0,37 aB	<b>1,12 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,43 A</b>	<b>0,33 B</b>	<b>0,28 B</b>	

CV(%) = 4,51

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 36. Efeito do methalaxyl+mancozeb nas concentrações de 0, 10, e 100 µg/mL, em dez isolados de *C. coffeicola*, em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias)

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)			Média
		0	10	100	
C – 2568	1 <sup>a</sup>	1,61 cA <sup>a</sup>	1,17 cB	0,00 aC	<b>0,82 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA <sup>b</sup>	2,16 bB	0,00 aC	<b>1,27 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,72 aA	3,32 aB	0,00 aC	<b>1,97 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,46 A</b>	<b>2,14 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,00 cB	0,00 aB	<b>0,45 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,48 bA	1,91 bB	0,00 aC	<b>1,26 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	2,44 aB	0,00 aC	<b>1,67 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,55 A</b>	<b>1,25 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2825	1 <sup>a</sup>	1,51 cA	1,04 cB	0,00 aC	<b>0,76 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,11 bA	1,41 bB	0,00 aC	<b>1,02 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,37 aA	2,36 aB	0,00 aC	<b>1,66 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,22 A</b>	<b>1,57 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2828	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,86 cB	0,00 aC	<b>0,77 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,33 bA	1,53 bB	0,00 aC	<b>1,11 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,42 aA	2,33 aB	0,00 aC	<b>1,62 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,47 A</b>	<b>1,63 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2835	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	1,12 cB	0,00 aC	<b>0,86 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	1,58 bB	0,00 aC	<b>1,15 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	2,12 aB	0,00 aC	<b>1,50 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,44 A</b>	<b>1,58 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2836	1 <sup>a</sup>	1,68 cA	1,08 cB	0,00 aC	<b>0,81 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	1,43 bB	0,00 aC	<b>1,11 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,22 aA	2,36 aB	0,00 aC	<b>1,58 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,41 A</b>	<b>1,59 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2837	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,98 cB	0,00 aC	<b>0,71 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	1,36 bB	0,00 aC	<b>1,25 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	1,88 aB	0,00 aC	<b>1,40 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>1,39 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2840	1 <sup>a</sup>	1,24 cA	0,73 cB	0,00 aC	<b>0,59 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,87 bA	1,17 bB	0,00 aC	<b>0,89 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,47 aA	2,19 aB	0,00 aC	<b>1,59 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,12 A</b>	<b>1,31 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2844	1 <sup>a</sup>	1,71 cA	1,14 cB	0,00 aC	<b>0,84 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,41 bA	1,57 bB	0,00 aC	<b>1,15 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	2,42 aB	0,00 aC	<b>1,53 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,34 A</b>	<b>1,68 B</b>	<b>0,00 C</b>	
C – 2845	1 <sup>a</sup>	1,73 cA	0,96 cB	0,00 aC	<b>0,79 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	1,41 bB	0,00 aC	<b>1,09 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,28 aA	2,13 aB	0,00 aC	<b>1,53 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,43 A</b>	<b>1,47 B</b>	<b>0,00 C</b>	

CV(%) = 3,16

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.

Quadro 37. Efeito do tebuconazole nas concentrações de 0, 10, e 100 µg/mL, em dez isolados de *C. coffeicola*, em três períodos de avaliação (5, 7 e 10 dias).

Isolados	Épocas de avaliação	Concentrações (mg/mL)			Média
		0	10	100	
C – 2568	1 <sup>a</sup>	1,61 cA <sup>a</sup>	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,41 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,24 bA <sup>b</sup>	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,54 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,72 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,83 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,46 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C - 2734-3	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,45 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,48 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,59 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,49 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,79 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,55 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2825	1 <sup>a</sup>	1,51 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,39 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,11 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,52 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,73 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,22 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2828	1 <sup>a</sup>	1,78 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,45 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,33 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,56 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,42 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,78 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,47 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2835	1 <sup>a</sup>	1,82 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,45 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,58 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,17 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,73 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,44 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2836	1 <sup>a</sup>	1,68 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,43 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,58 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,22 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,74 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,41 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2837	1 <sup>a</sup>	1,42 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,37 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,57 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,33 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,76 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,32 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2840	1 <sup>a</sup>	1,24 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,33 c</b>
	2 <sup>a</sup>	1,87 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,47 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,47 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,79 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,12 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2844	1 <sup>a</sup>	1,71 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,43 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,42 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,58 b</b>
	3 <sup>a</sup>	2,98 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,69 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,34 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	
C – 2845	1 <sup>a</sup>	1,73 cA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,44 c</b>
	2 <sup>a</sup>	2,38 bA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,57 b</b>
	3 <sup>a</sup>	3,28 aA	0,00 aB	0,00 aB	<b>0,75 a</b>
	<b>Média</b>	<b>2,43 A</b>	<b>0,00 B</b>	<b>0,00 B</b>	

CV(%) = 2,31

(a) Em cada isolado, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

b) Diâmetro do crescimento da colônia do fungo em centímetros.



## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Caracterização morfológica

As mensurações dos conídios de 21 isolados de *C. coffeicola* mostram que eles se apresentam grandes no comportamento, largura e número de septos (Quadro 12). Uma análise de agrupamento (Figura 2) e a dispersão gráfica, (Figura 3) desses isolados, em função das características morfológicas, indicaram a existência de três grupos. O  $G_1$  caracteriza-se pelos isolados que apresentaram valores mínimos de comprimento, largura e número de septos;  $G_2$ , valores intermediários aos grupos  $G_1$  e  $G_3$  ; e  $G_3$  agrupou isolados de maiores dimensões.

Ao comparar os isolados de cada grupo (Figura 2 e 3) com dimensões dos conídios dos respectivos isolados do Quadro 12 , verifica-se , no  $G_3$  , que os cinco isolados (C-2840, C2845, C-2753-1, C-2836, C-2837 e C-2734-3) apresentaram dimensões bem próximas das citadas por Godoy et al. (1997) ( $100-270\mu \times 3-4\mu$ ), enquanto que os  $G_1$  e  $G_2$  aproximam-se bem das dimensões encontradas por Mitov (1971) ( $20-95\mu \times 3,5-5,5\mu$ ).

Entretanto em *Coffea arabica typica* e na variedade Caturra, Mitov (1971), verificou conídios com dimensões de 26,5-235,5 x 4,5-6,5 $\mu$ .

Os isolados C-2734-3 e C-2568, desde o seu isolamento, foram tomados como culturas padrão para a diferenciação no comprimento, largura e número de septos e na pigmentação dos conídios. Na análise de agrupamento e na dispersão gráfica, os isolados situaram-se em grupos diferentes, C-2734-3 no G<sub>3</sub> e o C-2568 no G<sub>1</sub>. Embora estejam em grupos diferentes, não há possibilidade de qualquer especulação quanto à existência de gêneros ou de espécies diferentes do fungo com base na análise morfológica dos conídios, principalmente levando-se em consideração os trabalhos de Mitov (1971) e Godoy et al., (1997) e por não ter se examinado a cicatriz existente na base os conídios e sua pigmentação, como recomendada por Barnett e Hunter (1998).

## **7.2 Caracterização fisiológica**

Os resultados da esporulação mostram uma diferenciação de comportamento entre os isolados, de conformidade com as condições de incubação ou as nutricionais a que foram submetidos. Assim, o isolado C-2825 apresentou maior produção de conídios, quando cultivado em meio de pó de café ágar (EPCA), seguido pelos isolados C-2734-2 (Quadros 14 a 18 e Figura 4.). Porém, no geral o meio que promoveu maior esporulação dos isolados foi o de V-8, seguido pelo meio de pó de café. Deve-se considerar que a esporulação é um processo de diferenciação mais específico, no qual estão envolvidas as células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Griffin, 1993).

O fato de um substrato ser considerado bom para o crescimento micelial de um fungo, que é um processo complexo, no qual muitos componentes influenciam o desenvolvimento e a diferenciação celular (Castro e Coêlho, 2000), nem sempre garante o bom desempenho para a esporulação, fato já evidenciado por outros pesquisadores (Lilly e Barnett, 1951; Hawker, 1950; 1957; Cochrane, 1958; Griffin, 1994). No entanto, conforme a Figura 4, não se constatou correlação entre o crescimento micelial dos isolados e a produção dos conídios. Para o crescimento micelial da *C. coffeicola*, o melhor foi o meio de folha de café-ágar, seguido pelo meio de pó de café. O resultado obtido concorda com os dados da literatura, onde as maiores esporulações são obtidas com a utilização de meios de cultura à base de suco de vegetais (Del Peloso, et al., 1989; Ekpo e Esuruoso, 1978; Queiroz e Menezes, 1993 e Veiga, 1973). Geralmente, a produção de conídios ocorre quando há uma exaustão do meio, resultante da utilização dos nutrientes pelo fungo, durante a fase de crescimento vegetativo. Associadas a este processo, alterações na composição do meio podem ocorrer devido a metabólitos secundários liberados pelo fungo. Segundo Hawker (1957), a mudança de crescimento vegetativo para a esporulação depende principalmente do grau de maturidade do micélio, acelerado ou inibido pelas condições de cultivo. A variação de comportamento observada entre os isolados de *C. coffeicola*, principalmente com relação à esporulação, pode ser explicada, possivelmente, por diferenças no potencial genético de cada um dos isolados, cuja expressão dos caracteres pode ocorrer em função do ambiente em que foi exposto, como admitem Rosa e Menezes (2001). Esta suposição tem como base o trabalho de Hawker (1950), quando estudou isolados monospóricos de 30 gêneros de fungos e verificou que 50% dos organismos analisados mostraram mais de um tipo de colônia. Considerando aquelas colônias originais de um único conídio da mesma espécie, foram obtidos tipos miceliais com poucos conídios, tipos conidiais

intermediários. Estes “tipos fisiológicos” foram correlacionados com o número de núcleos e tamanho de conídios, onde conídios grandes com mais de um núcleo produzem mais colônias intermediárias em diferentes níveis, do que conídios pequenos com um só núcleo.

O período de esporulação também constitui uma informação importante, o qual modifica-se de acordo com as espécies em estudo. No caso dos isolados de *C. coffeicola* testados, verificou-se que o pico de esporulação variou de acordo com o meio de cultura utilizado. Para os meios de cenoura e de café-ágar, o pico de esporulação ocorreu no período da primeira avaliação (10º dia), diferentemente do meio de V-8, onde ocorreu no período da segunda (10º dia) e no meio de pó de café ocorreu na primeira (7º dia).

### **7.3. Caracterização patogênica**

Os resultados do teste de patogenicidade realizado com 49 isolados de *C. coffeicola*, possibilitaram a formação de três grupos ( $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_3$ ) com base no grau de severidade apresentada pelos isolados e na porcentagem de área foliar lesionada. Não houve correlação dos grupos com a procedência dos isolados, mas verificaram-se diferenças nos sintomas nas folhas entre os isolados (Figura 6 e 7).

No  $G_2$  estão os isolados não patogênicos (16 isolados) e os que apresentaram baixa patogenicidade (17 isolados). A ausência da manifestação de patogenicidade, pode ser atribuída à influência das repicagens sucessivas para a purificação das culturas, à execução da pressão de seleção para a indução de esporulação dos isolados em meio de cultura, ou mesmo à manutenção dos isolados em meio de PSA (Peptona Sacarose Ágar), cobertos com óleo mineral “Nujol” autoclavado. Segundo Smith e Onions (1994), para que o método de conservação seja eficiente, precisa haver manutenção adequada no sentido de se

trocar tanto o meio de cultura quanto o óleo a cada dois anos caso, contrário haverá a redução ou mesmo a perda da patogenicidade dos fungos.

Os isolados classificados como membros do G<sub>1</sub> apresentaram agressividade intermediária aos G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub>. Os isolados do G<sub>3</sub> apresentaram maior agressividade em relação a outros grupos. O isolado que apresentou maior severidade foi o C-2842, proveniente do município de Álvaro de Carvalho – SP.

#### **7.4. Caracterização molecular**

Na literatura consultada não foi encontrado trabalho relacionado a utilização da técnica de RAPD para caracterizar espécies do gênero *Cercospora*.

No presente estudo, os marcadores RAPD separaram os isolados em quatro grupos distintos, mostrando que existe variabilidade genética entre os isolados, porém não foi possível definir qual foi a característica que gerou estes grupos. A patogenicidade, a morfologia e a origem geográfica dos isolados não correspondem aos grupos gerados pelo RAPD. Portanto, mais pesquisas são necessárias na área molecular utilizando-se mais primers e mais isolados para o entendimento da distribuição da população de isolados de *C. coffeicola*.

#### **7.5. Sensibilidade "in vitro" de *C. coffeicola* a diferentes fungicidas (Primeira e Segunda parte)**

Dentre os fungicidas testados "in vitro", o propiconazole e o tebuconazole, ambos pertencentes ao grupo dos triazóis, foram os mais eficientes e não se verificaram diferenças acentuadas na sensibilidade entre os isolados. Isto pode ser atribuído à elevada fungitoxicidade, amplo espectro de ação deste grupo químico e modo de ação sobre os

fungos. Quando as células dos fungos entram em contato com os triazóis, acumulam esteróis como 4-4 dimetil e 4- $\alpha$ -metil, causando a inativação do processo da demetilação do lanosterol até compostos intermediários, precursores do ergosterol (Gadher et al., 1983). Com a deficiência do ergosterol e acúmulo de compostos intermediários haverá a indução da formação de membranas alternativas e a desorganização celular (Forcelini e Reis, 1988).

A baixa eficiência apresentada pelo oxicloreto de cobre, mesmo à dose de 100 $\mu$ g/mL está aquém da concentração mínima necessária para inibir o crescimento micelial do fungo (Quadro 24). No segundo experimento realizado a dosagem de 1000 $\mu$ g/mL não inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo, mas ocorreu inibição por completa de todos os isolados a 1500 $\mu$ g/mL (Quadro 32). O oxicloreto de cobre é um fungicida largamente utilizado nos cafeeiros para o controle de várias doenças, entre elas a ferrugem, em dosagens relativamente elevadas em relação aos fungicidas não cúpricos. O uso intensivo pode tornar os fungos mais tolerantes a esse fungicida e os resultados de inibição micelial podem ser uma indicação disso. Contudo, as diferenças na tolerância entre os isolados aos fungicidas cúpricos não chegaram a grandes diferenças, visto que os cúpricos são produtos de amplo espectro de ação no metabolismo dos fungos.

Para o benomyl, dos sete isolados, quatro foram totalmente inibidos a 1 $\mu$ g/mL, enquanto os outros três (C-2568, C-2739-3, C-2754-2) apresentaram pouca inibição, mesmo a 100 $\mu$ g/mL (Quadro 25). No segundo experimento, o benomyl inibiu os isolados (C2734-3, C-2825, C-2836, C-2835, C-2837 e C-2845) dos dez testados, a 100 $\mu$ g/mL além dos isolados C-2568 e C-2840 que apresentaram baixo crescimento (Quadro 33.). Essa diferença no comportamento dos isolados em relação ao benomyl pode ser atribuída à resistência de seis isolados ao produto. Comparando-se os resultados obtidos, verifica-se que não há uma

correlação entre os isolados resistentes a benomyl e agrupamentos segundo a caracterização molecular dos isolados pelo método de RAPD, e nem com a agressividade dos isolados inoculados nas mudas. Procurando-se uma correlação entre estes dados e as características morfológicas, constatou-se certa tendência dos isolados não inibidos pelo benomyl possuírem, em média, conídios mais curtos e finos, enquanto que os inibidos, conídios compridos e longos (Figura 3 e Quadro 33.).

Segundo a literatura, muitos fungos têm apresentado resistência ao benomyl como *Sphaeroteca fuliginea* (Schroer e Provvidenti, 1969), *Eurysiphe graminis* (Vargas Jr, 1973), *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum* (Clark et al., 1974) onde foi constatada tolerância ao benomyl a doses 10 vezes mais elevadas que as normais. Nos Estados Unidos, Ruppel (1975) concluiu que linhagens de *C. beticola* resistente a benzimidazóis não diferiram das sensíveis quanto ao crescimento e esporulação "in vitro" ou patogenicidade e esporulação "in vivo".

Para *C. coffeicola* não foi encontrado nenhum trabalho relacionado a ocorrência de isolados resistentes ou insensíveis ao benzimidazol, grupo ao qual o benomyl pertence, embora em outros fungos existam muitas pesquisas sobre resistência cruzada (Romeiro e Kimati, 1978; Fernandez et al., 1994; Fancelli, 1987) e a ocorrência de fungos insensíveis ao benomyl (Igarashi, 1984; Goes, 1995). O benomyl é um fungicida altamente vulnerável, pois se ocorrer uma mutação de ponto no gene altamente conservado da  $\beta$ -tubulina, confere a resistência ao benomyl (Kuramae-Izioka, 1995).

Embora não se tenha usado técnicas moleculares mais específicas para se comprovar uma possível resistência de isolados de *C. coffeicola*, a determinação da presença

de códon da Alanina ou Glicina, permite detectar isolados altamente ou moderadamente resistentes, respectivamente, ao benomyl (Yarden e Katan, 1993).

Os problemas de resistência relacionados aos benzimidazóis, não estão unicamente restritos ao seu uso intensivo, mas também pelo fato de atuarem em um único sítio específico do metabolismo do patógeno, e pela maioria dos fungos possuírem estirpes resistentes na sua população original (Delp, 1980). O fato da resistência aos benzimidazóis da resistência aos benzimidazoles serem resultante de um processo de seleção natural também é relatado por Guini (1991).

Os isolados apresentaram diferenças na sensibilidade a azoxystrobin, mas não se constatou aumento da inibição micelial com o aumento da concentração do produto de 10 para 100 µg/mL. O desempenho do azoxystrobin, na inibição do crescimento micelial dos isolados testados, foi semelhante ao tebuconazole, mas foi um pouco inferior ao propiconazole. O azoxystrobin não mostrou todo o seu potencial em controlar o alvo biológico, porque possui como característica a atuação preventiva e erradicante e inibindo o desenvolvimento dos fungos nos estádios iniciais de pós-germinação, apresentando atividade anti-esporulante. Este fungicida quando testado “in vitro”, tem seu potencial de controle do patógeno mascarado, pois necessita da presença do hospedeiro, para apresentar eficiência de 100%, além da necessidade de aplicação juntamente com algum adjuvante para melhorar o seu desempenho no controle do patógeno alvo (Salgado, 1998).

É importante ressaltar que os resultados do teste “in vitro” de fungicidas, é apenas utilizado como um referencial na caracterização de isolados de fungos ou mesmo de bactérias, e não serve para fornecer dados conclusivos da viabilidade e eficiência de um princípio ativo, para o controle de um alvo biológico, justamente porque nas condições



laboratoriais em que se realizaram os testes, excluiu-se os fatores ambiente e a interação patógeno-hospedeiro, entre outros que são importantes para o sucesso do controle.

### **7.6. Considerações gerais**

Os resultados obtidos através da esporulação dos isolados caracterizados em quatro meios de cultura, das dimensões dos conídios, da patogenicidade e sintomas, da caracterização molecular e da sensibilidade “in vitro” a fungicidas, não indicaram a existência de correlação entre essas características estudadas. Entre a patogenicidade e a caracterização molecular, foi constatada certa correlação, mas não o suficiente para se chegar a uma conclusão para o fato. Portanto, com os isolados utilizados e com as metodologias adotadas, não foi possível concluir a existência de mais de um gênero de *Cercospora*. Entretanto, pelas dimensões e cores dos conídios observados nas folhas do cafeeiro nos estados de São Paulo e de Minas gerais (C. Kurozawa, informação pessoal), não se exclui a possibilidade da existência de cercosporiose causada por mais de um gênero de fungo.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos do presente trabalho propiciaram as seguintes conclusões:

- Os isolados caracterizados não apresentam correlação entre procedência, agrupamento morfológicos de conídios, patogenicidade, sensibilidade “in vitro” a fungicidas e agrupamento pelo RAPD.
- A concentração mínima inibitória no teste “in vitro” difere em função dos produtos testados e dos isolados.
- Os fungicidas propiconazole e tebuconazole são os mais eficientes na inibição “in vitro” do crescimento micelial dos isolados.
- O fungicida benomyl inibe o crescimento micelial de dez isolados dos quinze testados “in vitro”.
- Foram detectados três grupos de isolados resultantes da mensuração dos conídios: os com menores, intermediários e maiores dimensões do comprimento, largura e número de septos.
- A maior esporulação do fungo ocorreu no meio de V-8.

- Não foi constatada correlação entre o crescimento micelial dos isolados e a produção de conídios nos meios de cultura de V-8, extrato de folha de café, extrato de pó de café, e de cenoura.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. B. *Plant pathology*, 4ed. San Diego: Academic Press, 1998. 635p.

ALMEIDA, S. R. *Doenças do cafeeiro*. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCA, M.; YAMADA, T. Fatores que afetam a produtividade. ed. Cultura do cafeeiro: Piracicaba, Instituto do Potássio e Fosfato, p.391-9, 1986.

ANDRADE, A. C., MAZER, P. E., MACHADO, J. C., VIEIRA, M. G. C. Efeito das misturas de fungicidas no tratamento de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) safra 1989/90. *Fitopatol. Bras.*, v.15, p.138, 1991.

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Can. J. Bot.*, v.73, suppl., p.940-45, 1995.

BARNETT, H. L., HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 1998. 218p.

BEM-ARIE, R. Benzimidazole penetration, distribution and persistence in postharvest treated peas. *Phytopathol.*, v. 65, p.1187-9, 1975.

BERGER, R. D., HANSON, E. W. Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. *Phytopathol.*, v. 53, p.286-94, 1963.

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA Faculdade de Ciências Agronômicas. *Normas para elaboração de dissertações e teses*. Botucatu, 1997. 35p.

- BERTIOLI, D. J., SCHLICHTER, U.H. A., ADAMS, M. J., BURROWS, P. R., STEINBICH, H. H., ANTONY, J. F. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, v.23, p.4520-3, 1995.
- BITANCOURT, A. A. As manchas de folha do cafeeiro. *O Biológico*, v.24, p.191-201, 1958.
- BOLLEN, G.J., SCHOUTEN, G. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Neth. J. Plant Pathol.*, v. 77, p.83-90, 1971.
- BRIGNANI NETO, F., TOLEDO, A. C. D., OLIVEIRA, D. A. Novos triazóis no controle da sarna da macieira por *Venturia inaequalis*. *Fitopatol. Bras.*, v. 14 p.138, 1989.
- BUCHENAUER, H. Analogy in the mode of action of fluotrimazole and clotrimazole in *Ustilago avenae*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.8, p.15-25, 1978.
- BUCHENAUER, H. Mechanism of action of triazolyl fungicides and relates compounds. In: LYR, H. *Modern selective fungicides: properties, applications, mechanism of action*. England: Longman Scientific Technical, 1987 p. 205-32.
- BUITRAGO-JARAMILLO, H., FERNÁNDEZ-BORRERO, O. Esporulacion "in vitro" de *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke. *Cenicafé*, Colômbia, v.33, p. 3-14, 1982.
- CADENA-GÓMEZ, G. Uso de la pulpa de café para el control de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berk y Cooke) en almacigos. *Cenicafé*, v.33, p.76-90, 1982.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. BASSAM, B.J., GRESSOFF, P.M.. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio Technol.*, v.9, p.553-7, 1991.
- CALOUZOUS, L., STALLKNECHT, G. Symptoms of *Cercospora* leaf spot sugar beets influenced by light intensity. *Phytopathol.*, v.58, p.799-800, 1967.

- CALVETE, E. O. BARUFFI, P.; ROESLER, E., FORCELINI, C. A. Efeito de fungicidas no controle de *Alternaria solani* em tomate. *Fitopatol. Bras.*, v. 17, p.186, 1992.
- CARDOSO, C. O.N., CARDOSO, E. J. B. N., TOLEDO, A. C. D., KIMATI, H., SOAVE, J. *Guia de fungicidas*. Piracicaba: Ed. Luiz de Queiroz., 1976. p.69-71.
- CASELA, C. R., BRANÇAO, N. Avaliação da resistência de linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) à mancha olho de rã (*Cercospora sojina* Hara). *Fitopatol. Bras.*, v.6, p.475-82, 1981.
- CASELA, C. R., NOGUEZ, M. A., LUZZARDI, G. C.; GASTAL, M. F. C. Mancha olho de rã (*Cercospora sojina* Hara) em soja (*Glycine max* (L.) Merrill.): estudo da variabilidade de hospedeiro. *Fitopatol. Bras.*, v.6, p.23-8, 1981.
- CASTAÑO, J. J. Mancha de hierro del cafeto. *Cenicafé*, v.7, p.313-27, 1956.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. Trop. Md. Hyg.*, v.70, p.181-4, 1967.
- CASTRO, N. R., COÊLHO, R. S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. *Summa Phytopathol.*, v.26, p.466-71, 2000.
- CASTRO, R. M. Seleção “in vitro” e “in vivo” de fungicidas e agentes biológicos para o controle de *Didymella bryoniae* (Auersw. ) Rehm. em melão (*Cucumis melo* L.). Piracicaba, 1994. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- CHARLESWORTH, B. SNIEGOWSKI, P., STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature(Lond.)* v.371, p.215-20, 1994.
- CHEN, M. D., LYDA, S. A., HALLIWELL, R. S. Environmental factors influencing growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. *Mycologia*. v.76, p.1150-7, 1979.

- CHUPP, C. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. Ithaca. New York. 667p., 1953.
- CLARK, E. M., BACKMAN, P. A., KABANA, R. R. Cercospora and Cercosporidium tolerance to benomyl and related fungicides in Alabama peanuts fields. *Phytopathol.*, v.64, p.146-77, 1974.
- COCHRANE, V. W. Physiology of Fungi, New York: Jonh Wiley, 1958. 232p.
- COMPÊNDIO de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 4.ed. São Paulo: Organizações Andrei, 1993. 672p.
- COOPERMAM C. J., JENKIS, S. F. Conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora blight* development in asparagus. *Phytopathol.*, v.76, p.617-22, 1986.
- COSTA, H., VENTURA, J. A . Efeito de fungicidas no controle da ferrugem (*Puccinia allii*) do alho. *Fitopatol. Bras.*, v.14, p.143, 1989.
- CURI, P. Análise de componentes principais. In: CURI, P. *Análise multivariada*; Faculdade de Ciências Médicas e Veterinárias e Zootecnia, p.67-79 (mimeografado). 1995.
- DAHMEN, H., STAUB, T. Protective, curative, and erradicant activity of difenoconazole against *Venturia inaequalis*, *Cercospora arachidicola*, and *Alternaria solani*. *Plant Dis.*, v.76, p.774-7, 1992.
- DAVIDSE, L. C. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J. e GEORGOPOULOS, S. G., ed. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p.60-70, 1982.
- DAVIDSE, L. C., FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl-carbamate to fungal tubulin as mechanism of resistance to this antimicotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Cell. Biol.*, v.72, p.174-93, 1977.

- DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R. W. (Ed.) *Systemic fungicides*. 2.ed. London: Logman, 1977. p.176-97.
- DEL PELOSO, M. C., FERNANDES, C. D., FILGUEIRAS, A. T., CHAVES, G. M. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. *Fitopatol. Bras.*, v.14, p.41-4, 1989.
- DELP, C. J. Coping with resistance to plant disease control agents. *Plant Dis. Rep.*, v.64, p.652-7, 1980.
- DELP, C. J., KLÖPPING, H. L. Performance attributes of a new fungicide and mite ovicide candidate. *Plant Dis. Rep.*, v.52, p.95-9, 1968.
- DIACHUN, S., VALLEAU, W. D. Conidial production in culture by *Cercospora nicotienae*. *Phytopathol.*, v.31, p.97-8, 1941.
- DUNCAN, S. BARTON, J. E., O'BREIN, P. A. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay, *Mycol. Res.* V.97, p.1075-82, 1993.
- ECHEDI, E. La chasparria de los cafetos causada por el hongo *Cercospora coffeicola* Berk e Cook. *Turrialba*, v.9, p.54-67, 1959.
- EL-GHOLL, N. E., ALFIRI JUNIOR, S. A., RIDIGS, W. H., SCHOULTIES, C. L. Growth and sporulation in vitro of *Cercospora apii*, *Cercospora arachidicola*, *Cercospora kikuchii* and other species of *Cercospora*. *Can. J. Bot.*, v.60, p.862-8, 1982.
- FANCELLI, M. I. *Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de Alternaria dauci (Kühn), Skolko resistentes ao fungicida iprodione*. Piracicaba, 1987. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.



- FERNANDES, C. D. Efeito de fatores do ambiente e da concentração de inóculo sobre a cercosporiose do cafeeiro. Viçosa, 1988. 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
- FERNÁNDEZ-BORRERO, O., CADENA-GOMÉZ, G. LÓPEZ-DUQUE, S., SERNA, H. B. de, ARANGO BERNAL, L. G. La mancha de hierro del cafeto (*Cercospora coffeicola* Berk y Cooke), biología, epidemiología y control, *Dixieme Colloque Scientifique International Sur Le Café*, Colombia, p.541-51, 1982.
- FERNÁNDEZ-BORRERO, O., LÓPEZ-DUQUE, S. Fertilizacion de plantulas d café y su relacion com la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berk y Cooke) *Cenicafe*. Colômbia, v.22, p.95-108, 1971.
- FORCELINI, C. A., REIS, E. M. Controle de *Bipolaris sorokiniana*, *Septoria nodorum*, *Fusarium graminearum* e *Erysiphe graminis tritici* pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. *Fitopatol. Bras.*, v.13, p.28-31, 1988.
- FORCELINI, C. A., REIS, E. M. Efeito do tratamento de sementes de cevada com fungicidas no controle e desenvolvimento da mancha reticulada da folha causada por *Helminthosporium teres*. (*Pyrenophora teres*.). *Fitopatol. Bras.*, v.12, p.83-7, 1987.
- FRAINE, P. J., CLOUGH, J. M., De FRAINE, P. J. A new series of broad-spectrum beta-methoxyacrylate fungicides with oxime ether sidechain. *Pestic. Sci.*, v.44, n.1, p.77-9, 1995.
- FUCHS, A ., VAN DEN BERG, G. A., DAVIDSE, L. C. A comparison of benomyl and thiophanates with respect to some chemical and systemic fungitoxic characteristics. *Pest Biochem. Physiol.*, v.2, p.191-205, 1972.

- GADHER, P., MERCER, E. I., BALDWIN, B. C., WIGGINS, T. E. A. Comparison of the potency of some fungicides as inhibitors of sterol 14-demethylation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.19, p.1-10, 1983.
- GALLI, F., CARVALHO, P. C. T. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) In: GALLI, F. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, 2ed. Agronômica Ceres, v.2, p.128-40, 1980.
- GALLI, M. A. Avaliação da eficiência do fungicida Amistar (azoxystrobin) no controle da mancha de cercospora (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro. In: Zeneca: desenvolvendo soluções de origem natural. São Paulo: Zeneca, 1998. 54p.
- GÁLVEZ, C. G. Control de la mancha Cercospora com fungicidas de eficiencia comprobada en roya del cafeto. II Simposio Latinoamericano sobre Cafeicultura, El Salvador, p.122-31, 1979.
- GARCIA JUNIOR, O. Eficiência do controle químico da cercospora (*Cercospora beticola*) na cultura da beterraba (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) na cultura da beterraba. In: Zeneca: desenvolvendo soluções de origem natural. São Paulo Zeneca.1998a. p.107-9.
- GARCIA JUNIOR, O. Incremento da produção na cultura do alho (*Allium sativum* L.) obtido no controle químico da mancha púrpura (*Alternaria porri* (Ell.) Cif. ) e ferrugem (*Puccinia alli*). In: Zeneca: desenvolvendo soluções de origem natural. São Paulo: Zeneca. 1998b. p.87-97.
- GEORGOPOULOS, S. G., DOVAS, C. A serious outbreak of stains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides in northern Greece. *Plant Dis. Rep.*, v.57, p.321-4, 1973.

- GHINI, R. *Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de Botrytis squamosa resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas* Piracicaba, 1987. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia ) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GODOY, C. V., BERGAMIN FILHO, A., SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) In: KIMATI, H. et al. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, 3ed. Agronômica Cerês, v.2, p.184-200, 1997.
- GOES, A. Podridão floral dos citros: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. [Sensu Arx, 1957], e controle da doença Piracicaba, 1995. Tese (Doutorado) – Escola Superior Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo.
- GOLDENBERG, C. W., COLE, H., DUICH, J. Comparison of systemic activity of thiabendazole and benomyl soil amendments against *Sclerotinia homeocarpa* and *Rhizoctonia solani* in the greenhouse. *Plant Dis. Rep.*, v.54, p.981-5, 1970.
- GOODE, M. J. e BROWN, G. R. Detection and characterization of *Cercospora citrullina* isolates readily in culture. *Phytopathol.*, v.60, p.1502-3, 1970.
- GOULART, A. C. P. Eficiência de fungicidas no controle de doenças foliares do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Summa Phytopathol.*, v.15, p.8, 1989.
- GRANJAL-MARTIN, M., SIMON, C. J., MUEHLBAUER, F. J. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathol.*, v.83, p.612-4, 1993.
- GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. New York: John Wiley, 1993. v.2, 458p.
- GUINI, R., KIMATI, H. Ocorrência de linhagens de *Botrytis squamosa* resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazoles e dicarboximidas. *Summa Phytopathol.*, v.15, p.246-56, 1989.

- GUTHRIE, P. A. I., MAGILL, C. W., FREDERIKSEN, R. A., ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathol.*, v.82, p.832-5, 1992.
- HASTE, A. C., GEORGOPOULOS, S. G. Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen Microbiol.*, v.67, p.371, 1971.
- HAWKER, L. E. *Physiology of fungi*, London: London University Press, 1950. 458p.
- HAWKER, L. E. Environmental influences on reproduction. In: AINSWORTH, G. C. e SUSSMAN, A.S., *The fungi an advanced treatise*. Ed. New York Academic Press Inc. v.2, p.435-469, 1966.
- HENNING, A. A., YORINORI, J. T., FRANÇA NETO, J. B., KRZYZANOWSKI, F. C. Transmissibilidade e controle dos principais patógenos em sementes de soja. *Fitopatol. Bras.*, v.17, p.171, 1992. (resumo).
- HENRY, M. J. Mode of action of flusilazol. *Phytopathol.*, v.77, p.987, 1987.
- HERSHBERGER, L. W., ARCE, G. T. *Benomyl*. Geneva: World Health Organization., 1993. 183p.
- HOFFMAN, J. A. Control of common and dwarf bunt of wheat with fungicides. *Plant Dis. Rep.*, v.55, p.1132-5, 1971.
- HU, J., QUEIROS, C. F. Identification of broccoli and cauliflower cultivar with RAPD markers. *Plant Cell Rep.*, v.10, p.505-11, 1991.
- IGARASHI, S. *Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica, patogênica serológica do Colletotrichum spp. do morango (Fragaria spp.)*. Piracicaba, 1984. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", - Universidade de São Paulo.

- INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. *Cultura do café no Brasil: Manual de recomendações*. 5ed. Rio de Janeiro, 1985, 580p.
- IZIOKA-KURAMAE, E. E. *Caracterização morfológica, patogênica e molecular de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz e Sacc. In Penz, agente causal da podridão floral dos citros*. Botucatu, 1995. 138p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- JUDD, R. W. JUNIOR e PETERSON, J. L. Cercospora amphakodes: Infection and disease development in *Phlox divaricata*. *Phytopathol.*, v.64, p.1108-11, 1974.
- KATO, T. Sterol biosynthesis in fungi, a target for broad spectrum fungicides. In: HAUG, G., HOFFMANN, H. *Chemistry of plant protection: sterol biosynthesis inhibitors and anti-feeding compounds*. Springer-Verlag, 1986. p.1-24.
- KILPATRICK, R. A., JOHNSON, H. W. Sporulation of Cercospora species on carrot leaf decoction agar. *Phytopathol.*, v.46, p.180-1, 1956.
- KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. *Agrotécnica*, v .1, p.5-7, 1987.
- KOELLER, W. Mode of action of fungicides in real plant pathogens. In: VII INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, Glasgow, Scotland. Bri. Soc. Plant. Pathol.,v.5, n.5, 1998.
- KRAMER, W. Chemistry of sterol-biosynthesis inhibiting fungicides. In: HAUG, G. , HOFFMANN, H. *Chemistry of plant protection: sterol biosynthesis, inhibitors and anti-feeding compounds*. Springer-Verlang, 1986. p.25-64.

- KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *UNIMAR*, v.19, p.683-9, 1997.
- LANGE, L., BREINHOULT, J., RASMUSSEN, F. W., NIELSE, R. I. Microbial fungicides - the nature choice. *Pestic. Sci.*, v.39, p.155-60, 1993.
- LEROUX, P. Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pestic. Sci.*, v.47, p.191-7, 1996.
- LILLY, V. G., BARNETT, H. L. Growth. In: LILLY, V. G., BARNETT, H. L. *Physiology of fungi*. New York: McGraw Hill, 1951.
- LILLY, V. G. e BARNETT, H. L.. *Physiology of fungi*. New York: McGraw-Hill, 1951. 464p.
- LILLY, Y. G., BARNETT, H. L. Growth. In: LILLY, V. G., BARNETT, H. L. *Physiology of fungi*. New York: Mc Graw Hill, 1951.
- LINE, R. F. Chemical control of flag smut of wheat. *Plant Dis. Rep.* v.56, p.636-40, 1972.
- LOCH, L. C., CARVALHO, M. C., OLIVEIRA, L. M. Esporulação de *Cercospora capsici* em meio de cultura. *Experientiae*, v.19, p.259-86, 1975.
- LOPES, M. E. B. M., LASCA, D. H. C., GUILHELM, D. J., MONTES, S. M. N. M. CEZARIO, A. C. , CERAVOLO, L. C. Controle das "cercosporioses" do amendoim (*Arachis hypogaea*). *Summa Phytopathol.*, v.19, p.50-1, 1993.
- MARGOT, P., HUGGENBERGER, F., AMREIN, J. , WEISS, B. A new broad-spectrum strobilurin fungicide. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE, 1998, England. British Crop Protection Council, 1998 p.375-82.
- MILLER, A. *The strobilurin race heats up*. *Chem. Ind. (London)*, v.1, n.7, 1997. p.56.

- MILLER, M. W., FLETCHER, J. T. Benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* isolates from glasshouse crops. *Transactions British Micological Society*, London. V.62, p.99-103, 1974.
- MITOV, N. Investigaciones sobre las enfermedades del cafeto en Cuba. *Revista Agricultura*, Cuba, v.4, p.5-31, 1971.
- MORAES, S. A. *Cercospora arachidicola* Hori: Obtenção de inóculo, inoculação e avaliação da resistência em amendoim (*Arachis hypogaea* (L.)). Piracicaba, 1977. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo.
- MORAES, S. A., SALGADO, C. L. Meio de cultura semi-sintético para esporulação de *Cercospora arachidicola* HORI. *Summa Phytopathol.* v.5, p.65-74, 1979.
- MORISON, D. F. *Multivariate statistical methods*. Mc Graw Hill, New York, 1997, 412p.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.*, v.155, p.335-51, 1987.
- MURAKISHI, H. H., HONMA, S., KNUTSON, R. Inoculum production and seedling evolution of celery for resistance to *Cercospora apii*. *Phytopathol.* v.50, p.605-7, 1960.
- NAGEL, C. M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. *Physiology*, v.24, p.1101-10, 1934.
- NAGEL, C. M. e DIETZ, S. M. Sporulation on five species of *Cercospora* in pure culture. *Phytopathol.*, v.22, p.30(abs.), 1932.
- NAZARENO, N. R. X. New fungicide use in potatoes in Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998, Glasgow. Br. Soc. *Plant Pathol.*, 5.6.(abstr.), 1998.
- NENE, Y. L., THAPLIYAL, P. N. Systemic fungicides. In: *Fungicides in plant disease control*. 2.ed. New Delhi: IBH Publishing, 1979 p.212-349.

- NOGUEIRA, E. M. C. Controle da ferrugem (*Tranzschelia discolor* (Fck) Tranz. , Litv.) em nectarina *Prunus persica* var. *nucipersica*. *Summa Phytopathol.*, v.17, p.28, 1991.
- NOGUEIRA, E. M., SANTOS, A. J. T. Avaliação de fungicidas no controle do mal de sigatoka ou sigatoka amarela da bananeira. *Summa Phytopathol.*, v.18, p.34, 1992.
- PEREIRA, R. M. F. V. *Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de Colletotrichum gloeosporioides “sensu ARX, isolados de pimentão (Capsicum annuum L.) e jiló (Solanum gilo Raddi), e seu controle químico*. Piracicaba, 1995. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PICININI, E. C., FERNANDES, J. M. C. Controle da ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) em trigo (*Triticum aestivum*) no sul do Brasil. *Fitopatol. Bras.*, v.14, p.148, 1989
- PICININI, E. C., PRESTES, A. M., FERNANDES, J. M. C. Teste com fungicidas triazóis no controle de doenças da parte aérea do trigo no ano de 1985. *Fitopatol. Bras.*, v.12, p.127, 1989.
- POLACH, F. J. e MOLIN, W. T. Benzimidazole resistant mutant derived from a single ascospore culture of *Botryotinia fuckeliana*. *Phytopatol.* v.65, p.902-4, 1975.
- POZZA, A. A. A., ZAMBOLIN, L., POZZA, E. A., COSTA, H., VALE, F. X. R. do. Controle químico da mancha de olho pardo (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro em condições de viveiro. *Fitopatol. Bras.*, v.22, p.543-5, 1997.
- QUEIROZ, M. Q., MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora nicotianae*. *Fitopatol. Bras.* v. 18, p.545-7, 1993.



- REIS, A., OLIVEIRA, S. M. D. Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Summa Phytopathol.* v.19, p.34, 1993. (Abst.).
- REMIRO, D., KIMATI, H. Resistência a benomyl e tiofanato em *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. *O Biológico*, v.40, p.22-4, 1974.
- RIBEIRO, Z. M. A., MELLO, S. C. M., FURLANETTO, C., FIGUEIREDO, G., FONTES, E. M. G. Characteristics of *Cercospora carisis*, a potential biocontrol agent of *Cyperus rotundus*. *Fitopatol. Bras.*, v.11, p.513-19, 1997.
- ROLPH, F. J. *Adaptative hierarchical clustering schemes*. *Systematic Zoology*, v.16, p.58-82, 1970.
- ROSA, C. T., MENEZES, M. Caracterização patogênica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. *Fitopatol. Bras.*, v.26, p.141-7, 2001.
- RUPPEL, E. G., JENKINS, A. D., BURTCH, L. M. Persistence of benomyl- tolerant strains of *Cercospora beticola* in the absence of benomyl. *Phytopathol.* v.70, p.25-6, 1980.
- SAIKI, R., GELFAND, D. H., STOFFER, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T. MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymeras. *Science*, v.2239, p.487-91, 1988.
- SALGADO, L. O. Desempenho do produto Piori 250 Sc BIW (azoxystrobin) no controle do "mal-de-sigatoka" (*Mycosphaerella musicola* Leach) na cultura da bananeira (*Musa* spp.). In: *ZENECA: desenvolvendo soluções de origem natural*. São Paulo: Zeneca, 1998 p. 143-145.
- SAMUELS, G. J., SIFFERT, K. A. The impact of molecular character on systematics of filamentous a ascomycetes. *Annu. Ver. Phytopathol.*, v.33, p.37-67, 1995.

- SCHROEDER, W. T. , PROVVIDENTI, R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. *Plant Dis. Report.*, v.53, p.271-5, 1969.
- SHECHETER, R. V., HALL, R. Symposium of the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi -I. Electrophoretic protein profile as criteria in the taxonomy of the fungi and algae. *Bull. Torrey. Bot. Club*, v.100, p.253-9, 1973.
- SIDDIQI, M. A. Incidence, development and symptoms of *Cercospora* disease of coffee in Malawi. *Transactions of the British Mycological Society*, v.54, p.415-21, 1969.
- SIJPESTEIJN, A. K. Effect on fungal pathogens. In: MARSH, R. W. (Ed.). *Systemic fungicides*. 2. ed. London: Longman, 1977. 173p.
- SILVA, M. F., CAVALCANTI, M. A., POROCA, D. M., LIMA, D. M. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribaea* e *C. henningsii*, agentes causais de manchas foliares de mandioca. *Fitopatol. Bras.*, v.13, p.54-8, 1988.
- SILVEIRA, A P., GUERREIRO, G. , FURTADO, E. Avaliação do fungicida Amistar WG(azoxystrobin) para o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e da cercosporise (*Cercospora coffeicola*) na cultura do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 1998, Poços de Caldas. p.148-50.
- SMITH, D. H. A simple method for producing *Cercospora arachidicola* conidial inoculum. *Phytopathol.* v.61, p.11414, 1971.
- SNETH, P. H. A., SOKAL, R. R. *Numeral taxonomy*. San Francisco: W. H. FREEMAN, 1973, 223p.
- SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A. E., MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* v.41, p.265-81, 1992.

- STAVELY, J. R., NIMMO, J. A. Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotinae*. *Phytopathol.*, v.58, p.1372-6, 1969.
- TANKSLEY, S. D. YOUNG, N. D. PATERSON, A. H. BONIERBALE, M W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science, *Biotechnology*, v.7, p.257-64, 1989.
- TINGEY, S. V.; RAFALSKI, A. J.; WILLIAMS, J. G. K.; SEBASTIAN, S. PLANT MOLECULAR BIOLOGY 2 (R. G. Herman and B. A . Larkins, Eds), Proceedings of a advanced study institute on plant molecular biology, may 14-23, 1990, Elman, Bavaria, Germany. Plenum press. New York. P. 263-68, 1991.
- TÖFOLI, J. G. Ação da chuva no desempenho de azoxystrobin para o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro (*Coffea arabica*). In: *ZENECA:desenvolvendo soluções de origem natural*. São Paulo: ZENECA, 1998. p. 121-129.
- TUYL, J. M. van, DAVIDSE, L. C., DEKKER, J. Lack of cross resistance to benomyl and thiabendazole in some strains of *Aspergillus nidulans*. *Netherlands Journal of Plant Pathol.*, v.80, p.165-8, 1974.
- VARGAS, JR., J. M. A. benzimidazole resistant strain of *Erysiphe graminis*. *Phytopathol.*, v.63, p.1366-8, 1973.
- VEIGA, P. *Cercospora sojina* HARA: Obtenção de inóculo, inoculação e avaliação da resistência da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba, 1973. 32p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.
- VEIGA, P., KIMATI, H. *Cercospora sojina* Hara: inoculação e avaliação da resistência em soja (*Glycine max* (L.)Merr) *Revista do Centro de Ciências Rurais*, p.7-15, 1976.

- WALLIN, J. R., LOONAN, D. V. Effect of leaf wetness duration and air temperature on *Cercospora beticola*. Infection of sugarbeet. *Phytopathol.*, v.1, p.546-9, 1971.
- WAUGH, R., POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. *Tibtech*, v.10, p.186-91, 1992.
- WELLMAN, F. L., QUESADA, T. R. Certain factors limiting *Cercospora* disease on coffee leaves. México, Secretaría de Agricultura y Ganadería, p.246-51, 1951 (Folheto Misceláneo,4).
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.7213-8, 1990.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic Acids Res.*, v.19, p.861-6, 1991.
- WILES, T. Projeto de uso de equipamentos de pulverização agrícola na América Latina (Parte II Brasil), In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE AGROQUÍMICOS: EFICIÊNCIA, ECONOMIA E PRESERVAÇÃO DA SAÚDE HUMANA E DO AMBIENTE, 1996, p.16-29.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNAs polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.6531-35, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELINK, A. R., LIVAK, K. I RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.6531-5, 1990.
- YPEMA, H. L., GOLD, R. E. Kresoxim-methyl: modification of naturally occurring to produce a new fungicide. *Phytopathol.*, v.83, p.4-19, 1999.

ZAMBOLIN, L., VALE, F. X. DO, PEREIRA, A. A., CHAVES, G. M. Manejo Integrado das doenças do cafeeiro In: I ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE. Ed. Viçosa: Livro de palestras, 1999. p.134-215.