

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

RAIANY GUSSO MACHADO

**CARACTERIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA
CLOROFILA *a*, ANATOMIA E HISTOQUÍMICA EM FOLHAS
DE *Coffea canephora* PIERRE EX FROEHNER
E *Psidium guajava* L. COLONIZADAS POR ALGAS DO
GÊNERO *Cephaleuros* KUNZE**

VITÓRIA

2011

RAIANY GUSSO MACHADO

**CARACTERIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA
CLOROFILA *a*, ANATOMIA E HISTOQUÍMICA EM FOLHAS
DE *Coffea canephora* PIERRE EX FROEHNER
E *Psidium guajava* L. COLONIZADAS POR ALGAS DO
GÊNERO *Cephaleuros* KUNZE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal.
Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Camilla Rozindo Dias Milanez.

VITÓRIA

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M149c Machado, Raiany Gusso, 1984-
Caracterização da fluorescência da clorofila *a*, anatomia e histoquímica em folhas de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner e *Psidium guajava* L. colonizadas por algas do gênero *Cephaleuros* Kunze / Raiany Gusso Machado. – 2011. 78 f. : il.

Orientador: José Aires Ventura.

Coorientadora: Camilla Rozindo Dias Milanez.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Alga. 2. Café. 3. Goiaba. 4. Anatomia vegetal. 5. Fluorescência. 6. Espírito Santo (Estado). I. Ventura, José Aires, 1954-. II. Milanez, Camilla Rozindo Dias. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

RAIANY GUSSO MACHADO

**CARACTERIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*,
ANATOMIA E HISTOQUÍMICA EM FOLHAS
DE *Coffea canephora* PIERRE EX FROEHNER
E *Psidium guajava* L. COLONIZADAS POR ALGAS DO
GÊNERO *Cephaleuros* KUNZE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 17 de março de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Aires Ventura
Universidade Federal do Espírito Santo
INCAPER
Orientador

Prof.^a Dr.^a Camilla Rozindo Dias Milanez
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Dr. Hélcio Costa
INCAPER
Examinador Externo

Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Dedico à minha mãe, Sônia Domingas Gusso Machado.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela infraestrutura.

À FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo), pela bolsa de mestrado.

Ao INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), por disponibilizar o local de coleta.

Ao Prof. Dr. José Aires Ventura (INCAPER/UFES), pela orientação e por apresentar esse tema desafiador, porém muito interessante e gratificante.

À Prof.^a Dr.^a Camilla Rozindo Dias Milanez (UFES) por me orientar nas análises anatômicas e por toda ajuda.

À Prof.^a Dr.^a Rosane Maria de Aguiar Euclides (UFV), *in memoriam*, pelo acompanhamento nas análises ultraestruturais e auxílio na taxonomia.

Ao Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol (UFES), por fazer parte da banca examinadora e pelas sugestões sempre valiosas.

Ao Dr. Hécio Costa (INCAPER) por fazer parte da avaliação dessa pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Diolina Moura Silva (UFES) por disponibilizar os equipamentos para as análises de fluorescência da clorofila *a*.

À Prof.^a Dr.^a Valéria de Oliveira Fernandes (UFES) pelas sugestões sempre valiosas sobre taxonomia e por todo ensinamento.

À Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES) por toda ajuda durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo (UFRJ) por estar sempre disposto a tirar dúvidas sobre a taxonomia desse grupo de algas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (UFES) pelo conhecimento transmitido nas disciplinas.

Ao NEF (Núcleo de Estudos da Fotossíntese/UFES): Renata, Vinícius, Leonardo e Joilton pela contribuição nas análises de fluorescência da clorofila *a*. À Evelline, Magda, Priscilla e Vinícius, pela ajuda nas coletas.

À minha mãe, Sônia e aos meus irmãos, Raniely, Rauther e Rafaela, pela paciência e apoio durante a realização desse trabalho e em todas as escolhas da minha vida.

Ao Leonardo, pela paciência e ajuda, principalmente nos momentos em que estava cansada e desanimada.

Às minhas amigas Juliana, Pollyana e Thaís, por toda ajuda e amizade.

À minha prima Brígida, pela ajuda em uma das coletas.

Aos companheiros de mestrado: Anny, Diego, Inayá, Larissa, Levi, Magda, Marcos Thiago, Priscilla e Stéfano. Em especial, ao Adriano, Hiulana, Jéssica e Natália pelas contribuições nessa pesquisa e amizade.

Ao secretário do PPGBV, Ricardo Oliveira Celestino, por estar sempre disposto a ajudar.

À Bete, da equipe de apoio, pelo carinho e alegria.

Aos colegas da turma Ciências Biológicas 2003/2. Agradeço aos que ainda tenho contato e também àqueles que não tenho, mas que lembro com muito carinho.

“Toda a sabedoria vem do Senhor Deus, ela sempre esteve com ele. Ela existe antes de todos os séculos. Quem pode contar os grãos de areia do mar, as gotas de chuva, os dias do tempo? Quem pode penetrar a sabedoria divina, anterior a tudo? A sabedoria foi criada antes de todas as coisas, a inteligência prudente existe antes dos séculos! O Verbo de Deus nos céus é fonte de sabedoria, seus caminhos são os mandamentos eternos.”

Eclesiástico 1, 1-5.

RESUMO

Existem registros de elevada incidência de algas do gênero *Cephaleuros* (Trentepohliaceae) nas culturas de *Psidium guajava* (goiabeira) e *Coffea canephora* (café Conilon) no norte do estado do Espírito Santo, principal região produtora de café Conilon do Brasil. Essa pesquisa objetivou identificar os táxons de algas que colonizam folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* do norte do Espírito Santo e avaliar as respostas da fluorescência da clorofila *a*, anatomia e histoquímica das folhas colonizadas. O material vegetal foi coletado na Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), município de Sooretama, ES. Para anatomia, o material foi fixado, incluído, seccionado, corado e montado. A histoquímica foi realizada com cloreto férrico, floroglucinol acidificado e sudan IV. Material fresco foi seccionado para taxonomia. Bibliografias especializadas foram utilizadas na identificação dos táxons de algas. Para micromorfologia as amostras foram fixadas, desidratadas, submetidas ao ponto crítico de CO₂, metalizadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura. A fluorescência da clorofila *a* foi determinada por medidor portátil. As folhas de *C. canephora* e *P. guajava* apresentaram colonização na face adaxial. As análises anatômicas evidenciaram epiderme adaxial achatada, lignificada e com acúmulo de compostos fenólicos. O teste com sudan IV revelou a presença das algas no espaço subcuticular (*Cephaleuros*). *C. canephora* (com *Cephaleuros* sp.1) e *P. guajava* (com *Cephaleuros* sp.2) apresentaram colonização por algas de espécies diferentes. A fluorescência da clorofila *a* indicou estresse em folhas de café Conilon com maior densidade e diâmetro das lesões. Os resultados obtidos evidenciaram que a presença de algas do gênero *Cephaleuros* causou alterações na fluorescência da clorofila *a*, anatomia e histoquímica foliar das plantas colonizadas.

Palavras-chave: *Cephaleuros*. Taxonomia. *Coffea canephora*. *Psidium guajava*. Anatomia foliar. Fluorescência da clorofila *a*.

ABSTRACT

There are records of high incidence of genus's algae *Cephaleuros* (Trentepohliaceae) in *Psidium guajava* (guava) and *Coffea canephora* (Conilon coffee) at north of Espírito Santo state, the main Brazilian state Conilon coffee producer. This research aimed identify the algae taxa that colonize *Coffea canephora* and *Psidium guajava* leaves at north of Espírito Santo and evaluate chlorophyll *a* fluorescence, anatomy and histochemical reactions of colonized leaves. The plant material was collected at Experimental Farm of Capixaba Institute Research, Technique Assistance and Rural Extension (INCAPER) at Sooretama city, ES. For anatomic analysis the sample was fixed, included, sectioned, stained and mounted. The histochemical was made with ferric chloride, acidified floroglucinol and sudan IV. Fresh material was section for taxonomy. Specialized bibliographies were used in the identification of the algae taxa. For micromorphology analysis samples were fixed, dehydrated, submitted to CO₂ critical point, metalized and observed in a scanning electron microscope. Chlorophyll *a* fluorescence was determined through a portable measurer. *C. canephora* and *P. guajava* leaves presented colonized adaxial surface. Anatomical analysis showed flat adaxial epidermis, lignified and with phenolic compounds accumulation. Sudan IV test revealed the presence of algae in subcuticular space (*Cephaleuros*). *C. canephora* (*Cephaleuros* sp.1) and *P. guajava* (*Cephaleuros* sp.2) were colonized by different species of algae. The Chlorophyll *a* fluorescence indicated stress in Conilon coffee leaves with higher density and lesions diameter. The results obtained had shown that the presence of the algae causes alterations in leaf anatomy and chlorophyll *a* fluorescence of the colonized plants.

Keywords: *Cephaleuros*. Taxonomy. *Coffea canephora*. *Psidium guajava*. Leaf anatomy. Chlorophyll *a* fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ciclo de vida de *Cephaleuros* ilustrando um homotalo, isogametas e alternância heteromórfica de gerações..... 26
- Figura 2 - Esquema Z para organismos fotossintetizantes produtores de O₂. Detalhe para os aceptores de elétrons do FSI, clorofila, A₀; quinona, A₁; proteínas ferro-sulfurosas e Ferredoxina.....32
- Figura 3 - Representação de alguns parâmetros derivados do teste JIP.....32
- Figura 4 - Vista aérea da Fazenda Experimental de Sooretama do INCAPER, Sooretama, ES. Detalhe das plantações de café Conilon e goiabeira.....34
- Figura 5 - Temperaturas mínima, média e máxima do ar e precipitação máxima no ano de 2010 do município de Sooretama, ES.....35
- Figura 6 - Folhas de *Coffea canephora* colonizadas por *Cephaleuros* sp.1. Estágios sucessivos de desenvolvimento das lesões. Detalhes de lesões com estruturas reprodutivas e com fungo. Folhas de *Psidium guajava* colonizadas por *Cephaleuros* sp.2. Estágios sucessivos de desenvolvimento das lesões. Detalhes de lesões com estruturas reprodutivas.....43
- Figura 7 - Estruturas reprodutivas e sistema prostrado. Gametângios em desenvolvimento inicial e maduros, esporangióforos com esporângios iniciais e maduros e tipos de setas de *Cephaleuros* sp.1 em folhas de *Coffea canephora*.....49
- Figura 8 - Estruturas reprodutivas e sistema prostrado com ramificações. Gametângios, esporangióforos com esporângios iniciais e maduros e tipos de setas de *Cephaleuros* sp.2 em folhas de *Psidium guajava*.....50
- Figura 9 - Gametas livres e aprisionados no gametângio e zoósporos de *Cephaleuros* sp.1 em folha de *Coffea canephora*. Gametas de *Cephaleuros* sp.2 em folha de *Psidium guajava*.....51

Figura 10 - Eletromicrografias da superfície foliar de <i>Coffea canephora</i> colonizada por <i>Cephaleuros</i> sp.1. Estruturas reprodutivas, esporangióforos com esporângios iniciais e maduros e gametângios.....	52
Figura 11 - Eletromicrografias da superfície foliar de <i>Psidium guajava</i> colonizada por <i>Cephaleuros</i> sp.2. Estruturas reprodutivas e tipos de setas. Esporangióforos com esporângios iniciais e maduros. Gametângios.....	53
Figura 12 - Cortes transversais do limbo de <i>C. canephora</i> colonizado por <i>Cephaleuros</i> sp.1. Lesões iniciais, intermediárias e avançadas. Evidenciando a alga no espaço subcuticular, lignificação de paredes de células epidérmicas e acúmulo de compostos fenólicos em células epidérmicas e no parênquima clorofiliano e desenvolvimento de necrose.....	57
Figura 13 - Cortes transversais do limbo de <i>P. guajava</i> colonizado por <i>Cephaleuros</i> sp.2. Evidenciando acúmulo de compostos fenólicos nas células epidérmicas e revelando a alga na região subcuticular.....	58
Figura 14 - Cortes transversais do limbo de <i>C. canephora</i> colonizado por <i>Cephaleuros</i> sp.1. Divisões anticlinais das células do parênquima paliçádico causando espessamento.....	58
Figura 15 - Parâmetros da fluorescência da clorofila a, após teste JIP, obtidos em folhas lesionadas e não lesionadas de <i>P. guajava</i> , da coleta de dezembro de 2010. Foi aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=12$). Cada parâmetro foi normalizado usando a média de folhas com e sem lesões.....	63
Figura 16 - Parâmetros da fluorescência da clorofila a, após teste JIP, obtidos em folhas lesionadas e não lesionadas de <i>C. canephora</i> , da coleta de dezembro de 2010. Foi aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=12$). Cada parâmetro foi normalizado usando a média de folhas com e sem lesões.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características morfológicas das espécies de <i>Cephaleuros</i> que colonizam folhas de café Conilon e goiabeira do município de Sooretama, ES.....	48
Tabela 2 - Espessura dos tecidos foliares de <i>C. canephora</i> (μm) não lesionados e lesionados por <i>Cephaleuros</i> sp.1.....	59
Tabela 3 - Espessura dos tecidos foliares de <i>P. guajava</i> (μm) não lesionados e lesionados por <i>Cephaleuros</i> sp.2.....	59

LISTA DE SIGLAS

ABS - Fluxo de absorção.

ET_0 - Fluxo de elétrons transportados de Q_A^- até PQ, quando todos os RC estão abertos.

FSI - Fotossistema I.

FSII - Fotossistema II.

PI_{ABS} - Índice de performance parcial. Produto de RC/ABS, por $\phi_0/(1-\phi_0)$ e por $\psi_0/(1-\psi_0)$.

PI_{TOTAL} - Índice de performance total. Produto do PI_{ABS} por $\delta R_0/(1-\delta R_0)$.

PQ - Plastoquinona.

PQH_2 - Plasto-hidroquinona.

Q_A^- - Quinona A reduzida.

RC - Centros de reação.

RC/ABS - Densidade de centros de reação ativos do FSII.

RE_0 - Fluxo de elétrons transportados do *pool* de PQ até os aceptores finais de elétrons de FSI, quando todos os RC estão abertos.

RE_0/RC - Fluxo específico de energia para o transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores de elétrons do FSI.

$\psi_0/(1-\psi_0)$ - Eficiência das reações no intersistema.

$\delta R_0/(1-\delta R_0)$ - Desempenho das reações de oxidação e redução no FSI.

$\delta R_0 = RE_0/ET_0$ - Eficiência com que um elétron pode se mover do intersistema de aceptores de elétrons reduzidos para o acceptor final de elétrons do FSI.

$\phi R_0 = RE_0/ABS$ - Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o acceptor final de elétrons do FSI.

$\phi_0/(1-\phi_0)$ - Eficiência das reações fotoquímicas do FSII.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	FAMÍLIA TRENTEPOHLIACEAE.....	18
2.2	GÊNEROS PERTENCENTES À FAMÍLIA TRENTEPOHLIACEAE.....	22
2.3	GÊNERO <i>Cephaleuros</i> KUNZE.....	23
2.4	REPRODUÇÃO EM TRENTEPOHLIACEAE.....	25
2.5	ASSOCIAÇÕES TRENTEPOHLIACEAE E FUNGOS.....	26
2.6	PLANTAS HOSPEDEIRAS: <i>Coffea canephora</i> PIERRE EX FROEHNER E <i>Psidium guajava</i> L.....	27
2.7	ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS COLONIZADAS POR ALGAS.....	29
2.8	FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> DE FOLHAS COLONIZADAS POR MICRORGANISMOS.....	29
2.8.1	Parâmetros relacionados ao FSI	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	GERAL.....	33
3.2	ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	ÁREA DE ESTUDO E MATERIAL BOTÂNICO.....	34
4.2	PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA DO AR.....	35
4.3	TAXONOMIA DAS ALGAS.....	36
4.4	ANÁLISE ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA.....	37
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	38
4.6	CINÉTICA DE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE.....	38
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	MORFOLOGIA DA LESÃO.....	40
5.2	TAXONOMIA DAS ALGAS QUE COLONIZAM <i>Coffea canephora</i> E <i>Psidium guajava</i>	44
5.3	ANÁLISE ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA.....	54

5.4	FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i>	60
6	CONCLUSÕES	64
7	REFERÊNCIAS	65
	GLOSSÁRIO	71
	APÊNDICES	74
	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos mais importantes do mercado mundial agropecuário, sendo uma significativa fonte de renda para diversos países da América Latina, África e Ásia (DAMATTA, 2004) e o estado do Espírito Santo é o maior produtor mundial de café Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) (PORTO; SILVA; BESTÉTTI, 2010). No Brasil a produção de goiabeira (*Psidium guajava* L.) cresce a cada ano devido às condições favoráveis ao seu cultivo (ROZANE; OLIVEIRA; LIRIO, 2003).

Essas culturas são hospedeiras naturais de algas da família Trentepohliaceae, que apresenta ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais (ALMEIDA; VASCONCELOS; FREIRE, 1985; BROOKS, 2004; JOUBERT; RIJKENBERG, 1971; LIBERATO; COSTA; VENTURA, 1996; MARLATT; ALFIERI, 1981; SCOT, 2008).

As algas da família Trentepohliaceae são aerofíticas. Algumas são endofíticas ou parasitárias, enquanto outras crescem em estreita associação com fungos. A identificação dos táxons de *Cephaleuros* (Trentepohliaceae) é difícil, uma vez que necessita de uma análise minuciosa das características morfológicas das espécies, sendo necessário, em alguns casos, investigações moleculares.

Os estudos relacionados à família Trentepohliaceae abordam principalmente a taxonomia e a incidência dessas algas nos hospedeiros (levantamentos fitopatológicos). Até o momento, pouco se sabe sobre as respostas anatômicas e fisiológicas das plantas colonizadas por essas algas.

A técnica que analisa a fluorescência da clorofila *a* tem permitido uma avaliação apurada do estado funcional do aparato fotossintético, sendo uma metodologia adequada para a análise do estado fisiológico de plantas sob estresse biótico (STRASSER; TSIMILLI- MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004, 2005). Os estudos anatômicos também assumem grande importância, pois fornecem detalhes da resposta estrutural do hospedeiro sob estresse (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995, apud LORENZETTI, 2009; SILVA et al., 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, as análises anatômicas têm grande importância para a identificação dos gêneros da família Trentepohliaceae.

A presente pesquisa presume que *Cephaleuros* spp. coloniza folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava*, da região norte do estado do Espírito Santo e que há alterações na fluorescência da clorofila *a*, anatomia e histoquímica das folhas colonizadas. Portanto, este estudo auxiliará na identificação adequada dessas algas, além de fornecer informações sobre as respostas dos seus hospedeiros à colonização pelas mesmas, de modo a preencher a grande lacuna de dados existentes no Brasil e no mundo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA TRENTEPOHLIACEAE

A família Trentepohliaceae é a única da ordem Trentepohliales, pertence à classe Ulvophyceae e divisão Chlorophyta (LÓPEZ-BAUTISTA; WATERS; CHAPMAN, 2002; SUTO; OHTANI, 2009; THOMPSON; WUJEK, 1997). Existe uma discussão sobre a qual classe a família Trentepohliaceae pertence. Van den Hoek (1995) considera essa família pertencente à classe Trentepohliophyceae.

Os sistemas de classificação em alto nível hierárquico (classe e divisão) têm uma base científica e outra filosófica. Cada um tem suas vantagens e desvantagens. O sistema de van den Hoek (1995) é bastante coerente, mas não considera a biologia molecular como outros autores. O sistema de Thompson e Wujek (1997) leva em consideração estudos ultraestruturais do aparato flagelar de gametas e zoósporos (CHAPMAN, 1980, 1981; CHAPMAN; HENK, 1983) para incluir a família Trentepohliaceae na classe Ulvophyceae. Raven (1987) baseou-se nas características bioquímicas, biofísicas e fisiológicas, e insere a família Trentepohliaceae na classe Pleurastrophyceae.

Estudos posteriores de biologia molecular também incluem essa família na classe Ulvophyceae. López-Bautista, Waters e Chapman (2003) estudaram a filogenia dos gêneros de Trentepohliaceae e neste estudo incluíram essa família à classe Ulvophyceae. Suto e Ohtani (2009) não realizaram investigações moleculares, porém consideraram essas algas pertencentes à classe Ulvophyceae.

O número de gêneros dessa família também é discutido. O gênero *Physolinum* Printz foi incluído na família Trentepohliaceae por Printz (1939). Porém estudos mais recentes como de Thompson e Wujek (1997) excluem este gênero pelo fato de ser muito semelhante morfológicamente, ao gênero *Trentepohlia* Martius.

López-Bautista, Rindi e Guiry (2006), baseados em estudos filogenéticos moleculares e morfológicos, consideraram as características, hábito subcuticular, vida heteromórfica e

zoosporângios em grupos, como sendo características filogenéticas significantes. Porém, o formato e tamanho de células, hábito prostrado/ereto e substrato colonizado, normalmente usados para separar espécies, não possuem relevância filogenética. Eles concluem que são necessários mais estudos para a classificação dos gêneros e espécies desta família.

O mais antigo membro reconhecido da família Trentepohliaceae (*Byssus jolithus*) foi descrito por Schwenckfelt em 1600, e posteriormente, incluído por Linnaeus, 1753 em uma mistura de alga verde-azulada e fungo (gênero *Byssus*) (THOMPSON; WUJEK, 1992).

Uma das primeiras algas aerofíticas reconhecidas foi *Trentepohlia* Martius, 1817. Poucos estudos foram realizados com o gênero, e sua morfologia básica foi trabalhada lentamente. Três gêneros foram relatados posteriormente: *Cephaleuros* Kunze, 1827, *Phycopeltis* Millardet, 1870 e *Stomatochroon* Palm, 1934. Os quatro gêneros foram distinguidos pelas diferenças morfológicas e, em menor escala, pela interação alga-hospedeiro (THOMPSON; WUJEK, 1997). Thompson e Wujek (1992) incluíram um novo gênero *Printzina* Thompson e Wujek.

As algas da família Trentepohliaceae, tem sido objeto de estudo em todo o mundo, em uma diversidade de hospedeiros, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. A maioria dos trabalhos apenas relata a ocorrência das espécies em seus hospedeiros. Muitas dessas pesquisas consideram *Cephaleuros virescens* Kunze como a única espécie encontrada. No entanto, sabe-se que muitas espécies foram identificadas inadequadamente, em levantamentos fitopatológicos, considerando apenas o aspecto geral da colonização sobre o limbo foliar, caule ou fruto. Poucos trabalhos com o objetivo de avaliar a taxonomia dessas algas e os danos causados em seus hospedeiros foram desenvolvidos.

Marlatt e Alfieri (1981a) realizaram, na Flórida, uma lista combinada com os levantamentos publicados por Marlatt e Alfieri (1981b) e Wehlburg e outros (1975) de hospedeiros de *Cephaleuros*. Os dois últimos contêm um total de 165 espécies de 53 famílias botânicas, incluindo dicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas. As algas foram encontradas em folhas, caules e frutos. A taxonomia das algas não foi estudada por esses autores, que relataram lesões maiores em 34 hospedeiros, analisando apenas o aspecto geral da colonização pela alga.

Holcomb (1986) adicionou 167 espécies de hospedeiros de *C. virescens* no território dos Estados Unidos. O que aumentou o número de hospedeiros neste país para um total de 287 (lista combinada Louisiana e Flórida).

Na ilha de Tutuila (Samoa Americana) Brooks (2004) analisou 146 espécies de hospedeiros e identificou algas da família Trentepohliaceae: cinco espécies de *Cephaleuros* (*C. expansa* Thompson e Wujek; *C. karstenii* Shmidle; *C. minimus* Karsten; *C. parasiticus* Karsten e *C. virescens* Kunze), duas de *Phycopeltis* (*P. epiphyton* Millardet e *P. irregulares* (Shmidle) Wille) e duas de *Stomatochroon* (*S. coalitum* Thompson e Wujek e *S. consociatum* Thompson e Wujek). Porém, a maioria das espécies de *Trentepohlia*, *Cephaleuros* e *Phycopeltis* não foi identificada. Esses autores também estudaram a patogenicidade e a associação de *Cephaleuros* com fungos.

Scot (2008) estudou *Cephaleuros virescens* e *Cephaleuros parasiticus* em folhas de goiabeira, abacateiro e magnólia, no Havaí e observou o ciclo de vida das algas, assim como a influência destas nas folhas e nos frutos de goiabeira.

Suto e Ohtani (2009) analisaram a morfologia e taxonomia de cinco espécies de *Cephaleuros* do Japão, incluindo três espécies novas (*C. aucubae* Suto e Ohtani, *C. japonicus* Suto e Ohtani e *C. microcellularis* Suto e Ohtani). Eles também realizaram análises anatômicas observaram necrose e hiperplasia do parênquima em alguns hospedeiros.

Na América do Sul e Central poucos estudos sobre a família Trentepohliaceae são encontrados. No Brasil os estudos são ainda mais restritos, sendo reduzidos a breves relatos em livros de fitopatologia ou levantamentos da ocorrência dessas algas em diferentes hospedeiros.

Rivero e Castellano (2004) realizaram um estudo controlado de campo e relataram prejuízos econômicos em cultivos de citros na província de Cienfuegos (Cuba), causados por *Cephaleuros virescens*. Foram observados prejuízos em folhas com 10% de área lesionada. Com a intensificação da área de lesão o prejuízo aumentou. Atingiu 28% de perda da produção em plantas com mais de 50% de área lesionada.

Em investigações de campo, na Colômbia, Pardo-Cardona (2004) identificaram mancha de

alga causada por *Cephaleuros virescens*, em 37 hospedeiros pertencentes a 20 famílias e 27 gêneros.

A diversidade, distribuição e taxonomia de algas da família Trentepohliaceae do Panamá foi estudada por Rindi, Lam e López-Bautista (2008). As coletas foram realizadas em três locais (Ilha Barro Colorado, Jardim Camboa e Jardim Summit), onde as algas colonizaram substratos naturais (folha e caule) e artificiais (metal, parede, recipiente plástico e tecido). As análises taxonômicas revelaram a presença de 24 táxons (um de *Cephaleuros*, seis de *Phycopeltis*, quatro de *Printzina* e treze de *Trentepohlia*). Diversos táxons não foram identificados em nível de espécie e os autores suspeitam de espécies novas.

O primeiro trabalho desenvolvido no Brasil foi o de Batista e Lima (1949, apud MARLATT; ALFIERI, 1981b), que listaram 448 hospedeiros do gênero *Cephaleuros*, porém não verificaram os danos causados por essas algas em seus hospedeiros.

Akiyama (1971) fez um estudo taxonômico de algas da família Trentepohliaceae em São Paulo e citou uma chave de identificação que considera a existência de quatro gêneros (*Cephaleuros*, *Trentepohlia*, *Stomatochroon* e *Phycopeltis*). Porém, encontrou apenas espécies de *Trentepohlia* e *Phycopeltis*, e descreveu uma chave de identificação para espécies de *Trentepohlia* existentes no Brasil.

Almeida, Vasconcelos e Freire (1985) apresentaram uma lista das plantas hospedeiras da alga *Cephaleuros virescens*, catalogadas no Herbário Micológico do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, totalizando 44 hospedeiros para esta alga.

Malagi e Santos (2008) verificaram no Paraná a ocorrência de *Cephaleuros virescens* em pitangueiras avaliando a evolução das lesões e descrevendo brevemente as estruturas que constituem a espécie.

No Espírito Santo, Liberato, Costa e Ventura (1996) relataram mancha de alga (*Cephaleuros virescens*) em abacateiro, cafeeiro, mangueira, castanha-do-maranhão, seringueira, goiabeira e macadâmia. Ventura e Costa (2003) observaram a mancha de alga em goiabeira no estado do Espírito Santo.

2.2 GÊNEROS PERTENCENTES À FAMÍLIA TRENTPOHLIACEAE

O presente estudo se baseou no trabalho de Thompson e Wujek (1997) para a identificação das espécies de *Cephaleuros*, por se tratar do trabalho mais completo para esse gênero. Abaixo está a descrição dos outros quatro gêneros pertencentes à família.

Phycopeltis Millardet, 1870

Espécie tipo: *Phycopeltis epiphyton* Millardet

Cresce em filamentos ramificados, que podem ser livres ou um talo pseudoparenquimatoso, com ou sem papila dorsal e filamentos eretos. Os talos são irregulares, lobados e orbiculares na forma, sempre crescem superficialmente em uma planta hospedeira ou em substrato artificial e elas nunca são parasíticas. Possuem coloração amarela esverdeada a laranja. *Esporangiatos laterais* são solitários e podem ser sésseis (sem pedicelo) e aparecem medialmente ou terminalmente em filamentos eretos. O poro do esporângio é distal e os gametângios são intercalares ou terminais. O ciclo de vida consiste em alternância isomórfica de gerações. Uma característica útil para distinguir *Phycopeltis* de outros gêneros foliculosos (*Trentepohlia*, *Printzina* e *Cephaleuros*) é o poro papilar terminal no esporângio, enquanto que nos outros gêneros ele é basal e adjacente a área de ligação. A relação taxonômica moderna do gênero inclui 18 espécies (THOMPSON; WUJEK, 1997).

Printzina Thompson & Wujek, 1992

Espécie tipo: *Printzina lagenifera* (Hildebrand) Thompson & Wujek

Muito similar à *Trentepohlia*, mas mais inconspícuo. Filamentos ramificados heterotríquicos e sistema ereto escasso ou ausente. O sistema prostrado é bem desenvolvido e com coloração verde. Talos crescem sobre as folhas e normalmente são encontrados em habitat sombreado e com elevada umidade. Esporângios são globulares a reniformes. *Esporangiatos laterais* são solitários e fixados nos filamentos eretos ou prostrados. O poro do esporângio é basal. Gametângios são terminais ou laterais. O ciclo de vida consiste em alternância isomórfica de gerações. O único tratamento taxonômico deste gênero é de Thompson e Wujek (1992) que reconheceram nove espécies (THOMPSON; WUJEK, 1997).

Stomatochroon Palm, 1934

Espécie tipo: *Stomatochroon lagerheimii* Palm

Tem crescimento endofítico na câmara subestomatal e através de espaços intercelulares no hospedeiro. Possui um sistema ramificado de filamentos ou reduzido a uma célula ancorante lobada. O talo é verde a laranja. Células terminais tornam-se intumescidas através do estômato. Produzem setas unicelulares e esporangióforos clavados distalmente e gametângios lateralmente. Esporangióforos são unicelulares com um *esporangiato lateral* solitário ou espiralado. O ciclo de vida consiste em alternância heteromórfica de gerações (THOMPSON; WUJEK, 1997).

Trentepohlia Martius, 1817

Espécie tipo: *Trentepohlia aurea* Martius

Consiste em filamentos ramificados heterotríqueos, com sistema prostrado escasso ou ausente e sistema ereto abundante. Talo cresce no tronco das árvores ou em rochas, normalmente formam massas evidentes, e tem coloração amarela a laranja podendo formar associações com fungos. Os esporângios são ovóides, os *esporangiatos laterais* são solitários ou em grupos, crescem na célula-cabeça terminal de um esporangióforo ramificado. Os gametângios são terminais. O ciclo de vida consiste de alternância isomórfica de gerações. *Trentepohlia* é o gênero mais rico em espécies (THOMPSON; WUJEK, 1997). O trabalho de Printz (1939) é ainda o mais completo para este gênero. Thompson e Wujek (1997) transferiram espécies de *Trentepohlia* para *Printzina* e *Phycopeltis*.

2.3 GÊNERO *Cephaleuros* KUNZE

Segundo Suto e Ohtani (2009), as espécies do gênero *Cephaleuros*, à medida que foram estudadas, mudaram de nome de acordo com suas características. O gênero foi descrito pela primeira vez por Kunze, 1827, para *Cephaleuros virescens* Kunze (espécie tipo) no Suriname. Karsten, 1891 adicionou cinco novas espécies, *C. albidus* Karsten, *C. laevis*

Karsten, *C. parasiticus* Karsten, *C. minimus* Karsten e *C. solutus* Karsten coletadas em Java (Indonésia), a partir de *C. mycoidea* Karsten (equivalente a *C. virescens*).

Printz (1939) revisou a taxonomia do gênero, adicionando sete espécies de *Cephaleuros* às seis espécies que Karsten descreveu. Ele ainda reduziu *Mycoidea parasitica*, *Cephaleuros mycoidea*, e *Phyllactidium tropicum* Möbius, 1888, para *C. virescens*.

Thompson e Wujek (1997) prepararam um trabalho com Trentepohliales e reconheceram 13 espécies e uma variedade do gênero *Cephaleuros*. Mantiveram sete espécies, adicionaram seis novas e uma variedade. Reduziram quatro espécies para *C. virescens* e removeram *C. purpurea*. Eles consideraram *Chrooderma endophytica* Fritsch, 1942, *Phycopeltis hawaiiensis* King, 1954 e *Cephaleuros virescens* Kunze f. *sessilis* Islam, 1972 como sinônimos de *Cephaleuros virescens* e consideraram *C. coffeae* como sinônimo de *C. parasiticus*. Esta publicação facilitou a identificação das espécies de *Cephaleuros* das regiões tropicais e subtropicais.

Espécies de *Cephaleuros* são comuns em folhas de árvores e arbustos tropicais economicamente importantes, como abacate (*Persea americana*), baunilha (*Vanilla planifolia*), cacau (*Theobroma cacao*), café (*Coffea arabica*), castanha-do-maranhão (*Bombacopsis glabra*), chá (*Camellia sinensis*), citros (*Citrus* spp.) coco (*Cocos nucifera*), fruta-pão (*Artocarpus altilis*), goiaba (*Psidium guajava*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), magnólia (*Magnolia grandiflora*), mangueira (*Mangifera indica*), palma (*Elaeis guineensis*), pimenta (*Piper nigrum*) e seringueira (*Hevea brasiliensis*). (LIBERATO; COSTA; VENTURA, 1996; SCOT, 2008).

A maioria das publicações sobre *Cephaleuros* tem pouca informação detalhada, ou citam apenas a ocorrência em hospedeiros de uma determinada localidade. Além disso, como algumas espécies de *Phycopeltis* ostentam uma semelhança superficial com *Cephaleuros* é provável que no passado, espécies foram identificadas inadequadamente (BROOKS, 2004; JOUBERT; RIJKENBERG, 1971).

Cephaleuros tem ampla distribuição no continente americano. Frequentes chuvas e elevadas temperaturas são condições favoráveis para a colonização por essas algas. Para os

hospedeiros, a nutrição e drenagem do solo deficientes, além do ar estagnante são fatores de predisposição para a colonização pela espécie *C. virescens*. Estas algas, presentes nas folhas, caules e frutos, podem causar prejuízo econômico. *C. virescens* é a alga, que coloniza os tecidos de plantas superiores, mais relatada em todo o mundo, e possui a mais ampla gama de hospedeiros. Normalmente, ocorre sobre a superfície adaxial das folhas, logo abaixo da cutícula. O exame microscópico revela filamentos ramificados e na maioria das vezes são aerofíticos (CHAPMAN; HENK, 1985; JOUBERT; RIJKENBERG, 1971; LÓPEZ-BAUTISTA; RINDI; CASAMATTA, 2007; LÓPEZ-BAUTISTA; WATERS; CHAPMAN, 2003; MARLATT; ALFIERI, 1981; PARDO-CARDONA, 2004).

Análises ultraestruturais de varredura e transmissão ajudam na melhor visualização das características taxonômicas que separam gêneros e espécies de Trentepohliaceae, com destaque para os trabalhos realizados com *C. virescens* (CHAPMAN, 1976, 1980, 1981; CHAPMAN; HENK, 1983). Chapman e Good (1978) estudaram a ultraestrutura dos gêneros *Cephaleuros*, *Phycopeltis* e *Trentepohlia*. Chapman e Henk (1985) relataram a importância do estudo da ultraestrutura dos gametas e zoósporos para a identificação das espécies de *Cephaleuros*.

2.4 REPRODUÇÃO EM TRENTEPOHLIACEAE

A reprodução assexuada da família Trentepohliaceae é por zoósporos quadriflagelados. Estes são produzidos no esporângio que, com sua célula *suffultory*, forma uma estrutura que é única para esta família de algas, o *esporangiato lateral*. Quando úmidos, os esporângios incham e estouram para libertar os zoósporos que podem ser carregados pelo vento, chuva ou animais.

A reprodução sexuada é por fusão de isogametas biflagelados. Os gametângios, de acordo com o gênero, podem ser intercalares, terminais ou laterais. Como no esporângio, eles têm uma área que funciona como poro papilar para liberar os gametas.

Os gêneros *Cephaleuros* (Figura 1) e *Stomatochroon* possuem homotalo e alternância heteromórfica de gerações, em que o gametófito é a alga definitiva e o esporófito é reduzido

a um talo ou apenas um *esporângio lateral* sésstil. Uma alternância isomórfica de gerações é indicada para *Phycopeltis*, *Trentepohlia* e *Printzina*. O heterotalo ocorre em algumas espécies de *Trentepohlia* (THOMPSON; WUJEK, 1997).

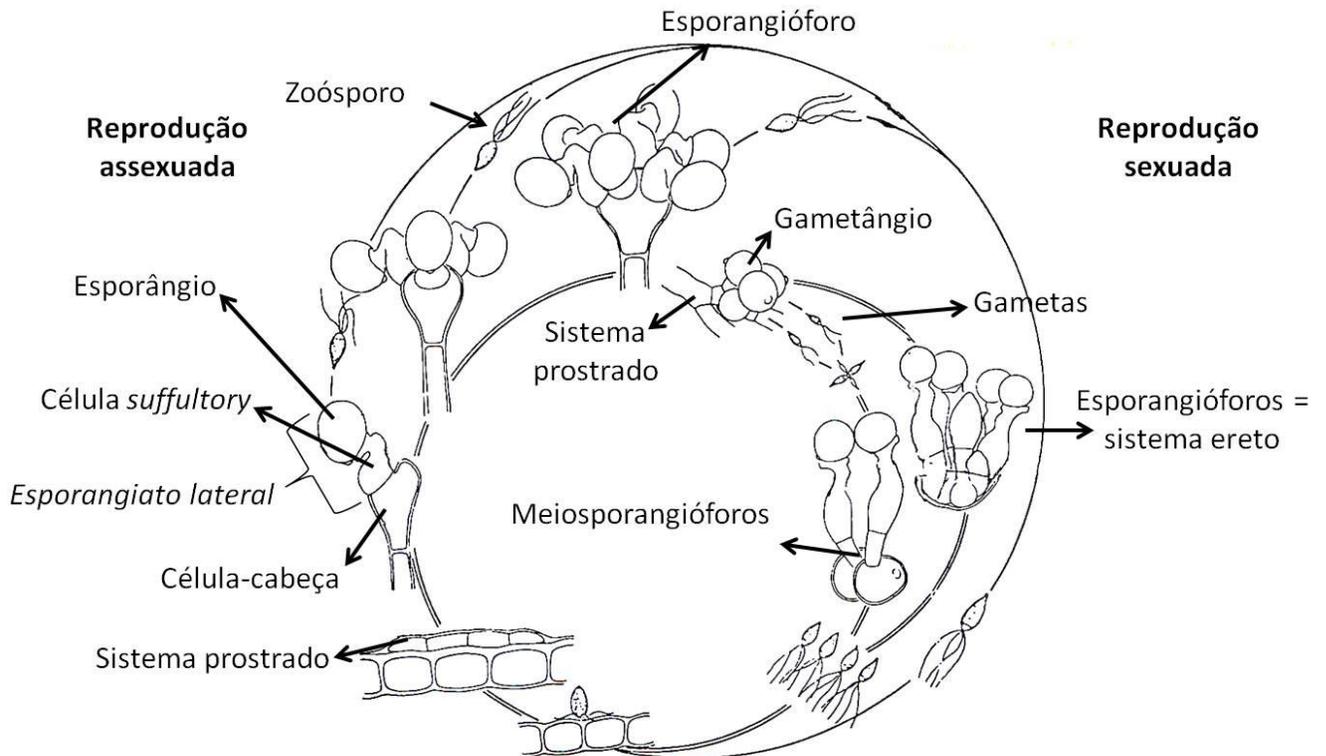


Figura 1 - Ciclo de vida de *Cephaleuros* ilustrando um homotalo, isogametas e alternância heteromórfica de gerações. Adaptado de Thompson e Wujek (1997).

2.5 ASSOCIAÇÕES TRENTEPOHLIACEAE E FUNGOS

Cephaleuros, *Phycopeltis* e *Trentepohlia* podem estar associados com fungos formando fungos liquenizados (LÓPEZ-BAUTISTA; WATERS; CHAPMAN, 2002). Conseqüentemente, estas algas estão entre as poucas algas filamentosas verdes, que funcionam como ficobiontes. Muitas espécies de fungos liquenizados dos gêneros *Strigula* e *Raciborskiella* possuem *Cephaleuros* como ficobionte.

O estado de *C. virescens* liquenizado foi identificado como *Strigula elegans* (Fee) Mull. Arg. O fungo parasita a alga, e não a planta (THOMPSON; WUJEK, 1997). Brooks (2004) acredita que os danos causados pela alga associada ao fungo não são maiores de quando a alga está sozinha. Suto e Ohtani (2009) observaram o desenvolvimento de fungos no talo das algas (*C. aucubae*, *C. japonicus*, *C. microcellularis* e *C. virescens*).

2.6 PLANTAS HOSPEDEIRAS: *Coffea canephora* PIERRE EX FROEHNER E *Psidium guajava* L.

O gênero *Coffea* apresenta aproximadamente 100 espécies de cafeeiros (DAVIS et al., 2006), mas apenas duas tem importância econômica no mercado mundial, o *Coffea arabica* L. (café arábica) e o *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café robusta), que no Espírito Santo é representado pelo Conilon.

Na Safra de 2010, o estado do Espírito Santo produziu 72,48% de café Conilon, do total da produção estadual de café. Tal dado demonstra que o Espírito Santo é o maior produtor brasileiro de café Conilon e segundo maior produtor de cafés como um todo (PORTO; SILVA; BESTÉTTI, 2010). Entre os principais municípios produtores de café Conilon, no estado, destacam-se os municípios de Jaguaré, Nova Venécia, Pinheiros, Rio Bananal, São Gabriel da Palha, São Mateus, Sooretama e Vila Valério (FASSIO; SILVA, 2007; SECRETARIA DE ESTADO DE DESENVOLVIMENTO, 2010).

No Brasil, a cafeicultura desempenha uma função de vital relevância para o desenvolvimento social e econômico, possibilitando a geração de empregos e arrecadação de impostos importantes para a economia nacional. (FASSIO; SILVA, 2007; PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009).

A colonização de *Cephaleuros* em cafeeiros já foi relatada por Joubert e Rijkenberg (1971) e Scot (2008) em trabalhos taxonômicos sobre a família Trentepohliaceae. No Brasil, Almeida, Vasconcelos e Freire (1985) desenvolveram um trabalho taxonômico em São Paulo e Liberato, Costa e Ventura (1996) um levantamento de hospedeiros das algas no Espírito Santo.

O gênero *Psidium* compreende mais de 150 espécies, sendo a goiabeira a de maior importância econômica (COSTA; PACOVA, 2003). Segundo Pereira (1995) citado por Costa e Costa (2003) a goiabeira (*Psidium guajava* L.) tem sua origem nas regiões tropicais da América distribuída do México até o Brasil.

O Brasil apresenta grandes áreas de clima e solo favoráveis à produção comercial da goiabeira. Esse aspecto é importante não apenas pelo valor nutritivo da fruta, mais também pela perspectiva que representa no incremento da produção agrícola, na ampliação da atividade industrial e no potencial de exportação. Deve-se destacar ainda que a goiaba é uma das frutas tropicais mais populares e de maior aceitação no país. Além disso, as folhas e frutos da goiabeira são utilizados no tratamento de algumas doenças, pela medicina popular e farmacologia (CASTRO-VARGAS et al., 2010; HUI-ZHENG et al., 2010; ROZANE; OLIVEIRA; LIRIO, 2003).

Segundo Ventura e Costa (2003), a exploração econômica da goiabeira tem enfrentado problemas em algumas regiões, devido às doenças que causam perdas na produtividade e afetam a qualidade da fruta. Vários fatores estão associados com as perdas qualitativas e quantitativas da goiabeira. As doenças são o resultado de alterações fisiológicas e morfológicas nas plantas, devido a fatores bióticos e abióticos. Os bióticos são causados por patógenos que infectam a planta influenciando no seu desenvolvimento, produção e qualidade destacando-se os fungos, as bactérias, os nematóides e os vírus. Segundo esses mesmos autores a mancha de alga causada por *Cephaleuros virescens*, também ocorre com frequência em goiabeira.

A colonização de *Cephaleuros* em goiabeira já foi relatada por Marlatt e Alfieri (1981) na Flórida, por Brooks (2004) na Samoa Americana e por Scot (2008) no Havaí. Joubert e Rijkenberg (1971) reforçaram os prejuízos econômicos causados por *Cephaleuros* nas regiões tropicais e subtropicais, em importantes plantas cultivadas como a goiabeira. No Brasil, os trabalhos encontrados, com goiabeira como hospedeira dessas algas foram: Almeida, Vasconcelos e Freire (1985) em São Paulo e Liberato, Costa e Ventura (1996) no Espírito Santo.

2.7 ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS COLONIZADAS POR ALGAS

Os vegetais possuem mecanismos de defesa contra infecções causadas por fungos, bactérias, vírus, nematóides e algas. Os hospedeiros produzem grande variedade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos e ligninas, os quais parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento, mas estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas formando uma barreira de proteção, impedindo a colonização do patógeno nos tecidos mais internos, ou limitando o patógeno a uma área reduzida (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995, apud LORENZETTI, 2009; SILVA et al., 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A técnica histoquímica é uma ferramenta importante, pois auxilia na identificação da composição química de paredes e conteúdo celular de diferentes tecidos vegetais (DÔRES, 2007). O estudo da histologia e histoquímica vegetal é igualmente importante para a ficologia e fitopatologia uma vez que permite avaliar a interação alga-planta.

Joubert e Rijkenberg (1971) realizaram um trabalho taxonômico sobre clorófitas parasíticas. Eles sugerem que *Cephaleuros* secreta subprodutos nocivos para seus hospedeiros e causa danos aos tecidos foliares, podendo formar tecido de cicatrização que isola as algas dos tecidos mais internos da folha.

Brooks (2004) avaliou os diferentes estágios de colonização de algas da família Trentepohliaceae (*Cephaleuros*, *Phycopeltis*, *Stomatochroon* e *Trentepohlia*) e determinou uma escala para a colonização dessas algas. Holcomb (1986), Thompson e Wujek (1997) e Suto e Ohtani (2009) também observaram a colonização de *Cephaleuros* em hospedeiros e constataram os danos anatômicos, em alguns casos, necrose foliar.

2.8 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DE FOLHAS COLONIZADAS POR MICRORGANISMOS

A absorção e o uso da energia luminosa pelos vegetais podem ser estimados por meio da análise de fluorescência da clorofila *a*, que além de não destrutiva é altamente sensível e de

fácil manuseio. Além de permitir a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre a condição fisiológica do aparato fotossintético (FALQUETO et al., 2007).

A técnica da fluorescência da clorofila *a* tem proporcionado uma avaliação apurada do potencial fotossintético (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004). Segundo Strasser, Tsimilli-Michael e Srivastava (2005) a fluorescência pode ser afetada por diversos tipos de estresses, como falta ou excesso de nutrientes, excesso ou redução da intensidade luminosa, frio, herbicida e seca.

Patógenos como fungos, bactérias e vírus que se manifestam formando estruturas infecciosas na superfície das folhas, promovem sintomas que reduzem a área verde, podendo danificar o tecido fotossintético. Isto causa uma redução da área fotossintética das folhas e um decréscimo da superfície disponível para a realização de trocas gasosas (GUREVITCH; SCHEINER; FOX, 2009; ROBERT et al., 2005). Os mecanismos de patogenicidade influenciam o processo fotossintético, com conseqüente interferência na produção (FALQUETO et al., 2003).

Algumas recentes e escassas pesquisas observam as alterações no fotossistema I (FSI) ocasionadas por estresse abiótico. Oukarroum, Schansker e Strasser (2009) avaliaram variedades de cevada e suas tolerâncias hídricas utilizando a fluorescência da clorofila *a* e observando os efeitos do estresse hídrico no FSI. Yusuf e outros (2010) observaram por meio de análises fisiológicas e medições da fluorescência da clorofila *a*, que as plantas transgênicas (*Brassica juncea*) tem os efeitos do estresse abiótico reduzidos.

Estudos mais recentes de fitopatologia vêm utilizando fluorômetro por imagem para verificar a fluorescência da clorofila *a* nas diferentes partes das folhas. Guidi e outros (2007) avaliaram, os efeitos do ozônio e de um fungo em folhas de tremoço-branco, pelas imagens da fluorescência da clorofila *a*. Rodríguez-Moreno e outros (2008) estudaram a detecção precoce da infecção por *Pseudomonas syringae* de áreas foliares assintomáticas em feijão utilizando imagens de fluorescência da clorofila *a*. Horst e outros (2008) observaram as infecções foliares de milho com *Ustilago maydis* por meio da técnica de fluorescência da clorofila *a* por imagem.

Não foi encontrado na literatura, estudo da fluorescência da clorofila *a* em folhas de hospedeiros de algas da família Trentepohliaceae. A avaliação do estado fisiológico de cafeeiros e goiabeiras colonizados por essas algas foi apenas mencionada, sem a descrição da metodologia, por Joubert e Rijkenberg (1971) e Scot (2008), que relatam uma possível redução da área fotossintética das folhas lesionadas pelas algas.

2.8.1 Parâmetros relacionados ao FSI

Alguns parâmetros estão aqui detalhados, para a melhor compreensão das discussões sobre o FSI. O parâmetro $\phi R_0 = RE_0/ABS$, em que RE_0 o fluxo de elétrons transportados do *pool* de plastoquinona (PQ) até os aceptores finais de elétrons de FSI, quando todos os centros de reação (RC) estão abertos (oxidados), e sendo ABS o fluxo de absorção. Esse parâmetro (ϕR_0) indica o quanto de elétrons (rendimento) vindos da Q_A^- os aceptores finais do FSI conseguem absorver, quando estão oxidados. O parâmetro $\delta R_0 = RE_0/ET_0$, em que ET_0 o fluxo de elétrons transportados de Q_A^- até PQ, quando todos os RC estão abertos. Esse parâmetro (δR_0) representa a eficiência com que um elétron pode mover-se da plasto-hidroquinona (PQH_2) para os aceptores finais do FSI, quando estão oxidados. O parâmetro RE_0/RC representa o fluxo específico de energia para o transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores finais de FSI, quando estão oxidados. O parâmetro $\delta R_0/(1-\delta R_0)$ descreve a performance das reações de oxidação e redução do FSI.

O parâmetro PI_{ABS} é o índice de desempenho que incorpora os processos da cascata de energia dos primeiros eventos de absorção até a redução de PQ. E o parâmetro PI_{TOTAL} é o índice de desempenho que incorpora todos os processos da cascata de energia dos primeiros eventos de absorção até a redução dos aceptores finais de FSI (Figuras 2 e 3).

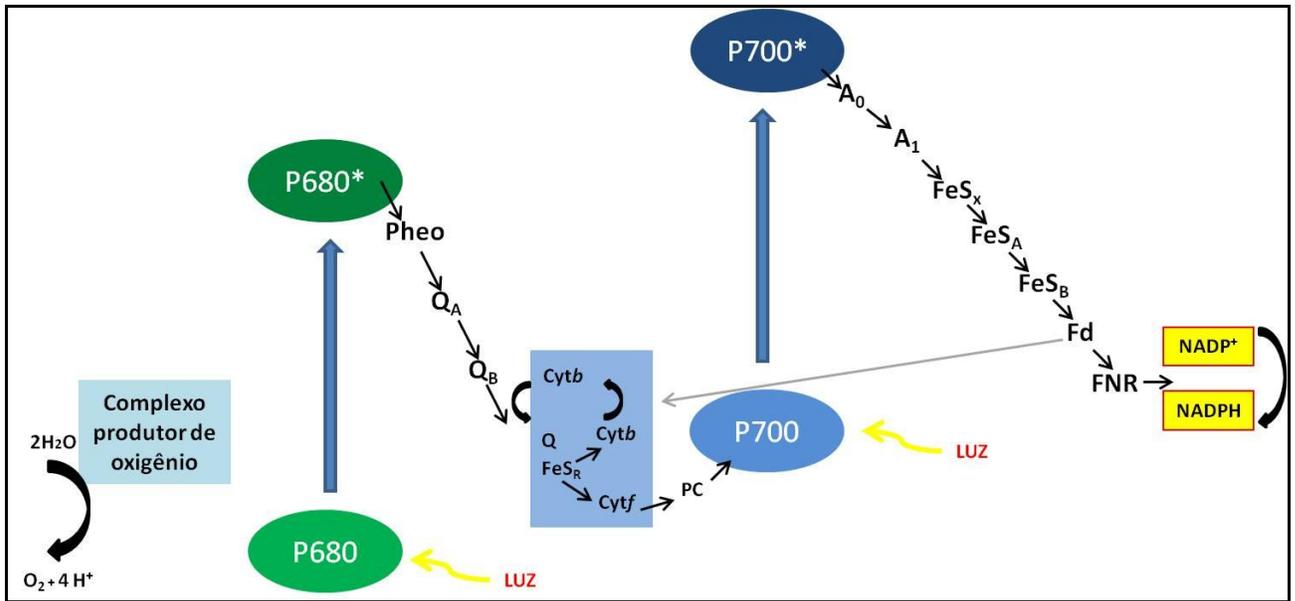


Figura 2 - Esquema Z para organismos fotossintetizantes produtores de O₂. Detalhe para os aceptores de elétrons do FSI, clorofila, A₀; quinona, A₁; proteínas ferro-sulfurosas (FeS_x, FeS_A e FeS_B) e Ferredoxina (Fd). A flavoproteína ferredoxina-NADP redutase (FNR) reduz o NADPH, o qual é utilizado no ciclo de Calvin para reduzir o CO₂. A linha cinza indica o fluxo cíclico de elétrons ao redor do FSI. Adaptado de Taiz e Zeiger (2009).

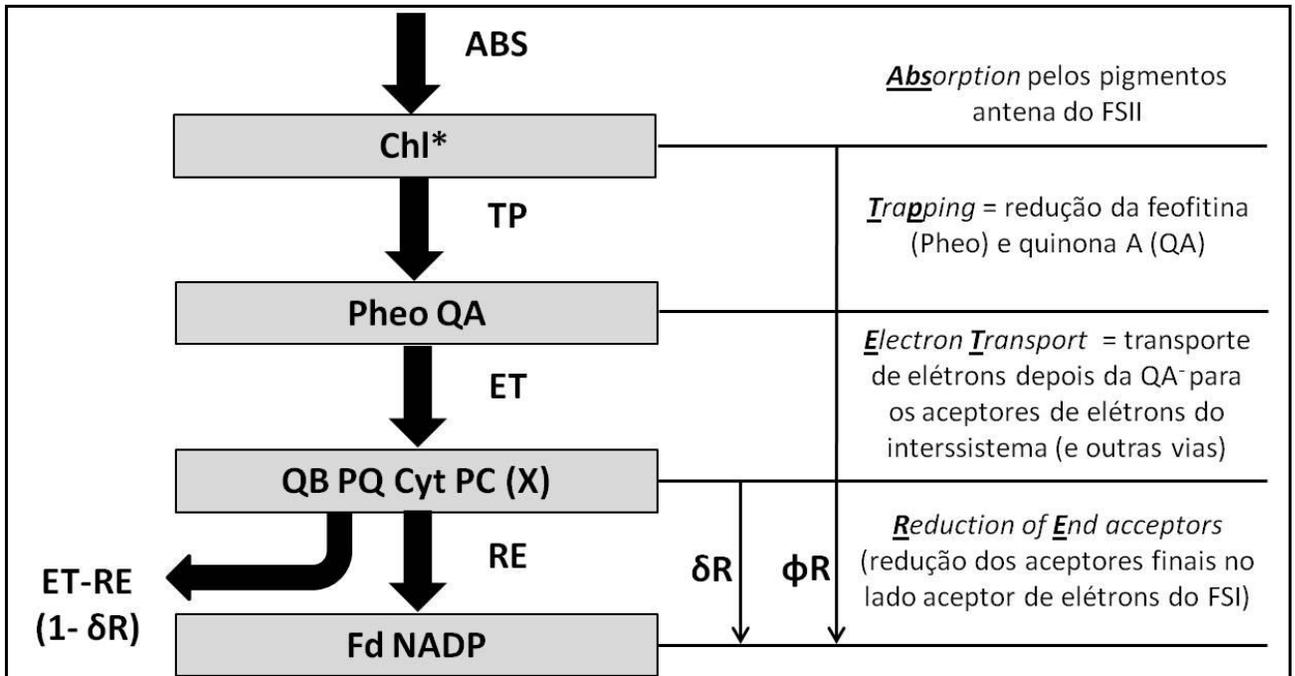


Figura 3 - Representação de alguns parâmetros derivados do teste JIP. Adaptado de Tsimilli e Strasser (2008) e Yusuf (2010).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar os táxons de algas que colonizam as folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* no norte do Espírito Santo e avaliar as diferentes respostas da fluorescência da clorofila *a*, anatomia e histoquímica das folhas colonizadas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar os táxons de algas da família Trentepohliaceae que colonizam folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* da região norte do estado do Espírito Santo;
- Avaliar a anatomia e a histoquímica de folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* comparando folhas da mesma planta, colonizadas e não colonizadas por algas;
- Verificar a fluorescência da clorofila *a* de folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* comparando folhas da mesma planta, colonizadas e não colonizadas por algas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO E MATERIAL BOTÂNICO

O estudo foi conduzido na Fazenda Experimental de Sooretama do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), município de Sooretama, norte do Espírito Santo (latitude 19°06'50"S e longitude 40°04'44"W).

O material botânico coletado para as análises taxonômicas, anatômicas, histoquímicas e ultraestruturais foi constituído por folhas jovens totalmente expandidas, essas coletadas de três plantas de *Coffea canephora* (café Conilon) e de *Psidium guajava* (goiabeira) (Figura 4), em março, setembro e dezembro de 2010. As análises de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em seis plantas de café Conilon e goiabeira, em setembro e dezembro de 2010.



Figura 4 - Vista aérea da Fazenda Experimental de Sooretama do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Sooretama, ES. Detalhe das plantações de café Conilon e goiabeira. Fonte: <<http://maps.google.com.br/>>.

4.2 PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA DO AR

Os meses de coletas e análises em campo, março e dezembro (período chuvoso) e setembro (período seco) foram selecionados para verificar a influência da precipitação (umidade) e temperatura do ar na colonização das folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* por algas (Figura 5).

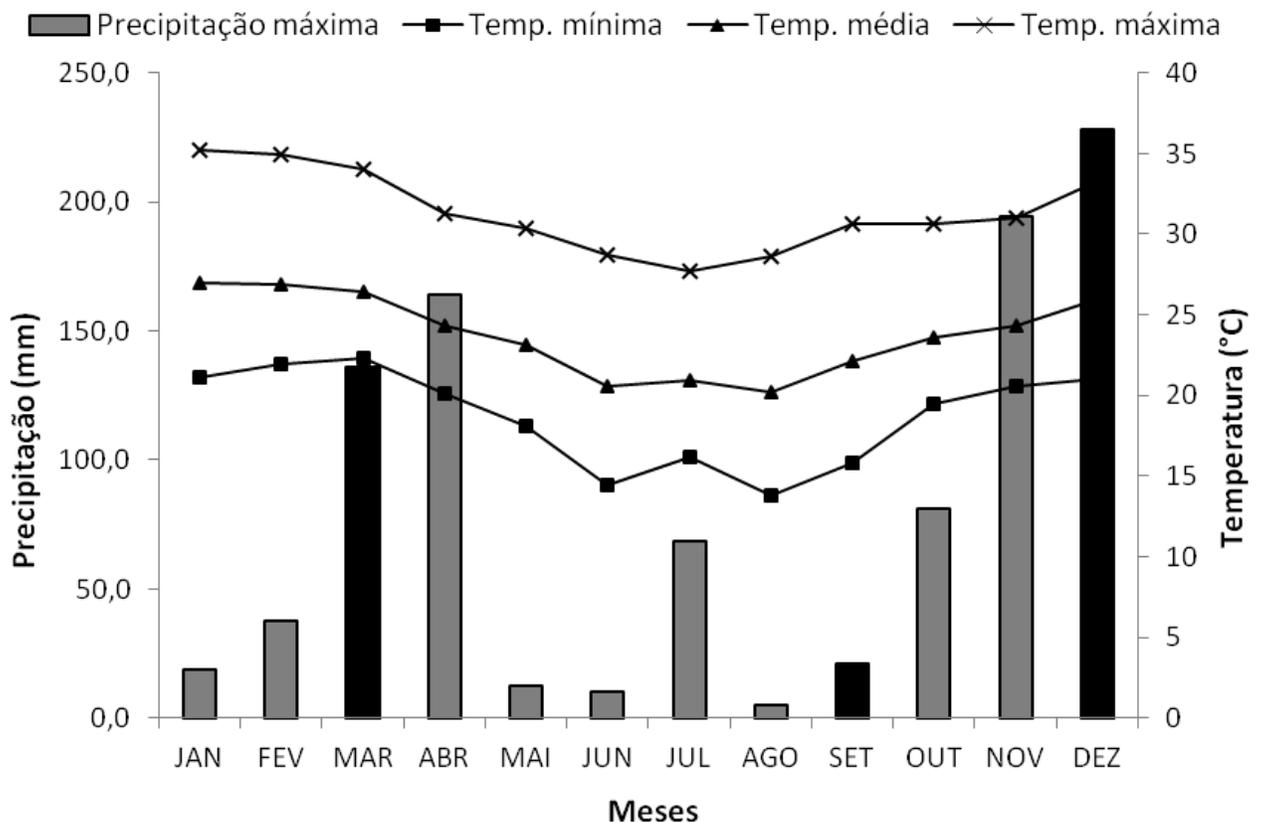


Figura 5 - Temperaturas mínima, média e máxima do ar e precipitação máxima no ano de 2010 do município de Sooretama, ES. Dados obtidos da estação meteorológica da Fazenda Experimental de Sooretama do INCAPER.

4.3 TAXONOMIA DAS ALGAS

As análises de taxonomia foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal (LABAV), Setor Botânica, Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em Vitória, ES.

Parte das amostras coletadas e fixadas para as análises anatômicas foi utilizada para a análise taxonômica, sendo essa também realizada com material vivo, para a observação da coloração natural e células reprodutivas (gametas e zoósporos) das algas, além da morfologia da lesão.

Cortes transversais e paradérmicos das regiões colonizadas foram realizados com auxílio de lâmina (gilete) e montados entre lâmina e lamínula com água glicerizada (2:1). Esses cortes foram utilizados na identificação das características morfológicas das algas.

A análise das amostras vivas possibilitou a documentação e medição dos gametas e zoósporos, que foram liberados com a aplicação de uma gota de água destilada sobre lâmina contendo o corte histológico. Após aproximadamente cinco minutos era possível a visualização dessas células reprodutivas, sendo então a lâmina coberta com lamínula (SUTO; OHTANI, 2009). As algas foram registradas por meio de fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio marca Nikon®, modelo E200.

Foram realizadas as medidas do comprimento e da largura das seguintes características taxonômicas: células do sistema prostrado, setas pequenas e longas, gametângios, esporangióforos, esporângios, gametas e zoósporos (média de 20 medidas por característica). As medidas das características taxonômicas foram realizadas em analisador de imagens semi-automático Nikon®, com software - Tsview®.

Outra característica taxonômica foi mensurada, o diâmetro da lesão, para o estudo da morfologia da lesão. As medidas foram realizadas por meio de fotografias analisadas com softwares - GIMP® e ImageJ®. Medidas feitas por meio de régua também foram utilizadas.

Para a identificação das algas foram utilizadas as chaves de identificação de gêneros e espécies da família Trentepohliaceae de Thompson e Wujek (1997). Além dessas chaves, as

medidas das características taxonômicas das algas foram comparadas com as encontradas em outros trabalhos, em especial no de Suto e Ohtani (2009). Quando necessário, especialistas em ficologia foram consultados.

4.4 ANÁLISE ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA

As análises anatômicas e histoquímicas foram conduzidas no Laboratório de Anatomia Vegetal (LABAV), Setor Botânica, Departamento de Ciências Biológicas da UFES.

Amostras da região mediana de folhas de *C. canephora* e *P. guajava* foram fixadas em FAA 50 (JOHANSEN, 1940) e estocadas em etanol 70%. O material foi desidratado em série etílica crescente e incluído em historesina glicol-metacrilato (Leica®), segundo Guerrits (1964). Foram realizadas secções transversais de espessura de 8 µm, da região internervural, com auxílio de micrótomo rotativo. Posteriormente, os cortes foram corados com solução de Azul de Toluidina 0,05% (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964) e montados em bálsamo do Canadá. Também foram realizados cortes transversais à mão livre com auxílio de lâmina (gilete). Estes cortes foram corados com solução aquosa 1% de azul de astra e safranina (9:1) e posteriormente lavados com etanol 70% para retirar o excesso de corante. As lâminas foram montadas em água glicerinada (2:1) e vedadas.

Foram realizadas medições da espessura total do limbo, das células epidérmicas de ambas as faces da folha (adaxial e abaxial), do parênquima subepidérmico e do parênquima clorofiliano (paliádico e lacunoso). Para isso, foram realizadas 30 medições por indivíduo, totalizando 90 medições. Todas as medidas foram feitas em analisador de imagens semi-automático Nikon®, com software - Tsview®. Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio marca Nikon®, modelo E200.

Os testes histoquímicos foram realizados em secções transversais à mão livre de material fresco, da região mediana das folhas. Utilizando-se: cloreto férrico para identificar compostos fenólicos, floroglucinol acidificado para lignina e sudan IV para lipídios. A reação foi considerada positiva, para cloreto férrico, quando o conteúdo das células apresentou-se marrom escuro a preto. Para floroglucinol acidificado quando as paredes celulares

mostraram coloração rósea. Para sudan IV a reação positiva foi identificada pela coloração alaranjada. Cortes de material sem reagentes também foram analisados paralelamente, sendo utilizados como controle.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As análises e fotodocumentação dos resultados foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

A caracterização da micromorfologia foliar foi realizada por meio da observação das superfícies foliares de *C. canephora* e *P. guajava* colonizadas por *Cephaleuros*. Amostras retiradas do terço mediano de folhas jovens completamente expandidas foram previamente fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3. A seguir, o material foi desidratado em série etílica e submetido ao ponto crítico de CO₂ (CPD 030. Critical Point Dryer; Bal-Tec®). As amostras foram fixadas sobre suportes e recobertas com camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura no metalizador (FDU 010; Balzers®). O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP; Zeiss®, Jena, Germany).

4.6 CINÉTICA DE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE

O equipamento utilizado nas análises de fluorescência da clorofila *a*, assim como os programas para a obtenção dos resultados foram disponibilizados pelo Núcleo de Estudos da Fotossíntese (NEF), Setor Botânica, Departamento de Ciências Biológicas da UFES.

As análises de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em seis plantas de *C. canephora* e *P. guajava* em setembro e dezembro de 2010. Foram tomadas duas medições por folha, em cada planta, totalizando 12 repetições.

As medições foram realizadas nas primeiras horas do dia em folhas jovens totalmente expandidas, colonizadas e não colonizadas. Isso para evitar o efeito inibitório de altas

temperaturas e luminosidade sobre as reações fotossintéticas. As folhas foram adaptadas ao escuro por meio de cliques, por 30 minutos, período suficiente para a oxidação completa do sistema fotossintético. Posteriormente, a emissão da fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha, pela exposição da amostra a um pulso saturante de luz vermelha de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A emissão da fluorescência transiente OJIP (50 μs a 1 s) foi medida com um fluorômetro portátil (HandyPEA®, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK), conforme metodologia sugerida por Tsimilli-Michael e Strasser (2008) e essa foi analisada pelo teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995) utilizando o software Biolyzer®.

A organização, normalização e tabulação dos dados foram executadas com auxílio do programa Microsoft Office Excel® (2007) que foi utilizado para derivar uma série de parâmetros biofísicos adicionais do fotossistema II (FSII) e fotossistema I (FSI). Os parâmetros do FSI avaliados foram: Fluxo específico de energia para o transporte de elétrons da Q_A^- para os aceptores de elétrons do FSI (RE_0/RC). Desempenho das reações de oxidação e redução no FSI ($\delta R_0/(1-\delta R_0)$). Eficiência com que um elétron pode se mover do intersistema de aceptores de elétrons reduzidos para o acceptor final de elétrons do FSI ($\delta R_0 = RE_0/ET_0$). Rendimento quântico de transporte de elétrons da Q_A^- para o acceptor final de elétrons do FSI ($\phi R_0 = RE_0/ABS$).

Também foram avaliados os índices de performance da evolução fotossintética: PI_{TOTAL} que é o produto do PI_{ABS} pela eficiência do desempenho das reações de oxidação e redução no FSI ($\delta R_0/(1-\delta R_0)$). PI_{ABS} que é o produto da densidade de centros de reação ativos do FSII (RC/ABS), pela eficiência das reações fotoquímicas do FSII ($\phi_0/(1-\phi_0)$) e pela eficiência das reações no intersistema ($\psi_0/(1-\psi_0)$).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o software Assistat 7.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MORFOLOGIA DA LESÃO

As folhas de *Coffea canephora* apresentaram lesões na face adaxial, localizadas sobre nervuras e região internervural (Figura 6, C). As lesões exibiram formato circular e coloração predominantemente amarelada (Figura 6, D) podendo, em estágios mais avançados de desenvolvimento, mostrar coloração esbranquiçada pela presença de fungos (Figura 6, E). De modo geral, as folhas coletadas em setembro de 2010 exibiram lesões em estágio inicial e em menor número (Figura 6, A), enquanto que aquelas coletadas em março e dezembro de 2010 (Figura 6, C e B, respectivamente) apresentaram lesões em estágios mais avançados de desenvolvimento e em maior número.

Assim como em *C. canephora*, as folhas de *Psidium guajava* mostraram lesões na face adaxial, localizadas sobre a região nervural e internervural (Figura 6, H e I). As lesões possuíram coloração amarelada a alaranjada. Em estágios iniciais, exibiram formato predominantemente circular (Figura 6, F e I), e em estágios mais avançados mostraram-se irregulares (Figura 6, G). Quanto ao estágio de desenvolvimento e número de lesões observou-se padrão semelhante ao de *C. canephora* (Figura 6, F e G). As lesões existentes em *P. guajava* não variaram muito com a pluviosidade (umidade) e temperatura do ar (Figura 5) verificando-se os dois estágios de colonização (inicial e avançado) em todas as coletas.

A ocorrência de algas do gênero *Cephaleuros* sobre a superfície adaxial de folhas de diferentes espécies vegetais é um fato relatado por vários autores (AKIYAMA, 1971; ALMEIDA; VASCONCELOS; FREIRE, 1985; BROOKS, 2004; HOLCOMB, 1986; MALAGI; SANTOS, 2008; MARLATT E ALFIERI, 1981; PARDO-CARDONA, 2004; RINDI; LAM; LÓPEZ-BAUTISTA, 2008; RIVERO; CASTELLANO, 2004; SCOT, 2008; SUTO; OHTANI, 2009). Thompson e Wujek (1997) ainda observaram espécies de *Cephaleuros* crescendo sobre nervura foliar. A espécie *Cephaleuros solutus* cresceu ao longo da nervura principal na face adaxial foliar em dois hospedeiros (*Crescentia alata* e *Anona muricata*). A colonização por *Cephaleuros* em goiabeira já foi relatada por Almeida, Vasconcelos e Freire (1985),

Brooks (2004), Joubert e Rijkenberg (1971), Marlatt e Alfieri (1981), Scot (2008) e Ventura e Costa (2003). A colonização por *Cephaleuros* também foi observada em *Coffea* por Almeida, Vasconcelos e Freire (1985), Joubert e Rijkenberg (1971) e Scot (2008).

A variação na coloração das lesões foliares causada pela presença de algas do gênero *Cephaleuros* em *Coffea canephora* e *Psidium guajava* está, possivelmente, relacionada à diferente concentração de carotenóides em gametângios, esporangióforos e esporângios. O excesso de astaxantina (hematocromo), um pigmento carotenóide, mascara as clorofilas, deixando as lesões com coloração amarelada à laranja-avermelha (THOMPSON; WUJEK, 1997). Pardo-Cardona (2004) constataram em 37 hospedeiros de 20 famílias botânicas lesões alaranjadas, avermelhadas, filamentosas e tufadas causadas por *C. virescens*.

As lesões de *Cephaleuros* sp.1 e *Cephaleuros* sp.2 tiveram intervalo de diâmetro (Tabela 1) semelhante ao da espécie *Cephaleuros virescens* encontrada por Pardo-Cardona (2004) que observou um intervalo 1 a 3 mm de diâmetro de lesão, em 37 hospedeiros, dentre estes *Coffea arabica* L. e *Psidium* L. na Colômbia. Suto e Ohtani (2009) encontraram um intervalo de 1 a 8 mm de diâmetro das lesões de 25 hospedeiros, no Japão. Esses dados indicam a grande variação no diâmetro das lesões causadas pela espécie *C. virescens*.

Nas folhas de *C. canephora* que apresentaram associação de *Cephaleuros* sp.1 e fungos, o estudo taxonômico do fungo não foi realizado. Lembrando que essas folhas foram coletadas em março e dezembro de 2010 (Figura 5), período de maior pluviosidade (umidade) e temperatura do ar, favorável ao desenvolvimento dessas algas e de fungos. Segundo Thompson e Wujek (1997), o fungo coloniza a alga e não a planta. Além disso, os danos à planta são causados pela alga antes de um fungo colonizá-la. Brooks (2004) ainda acredita que os danos causados pela alga associada ao fungo não são maiores que os danos causados pela alga sozinha. Suto e Ohtani (2009) observaram o desenvolvimento de fungos no talo das algas (*C. aucubae*, *C. japonicus*, *C. microcellularis* e *C. virescens*) e que 3 a 12% das espécies de algas coletadas estavam associadas a fungos.

A presença de lesões maiores nas amostras de março e dezembro reforça o fato de *Cephaleuros* se desenvolver melhor em condições de elevada pluviosidade (umidade) e temperatura (Figura 5). Esses resultados corroboram com Chapman e Henk (1985), López-

Bautista, Waters e Chapman (2003) e Scot (2008), que relacionam o melhor desenvolvimento dessas algas em regiões tropicais, onde a precipitação e temperatura são mais elevadas.

Embora nesta pesquisa não tenha sido realizado um estudo sobre a influência das lesões causadas por *Cephaleuros* na produção dos frutos de seus hospedeiros; Rivero e Castellanos (2004) estudando *C. virescens* em experimento de campo observaram prejuízos econômicos em cultivos de citros na província de Cienfuegos (Cuba), já com 10% de área lesionada na folha. Com o aumento da área de lesão o prejuízo aumenta também, chegando a 28% de perda da produção em plantas com mais de 50% de área lesionada. Estudos controlados de campo, como o realizado por Rivero e Castellanos (2004) podem responder melhor sobre a produção dos hospedeiros de *Cephaleuros* (*C. canephora* e *P. guajava*) da Fazenda Experimental de Sooretama do INCAPER.

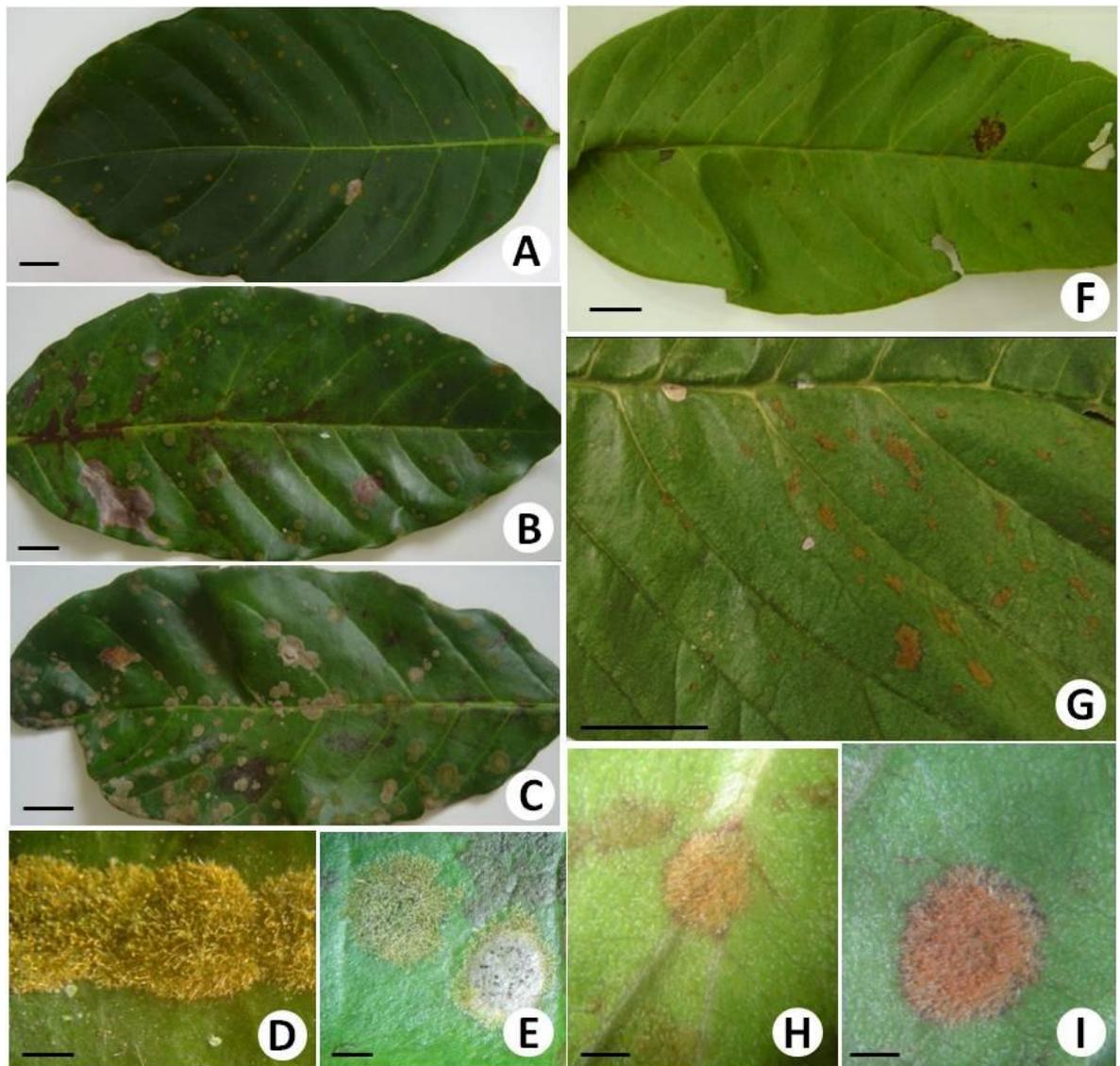


Figura 6 - (A - E) Folhas de *Coffea canephora* colonizadas por *Cephaleuros* sp.1. (A - C) Estágios sucessivos de desenvolvimento das lesões sobre nervuras e áreas internervurais. (D) Detalhe de lesão com estruturas reprodutivas. (E) Detalhe de lesões com fungo. (F - I) Folhas de *Psidium guajava* L. colonizadas por *Cephaleuros* sp.2. (F e G) Estágios sucessivos de desenvolvimento das lesões. (H) Detalhe de uma lesão com estruturas reprodutivas, sobre nervura. (I) Detalhe de uma lesão com estruturas reprodutivas em área internervural. Barras (A, B, C, F e G) = 1 cm. Barras (D, E, H e I) = 1mm.

5.2 TAXONOMIA DAS ALGAS QUE COLONIZAM *Coffea canephora* E *Psidium guajava*

Todas as amostras de algas analisadas, que colonizam *C. canephora* e *P. guajava* pertencem ao gênero *Cephaleuros* e foram identificadas de acordo com a chave para gêneros de Thompson e Wujek (1997) (ANEXOS A e B). As características importantes para a identificação do gênero foram: o hábito de crescimento subcuticular das algas nas folhas (Figura 12, B; Figura 13, B) e os esporângios em grupos.

A tabela 1 apresenta as medidas das características taxonômicas de *Cephaleuros* sp.1 que colonizam folhas de *C. canephora*, *Cephaleuros* sp.2 que colonizam folhas de *P. guajava* e de *Cephaleuros virescens*, espécie de *Cephaleuros* mais relatada em diferentes hospedeiros no mundo. *Cephaleuros* sp.1 apresenta talo prostrado circular, pseudoparenquimatoso com diâmetro de 0,5-8,0 mm, com dicotomia simétrica, bordas crenadas, às vezes inteiras, sinos delgados e às vezes profundos.

As células do talo prostrado são cilíndricas alongadas com comprimento x largura = (13,1)21,5-38,0(45,5) x 6,2-13,3 μ m e a média da razão comprimento/largura = 3,2 (Figura 7, A e B). Seus gametângios são raramente solitários, agrupados em até 10 (Figura 10, F e G) eles apresentaram comprimento x largura = 29,0-47,8 x 19,0-43,0 μ m (Figura 7, C e D). Os esporangióforos possuem até cinco células (Figura 10, A e B), sendo uma basal não bulbosa e outra célula-cabeça terminal. Possuem comprimento x largura = (202,0)273,9-411,0(548,0) x 11,2-17,8 μ m (Figura 7, E e F). Esporângios raramente sozinhos, em grupos de mais ou menos cinco (Figura 10, C-E). O seu comprimento x largura = 18,5-28,9 x 15,9-19,4 μ m (figura 7, E e F).

As setas longas e delgadas possuem comprimento x largura = 128,0-242,0 x 3,2-8,7 μ m (Figura 7, G). As setas curtas apresentam comprimento x largura = 20,3-29,0 x 3,3-3,7 μ m (Figura 7, H). Os zoósporos quadriflagelados têm forma alongada a ovóide, com comprimento x largura = 5,6-5,7 x 3,0-3,3 μ m (Figura 9, B). Os gametas biflagelados são arredondados a ovóides, com comprimento x largura = 6,1-6,5 x 5,2-6,0 μ m (Figura 9, A).

Cephaleuros sp.2 apresenta talo prostrado circular a irregular e margem inteira. O sistema prostrado é pseudoparenquimatoso a filamento aberto, com diâmetro de 0,5-4,0 mm, com

dicotomia, tricotomia ou divisão irregular (Figura 8, A - D). As células do talo prostrado são cilíndricas curtas (Figura 8, B), com comprimento x largura = 11,0-17,3 x 5,0-9,4 μm . As células irregulares (Figura 8, C e D) possuem comprimento x largura = 7,7-24,5 x 4,2-9,4 μm . Seus gametângios são solitários ou agrupados de 2 a 5 (Figura 8, E) e apresentam comprimento x largura = 23,4-34,0 x 19,0-28,3 μm (Figura 11, D).

As setas longas e delgadas (Figura 11, B) possuem comprimento x largura = 142,0-295,0 x 4,1-11,5 μm (Figura 8, F). As setas curtas têm comprimento x largura = 19,8-30,2 x 4,3-4,9 μm . Os esporangióforos possuem célula-cabeça terminal e célula basal não bulbosa (Figura 11, B e C), com comprimento x largura = 144,0-336,0 x 8,1-12,9 μm (Figura 8, G). Esporângios aparecem em grupos de até oito (Figura 11, E), com comprimento x largura = 18,0-25,9 x 11,5-22,5 μm (Figura 8, H). Os gametas biflagelados são arredondados a ovóides, com comprimento x largura = 3,9-4,9 x 3,9-4,9 μm (Figura 9, C e D). Os zoósporos quadriflagelados não foram visualizados.

Thompson e Wujek (1997) depois de muitos estudos utilizando medidas das células vegetativas, setas, esporangióforos, esporângios e gametângios, concluíram que dimensões não são definitivas. Elas variam muito e acabam não separando as espécies adequadamente. Porém, o hábito de crescimento é bom para delimitar as espécies, assim como, o tipo de lesão produzida, pois corresponde ao hábito de crescimento da alga e às respostas dos hospedeiros à colonização. Essa é uma característica usual na identificação rápida em campo.

López-Bautista, Rindi e Guiry (2006) baseados em estudos filogenéticos moleculares e morfológicos consideraram as seguintes características: hábito subcuticular, vida heteromórfica e zoosporângios em grupos, como características filogenéticas significantes. Contudo, forma e tamanho de células, hábito prostrado/ereto e substrato colonizado, normalmente usados pra separar espécies, não possuem relevância filogenética. Eles ainda concluíram que são necessários mais estudos para a classificação dos gêneros e espécies existentes nessa família.

As chaves de identificação com descrições e ilustrações do gênero *Cephaleuros* são escassas e antigas, o que dificulta a identificação das espécies. Em muitos casos, apenas a

avaliação morfológica não é suficiente para a identificação das espécies, pois estas possuem características taxonômicas semelhantes.

A mancha de alga (*C. virescens*) foi relatada em muitos hospedeiros de vários países, como Estados Unidos (HOLCOMB, 1986; MARLATT; ALFIERI, 1981), Colômbia (PARDO-CARDONA, 2004) e Brasil (ALMEIDA; VASCONCELOS; FREIRE, 1985; BATISTA; LIMA, 1949; VENTURA; COSTA, 2003).

A espécie *Cephaleuros* sp.1 é semelhante em muitas características à espécie *C. virescens* (Tabela 1). As semelhanças são: talo mais ou menos circular com margem crenada, ramificação fechada ou aberta. Esporangióforos solitários ou em tufo de 3 a 5. Esporangióforos secundários gerados a partir do primário. Os gametângios se desenvolvem de células terminais dos ramos laterais da mesma maneira que os esporangióforos iniciais. Os gametângios se desenvolvem acima do talo e se agrupam de 2 a 6 ou mais. Quando muitos se desenvolvem, uma massa deles rompe a cutícula do hospedeiro (Figura 10, F).

As duas espécies citadas acima se diferem em algumas características, como: em *C. virescens* as células do filamento prostrado, em média, são maiores e mais largas. Os esporangióforos são menores, chegando à metade do comprimento dos esporangióforos de *Cephaleuros* sp.1. As setas longas e delgadas são menores no comprimento, chegando à metade do comprimento das setas de *Cephaleuros* sp.1. As setas pequenas são mais largas. Os zoósporos e os gametas são maiores em *C. virescens* (Tabela 1).

A espécie *Cephaleuros* sp.2 não apresenta grande semelhança com as 17 espécies de *Cephaleuros* (*C. biolophus* Thompson e Wujek, *C. diffusus* Thompson e Wujek, *C. druetii* Thompson e Wujek, *C. expansa* Thompson e Wujek, *C. henningsii* Schmidle, *C. karstenii* Schmidle, *C. lagerheimii* Schmidle, *C. minimus* Karsten, *C. parasiticus* Karsten, *C. parasiticus* var. *nana* (Karsten) Thompson e Wujek, *C. pilosa* Thompson e Wujek, *C. solutus* Karsten, *C. tumidae-setae* Thompson e Wujek, *C. virescens* Kunze, *C. japonicus* Suto e Ohtani, *C. microcellularis* Suto e Ohtani e *C. aucubae* Suto e Ohtani).

As características de *Cephaleuros* sp.2 que a difere das 17 espécies citadas são: divisão celular do talo prostrado em dicotomia, tricotomia e divisão irregular, formato arredondado a

ovóide dos gametas. Sendo esta última também encontrada em *Cephaleuros* sp.1.

Os zoósporos de *Cephaleuros* sp.1 são menores que os gametas, contrariando o que foi observado na literatura consultada (SUTO; OHTANI, 2009; THOMPSON; WUJEK, 1997).

Thompson e Wujek (1997) observaram gametas arredondados à reniformes em fungos, que foram confundidos com *Cephaleuros*, porém isso não se aplica a essa pesquisa, pois as espécies encontradas apresentam todas as características para o gênero *Cephaleuros*. Segundo esses mesmos autores, os zoósporos de *Cephaleuros* ainda dentro dos zoosporângios são arredondados e logo depois de liberados apresentam um formato de lança invertida. Posteriormente, quando senescentes, mudam novamente para um formato esférico.

Os zoósporos apresentam quatro flagelos e suas extremidades, às vezes, aparecem abauladas. O formato arredondado dos gametas de *Cephaleuros* sp.1 pode ser observado na Figura 9, A, que evidencia a liberação dos mesmos pelo poro papilar do gametângio.

Vários autores relatam a dificuldade de identificação das espécies do gênero *Cephaleuros* em decorrência da similaridade morfológica entre elas (BROOKS, 2004; JOUBERT; RIJKENBERG, 1971; THOMPSON; WUJEK, 1997).

As análises de microscopia eletrônica de varredura das superfícies foliares de *C. canephora* e *P. guajava* confirmaram a localização da alga abaixo da cutícula das folhas, além de mostrar detalhes dos gametângios, esporangióforos, esporângios e setas (Figuras 10 e 11).

As análises da ultraestrutura dos zoosporângios (CHAPMAN, 1976), gametas (CHAPMAN, 1980), zoósporos (CHAPMAN, 1981) e aparato flagelar dos gametas (CHAPMAN; HENK, 1983) de *Cephaleuros virescens* foram realizadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Os estudos ultraestruturais de varredura dessa pesquisa contribuíram na diferenciação das espécies de *Cephaleuros* (*Cephaleuros* sp.1 e *Cephaleuros* sp.2).

Tabela 1 - Características morfológicas das espécies de *Cephaleuros* que colonizam folhas de café Conilon e goiabeira do município de Sooretama, ES.

Características		Algas ¹		
		<i>Cephaleuros virescens</i>	<i>Cephaleuros</i> sp.1	<i>Cephaleuros</i> sp.2
Habitat		subcuticular na face adaxial	subcuticular na face adaxial	subcuticular na face adaxial
Talo	forma	circular, margem inteira ou crenada	circular, margem inteira ou crenada	circular a irregular, margem inteira
	diâmetro (mm)	1,0-8,0	0,5-8,0	0,5-4,0
	hábito de crescimento	pseudoparenquimatoso	pseudoparenquimatoso	pseudoparenquimatoso a filamento aberto
Células do filamento prostrado	forma	cilíndrica alongada	cilíndrica alongada	1) cilíndrica curta 2) irregular
	comprimento x largura (µm)	22,0-79,0 x 7,0-24,0	(13,1)21,5-38,0(45,5) x 6,2-13,3	1)11,0-17,3 x 5,0-9,4 2)7,7-24,5 x 4,2-9,4
	média da razão (comprimento x largura)	2,7	3,2	1)2,2 2)2,0
	tipo de ramificação	dicotomia simétrica	dicotomia simétrica	dicotomia e tricotomia ou irregular
Setas	tipo	1)filamentos longos e delgados 2)filamentos curtos	1)filamentos longos e delgados 2) filamentos curtos	1)filamentos longos e delgados 2) filamentos curtos
	comprimento x largura (µm)	1) 70,0-100,0 x 4,0-7,0 2) 20-35 x 6,0-9,0	1) 128,0-242,0 x 3,2-8,7 2) 20,3- 29,0 x 3,3-3,7	1) 142,0-295,0 x 4,1-11,5 2)19,8-30,2 x 4,3-4,9
Gametângios	número em grupos	2-6 ou mais	2-10	2-5
	comprimento x largura (µm)	29,0-58,0 x 18,0-43,0	29,0-47,8 x 19,0-43,0	23,4-34,0 x 19,0-28,3
Gametas	comprimento x largura (µm)	6,5-10,0 x 2,5-5,5	6,1-6,5 x 5,2-6,0	3,9-4,9 x 3,9-4,9
	comprimento do flagelo	1 e ¼ do comprimento do gameta	não detectado	não detectado
Esporangióforos	comprimento x largura (µm)	70,0-240,0 x 12,0-14,0	(202,0)273,9-411,0(548,0) x 11,2-17,8	144,0-336,0 x 8,1-12,9
	inserção da célula cabeça	terminal não bulbosa	terminal não bulbosa	terminal não bulbosa
	célula basal	não bulbosa	não bulbosa	não bulbosa
Esporângios	comprimento x largura	17,0-35,0 x 15,0-28,0	18,5-28,9 x 15,9-19,4	18,0-25,9 x 11,5-22,5
	número por esporangióforo	até 6	até 5	até 8
Zoósporos	comprimento x largura	7,0-14,0 x 4,5-6,5	5,6-5,7 x 3,0-3,3	não detectado
Lesões	necroses:			
	• das células epidérmicas	às vezes presente	às vezes presente	ausente
	• das células do parênquima paliçádico	às vezes presente	às vezes presente	ausente
	• das células do parênquima lacunoso	ausente	às vezes presente	ausente
	tecido cortíceo protetor	às vezes presente	ausente	ausente

¹ *C. virescens* (espécie tipo). *Cephaleuros* sp.1 (em café Conilon). *Cephaleuros* sp.2 (em goiabeira).

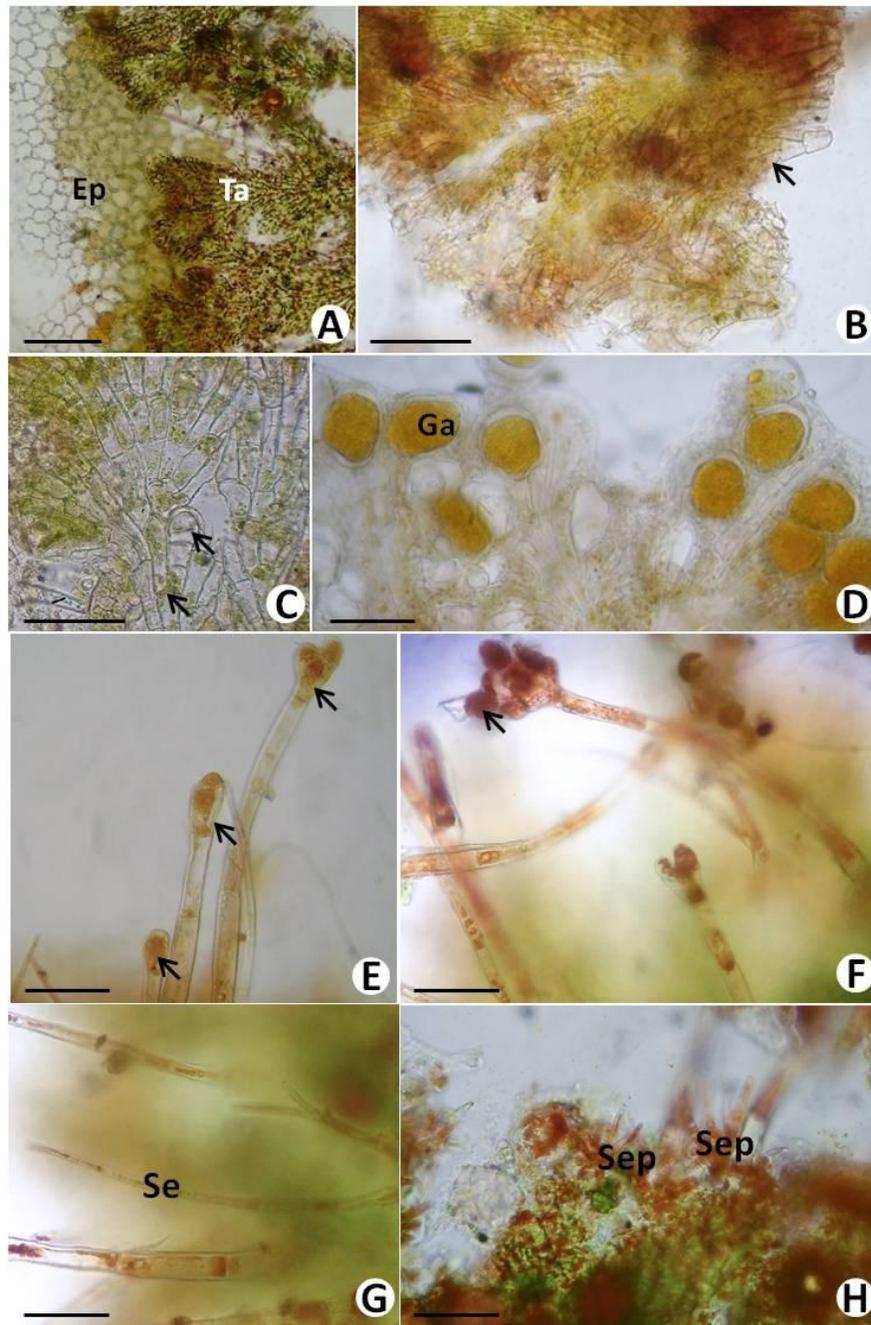


Figura 7 - (A-H) Aspectos do talo e estruturas reprodutivas de *Cephaleuros* sp.1 sobre a epiderme foliar de *C. canephora*. (A) Sistema prostrado com ramificações sobre epiderme. (B) Detalhe de ramificação dicotômica (seta). (C) Início do desenvolvimento do gametângio e detalhe de ramificação dicotômica (setas). (D) Gametângios maduros. (E) Esporangióforos com início do desenvolvimento dos esporângios (setas). (F) Esporangióforo maduro, com detalhe para os esporângios (seta). (G) Seta longa e delgada. (H) Setas curtas. Barra A = 45,0 μ m. Barras B, C, D, E, F, G e H = 22,5 μ m. Ta = talo prostrado. Ep = epiderme adaxial. Ga = gametângio. Se = seta longa e delgada. Sep = setas pequenas.

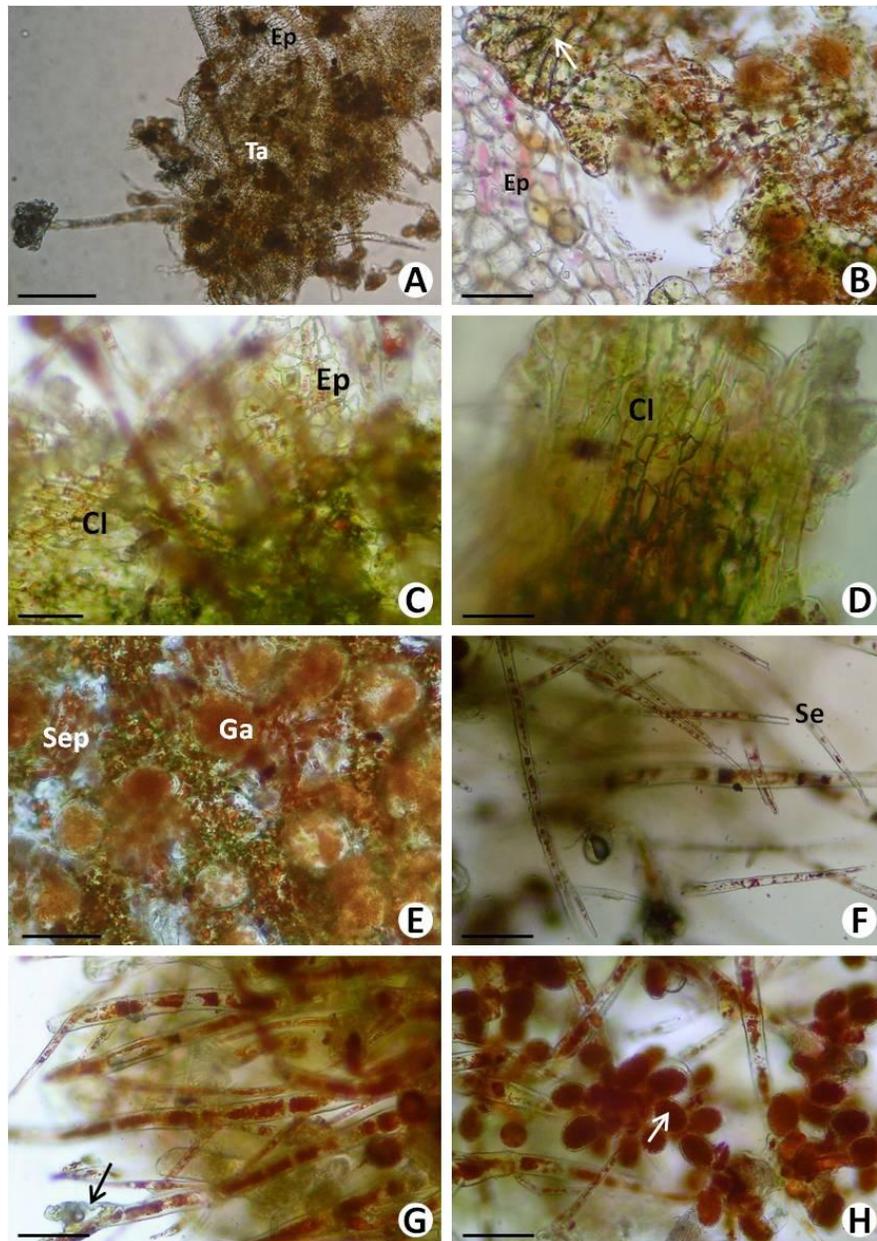


Figura 8 - (A-H) Aspectos do talo e estruturas reprodutivas de *Cephaleuros* sp.2 sobre a epiderme foliar de *P. guajava*. (A) Sistema prostrado sobre epiderme foliar. (B) Sistema prostrado sobre epiderme evidenciando ramificações dicotômicas e tricotômicas. (C e D) Sistema prostrado sobre a epiderme evidenciando as células irregulares. (E) Gametângios e setas pequenas (Sep). (F) Setas longas e delgadas (Se). (G) Esporangióforos, com início da formação dos esporângios (seta). (H) Esporangióforos maduros, detalhe dos esporângios (seta). Barra B, E, F, G e H = 22,5 μ m. Barra A = 90,0 μ m. Barra C = 45 μ m. Barra D = 11,25 μ m. Ta = talo prostrado. Ep = epiderme adaxial. CI = células irregulares. Ga = gametângio.

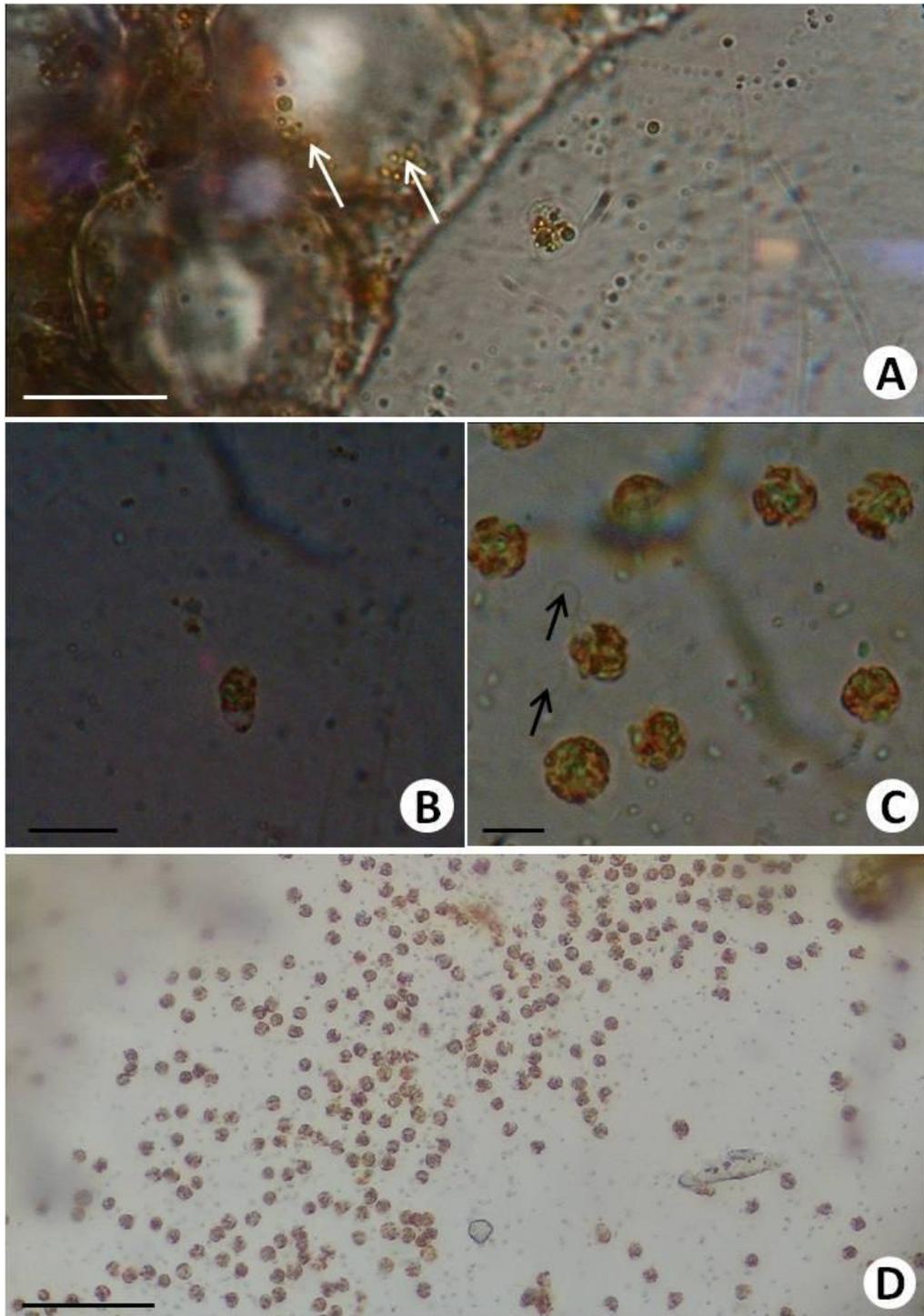


Figura 9 - (A) Gametas de *Cephaleuros* sp.1, com detalhe (setas) de dois gametas ainda dentro do gametângio em folha de *C. canephora*. (B) Zoósporos de *Cephaleuros* sp.1 em folha de *C. canephora*. (C e D) Gametas de *Cephaleuros* sp.2 em folha de *P. guajava* (setas = flagelos). Barras A = 9,0 μm . Barra B = 6,0 μm . Barra C = 4,5 μm . Barra D = 22,5 μm .

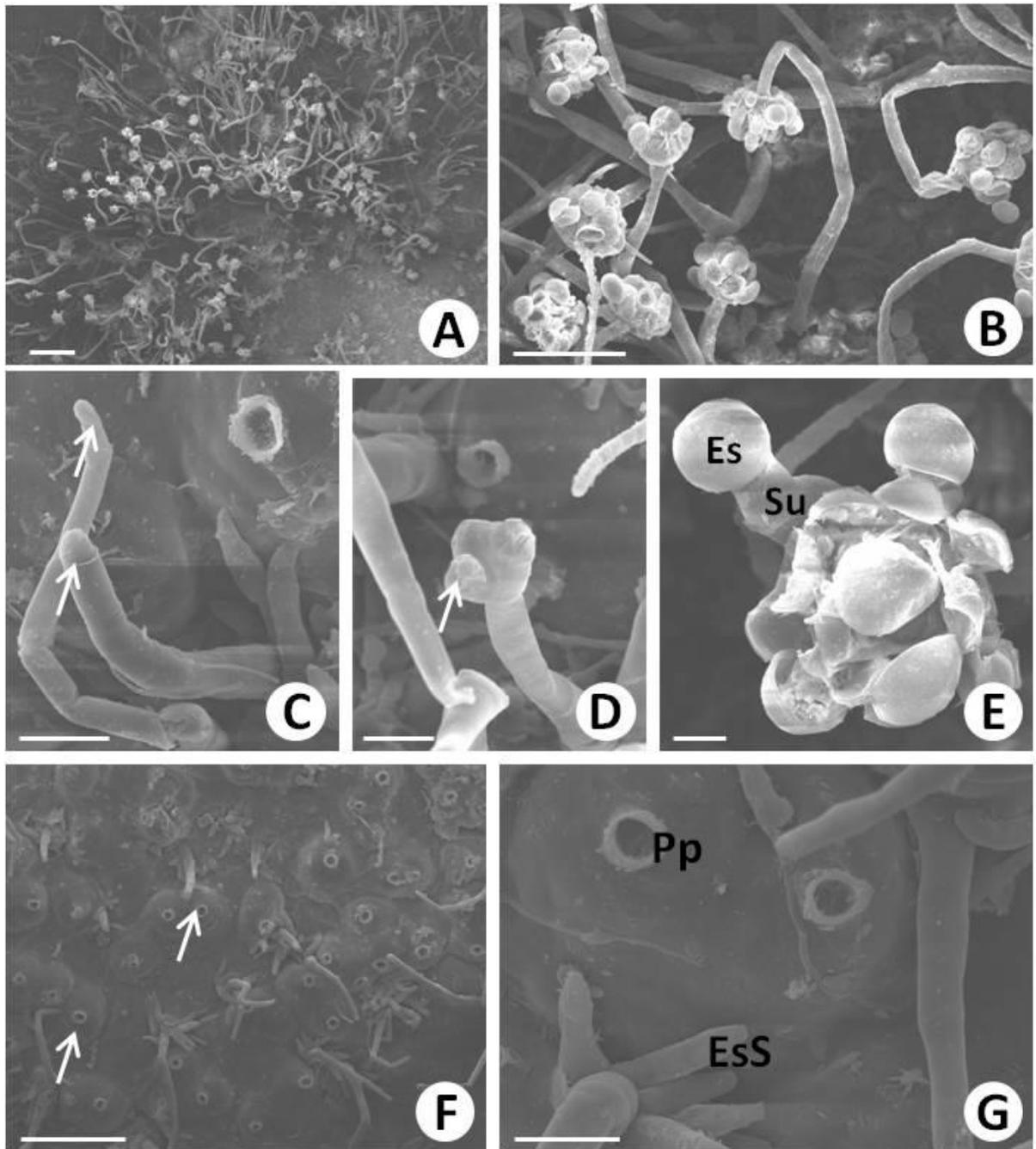


Figura 10 - (A-G) Eletromicrografias da superfície foliar de *C. canephora* colonizada por *Cephaleuros* sp.1. (A) *Cephaleuros* sp.1 com as estruturas reprodutivas. (B) Esporangióforos maduros. (C e D) Início da formação dos esporângios (setas). (E) Esporângios maduros. (F) Visão geral dos gametângios (setas). (G) Detalhe dos gametângios e do início da formação dos esporangióforos secundários. Es = esporângio. Su = célula *suffultory*. Pp = poro papilar, por onde saem os gametas. EsS = esporangióforo secundário. Barra A = 200 μm . Barra B e F = 100 μm . Barra C, D e G = 20 μm . Barra E = 10 μm .

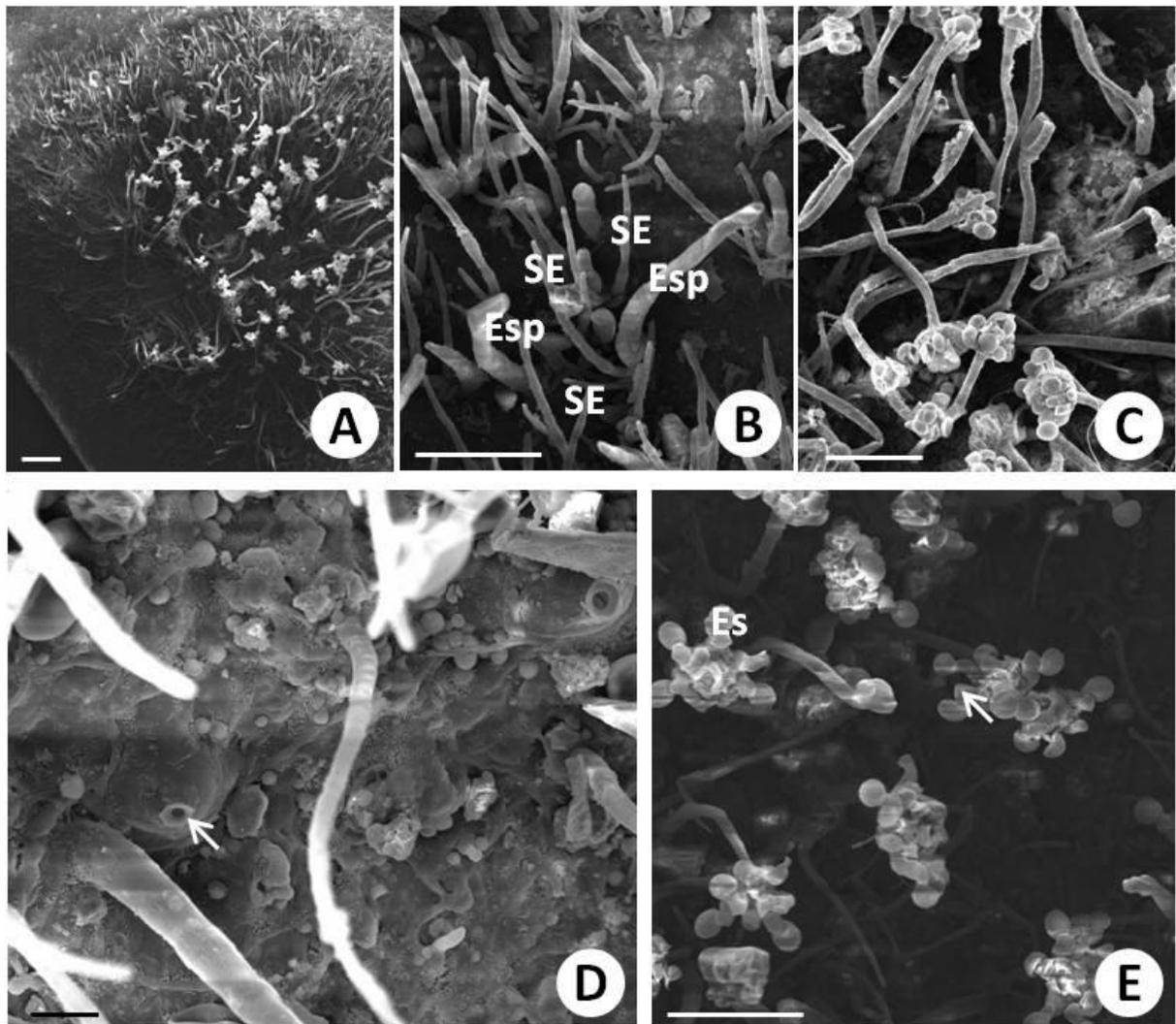


Figura 11 - (A-E) Eletromicrografias da superfície foliar de *P. guajava*, colonizada por *Cephaleuros* sp.2. (A) Visão geral da lesão causada por *Cephaleuros* sp.2 evidenciando as estruturas reprodutivas. (B) Setas longas e delgadas e esporangióforos iniciais. (C) Esporangióforos maduros. (D) Detalhe dos gametângios (setas = poro papilar). (E) Detalhes dos esporângios (seta = célula *suffultory*). SE = setas longas e delgadas. Esp = esporangióforos iniciais. Es = esporângio. Barra A = 200 µm. Barra B, C e E = 100 µm. Barras D = 20 µm.

5.3 ANÁLISE ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA

O limbo de *Coffea canephora*, em secção transversal, mostra epiderme unisseriada com células de formato quadrado na face adaxial e mesofilo dorsiventral (Figura 12, A). Em *Psidium guajava* o limbo exibe epiderme unisseriada que é constituída por células de formato irregular; na região subepidérmica da face adaxial, observaram-se três camadas de células parenquimáticas; o mesofilo é dorsiventral.

Em ambas as espécies, as secções transversais foliares tratadas com sudan IV evidenciaram a presença de algas no espaço subcuticular (Figura 12, B; Figura 13, B).

Cortes transversais na região lesionada do limbo de *C. canephora* e *P. guajava* mostram células da epiderme da face adaxial achatadas no sentido periclinal e com acúmulo de compostos fenólicos (Figura 12, D, E e F; Figura 13, A). Em *C. canephora*, também, foi verificada a lignificação das paredes anticlinais e periclinal externa das células epidérmicas (Figura 12, C). No mesofilo de *C. canephora*, folhas com lesões em estágios mais avançados apresentaram acúmulo de fenólicos no parênquima paliçádico e lacunoso (Figura 12, E e F).

Em ambas as espécies as folhas lesionadas mostraram menor espessura da epiderme na face adaxial (Tabelas 2 e 3). Em *C. canephora* as áreas mais delgadas foram em lesões mais avançadas (Tabela 2). Nesta espécie houve um aumento no número de camadas e na espessura do parênquima paliçádico abaixo de lesões iniciais, ocasionado por divisões celulares anticlinais (Figura 14 e Tabela 2). Áreas com sinais de necrose foram observadas em estágios mais avançados de desenvolvimento das lesões (Figura 12, E e F).

Segundo Agrios (2005) a primeira defesa de uma planta contra agentes invasores é a sua superfície, onde ocorre a aderência de muitos patógenos, que podem penetrar na mesma e causar a infecção. A cutícula que recobre a epiderme da folha e que é composta por cutina e cera é a primeira barreira para alguns patógenos (PASCHOLATI; LEITE, 1995, apud LORENZETTI, 2009).

As espécies de *Cephaleuros* desenvolvem-se abaixo da cutícula de seus hospedeiros. Como isso acontece ainda não foi elucidado (THOMPSON; WUJEK, 1997). Mas sabe-se que

Cephaleuros necessita de umidade para efetivar sua reprodução, por meio da liberação de gametas e zoósporos. De acordo com Medeiros, Ferreira e Dianese (2003), o alto nível de cera da cutícula dificulta o acúmulo de água sobre a folha, interferindo na germinação de esporos que necessitam de elevada umidade.

Os compostos fenólicos são grupos heterogêneos de substâncias presentes em quase todos vegetais. São depositados no vacúolo, citoplasma ou na parede celular. Sua produção é estimulada quando a planta está sob estresse abiótico ou biótico (BENNET; WALLSGROVE, 1994; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2009). Segundo Joubert e Rijkenberg (1971) algas do gênero *Cephaleuros* podem secretar subprodutos nocivos para seus hospedeiros. Paredes mais espessas, que apresentam certa lignificação, podem auxiliar na resistência à ação de enzimas degradadoras e à difusão de toxinas liberadas pelos patógenos. Assim, regiões lignificadas podem inibir o desenvolvimento de patógenos nessas áreas (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2009). Essas reações de defesa também foram observadas na presente pesquisa (acúmulo de compostos fenólicos e lignificação).

A redução da espessura da epiderme adaxial de *C. canephora* e *P. guajava* indica achatamento mecânico causado pela presença da alga. Além disso, o espessamento do parênquima paliçádico, em lesões iniciais de *C. canephora*, foi evidenciado pelo aumento no número de camadas celulares do parênquima, por meio de divisões celulares. Esse espessamento sugere uma reação inicial de defesa à colonização pela alga. Brooks (2004), Holcomb (1986), Suto e Ohtani (2009) e Thompson e Wujek (1997) observaram células modificadas da epiderme (achatamento no sentido periclinal) e alteração do parênquima paliçádico, para proteção dos outros tecidos das folhas colonizadas por espécies de *Cephaleuros*. Em alguns casos, também foi constatada necrose tecidual.

Joubert e Rijkenberg (1971) observaram divisões de células do parênquima esponjoso (lacunoso) em folhas de cafeeiro colonizadas por *Cephaleuros*, além das divisões as células sofreram considerável espessamento de parede. Esses processos culminaram no desaparecimento dos espaços intercelulares. Secções transversais da superfície foliar revelaram a alga completamente isolada do tecido sadio por uma barreira contínua de células de paredes espessas (tecido de cicatrização) e os autores notaram que essa reação

ocorreu em resposta à *Cephaleuros* apenas, e não foi induzida por outros agentes patogênicos do café, como a ferrugem do café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.).

Aguiar e outros (2008) estudaram espécies do gênero de cianobactérias epífitas *Brasilonema*, incluindo uma espécie nova (*Brasilonema octagenarum* UFV-E1) que coloniza *Eucalyptus grandis*. Verificaram danos às folhas do hospedeiro, na superfície adaxial e abaxial, com conseqüente acúmulo de compostos fenólicos na epiderme e parênquima clorofiliano. Foi observado também, tecido de cicatrização, além de necrose foliar.

Opondo-se ao que foi observado no presente estudo, Scot (2008) verificou significativa necrose tecidual, abscisão e prejuízo à qualidade do fruto. Além de perdas na produção vegetal, redução da fotossíntese e do vigor das plantas de *P. guajava* colonizadas por *Cephaleuros*. Lembrando que a avaliação da produção de cafeeiro e goiabeira, colonizados por *Cephaleuros*, não foi realizada nesse trabalho.

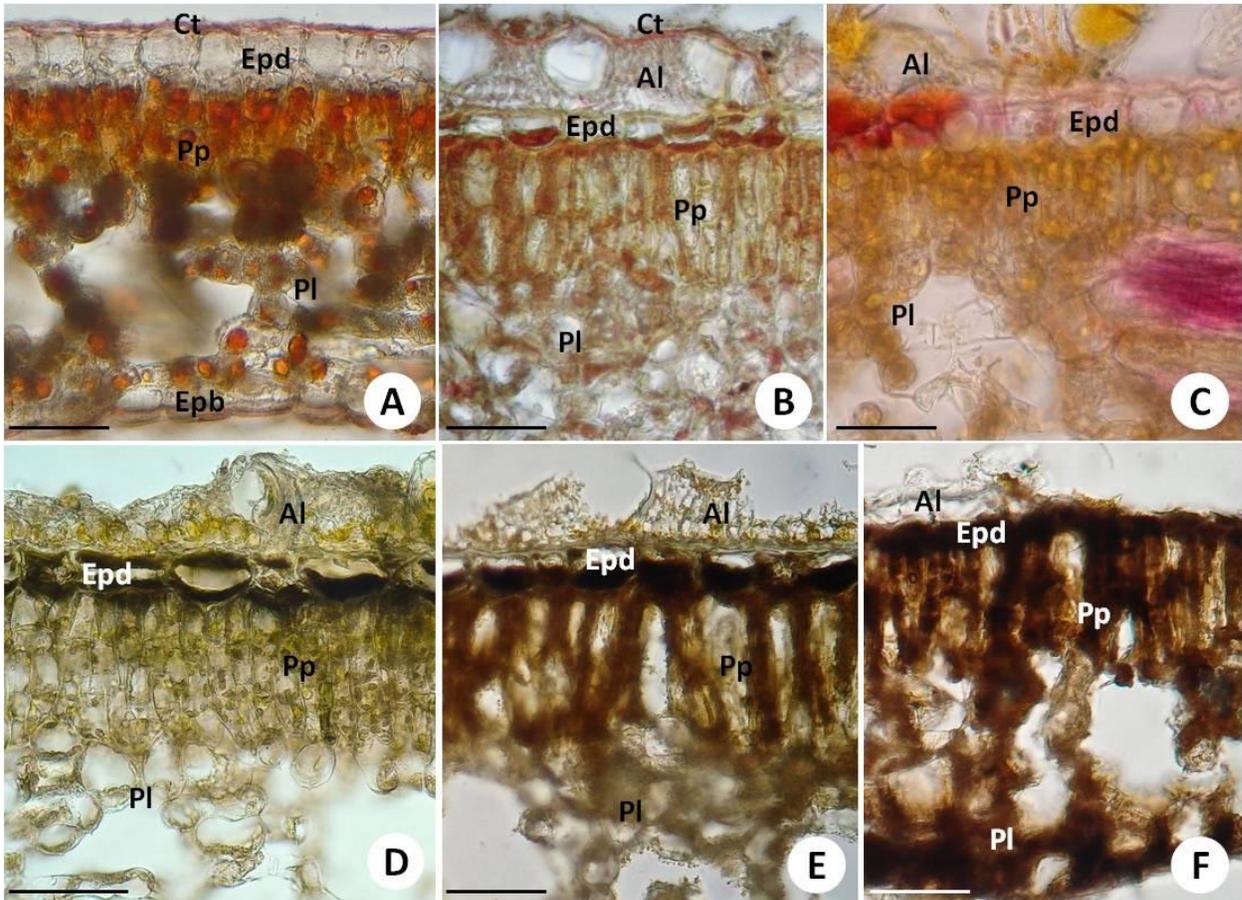


Figura 12 - (A - F) Cortes transversais do limbo de *C. canephora* colonizado por *Cephaleuros* sp.1. Lesões iniciais, intermediárias e avançadas. (A e B) Teste com sudan IV. (A) Área não lesionada. (B) Área lesionada. Notar alga no espaço subcuticular. (C) Teste com floroglucinol acidificado evidenciando a lignificação de paredes de células epidérmicas. (D - F) Teste com cloreto férrico. (D) Lesão inicial. (E e F) Folhas com lesões mais avançadas mostrando maior acúmulo de compostos fenólicos no parênquima clorofiliano e desenvolvimento de necrose. Barras (A - F) = 22,5 μ m. Al = alga, Ct = cutícula, Epd = epiderme adaxial, Epb = epiderme abaxial. Pp = parênquima paliçádico e Pl = parênquima lacunoso.

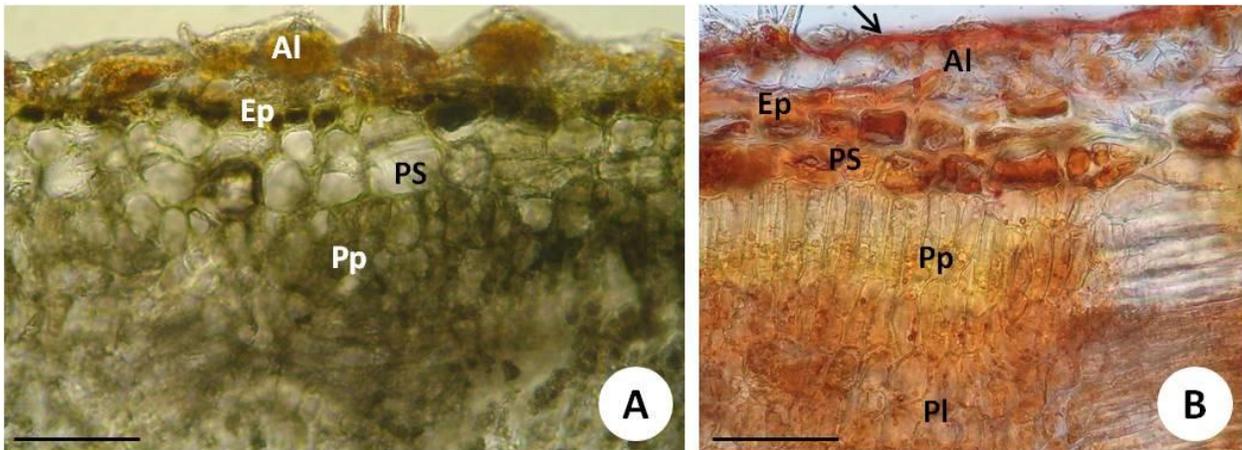


Figura 13 - Cortes transversais do limbo de *P. guajava* colonizado por *Cephaleuros* sp.2. (A) Teste com cloreto férrico evidenciando acúmulo de compostos fenólicos nas células epidérmicas. (B) Teste com sudan IV mostrando a alga na região subcuticular. Barras A e B = 22,5 μ m. Al = alga, seta = cutícula, Ep = epiderme adaxial, PS = parênquima subepidérmico, Pp = parênquima paliçádico, PI = parênquima lacunoso.

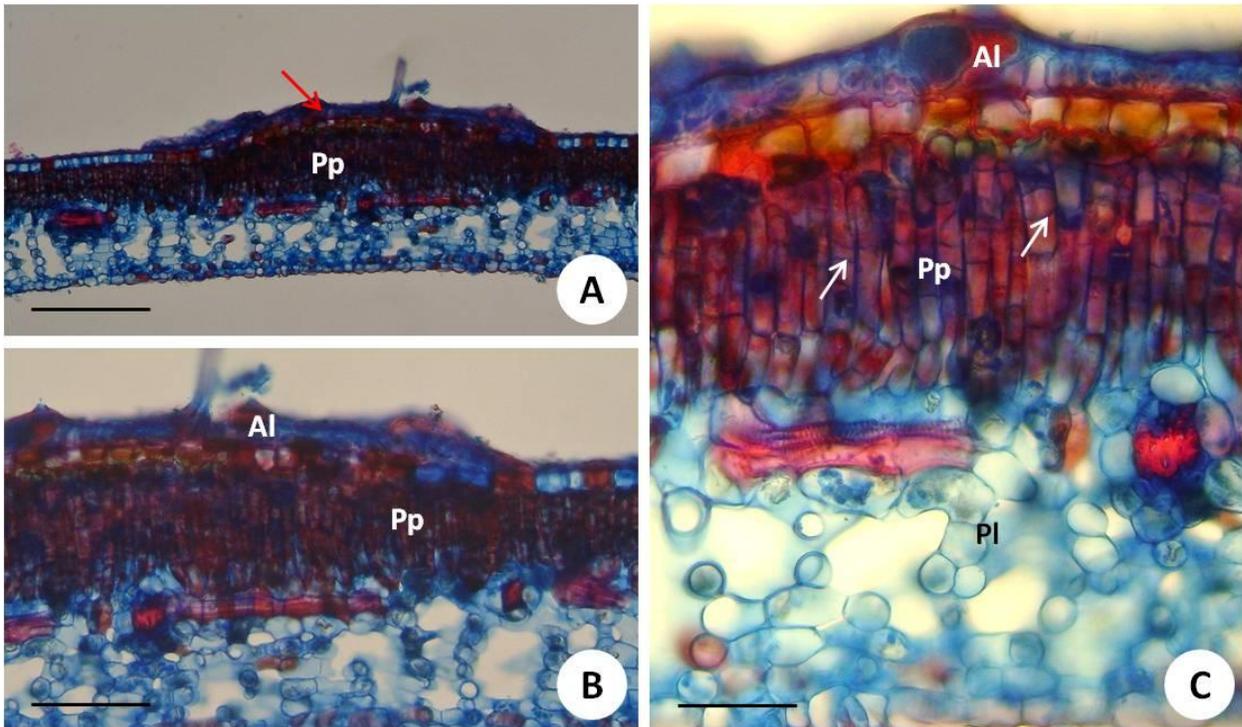


Figura 14 - Cortes transversais do limbo de *C. canephora* colonizado por *Cephaleuros* sp.1. (A e B) Espessamento do parênquima paliçádico. (C) Detalhe (setas brancas) das divisões anticlinais das células do parênquima paliçádico. Al = alga. Pp= parênquima paliçádico. PI = parênquima lacunoso. Seta vermelha = alga. Barra A = 90 μ m. Barra B = 45 μ m. Barra C = 22,5 μ m.

Tabela 2 - Espessura dos tecidos foliares de *C. canephora* (μm) não lesionados e lesionados por *Cephaleuros* sp.1.

Tecidos	Espessura (μm) ¹		
	sem lesão	lesão inicial	lesão avançada
Epiderme adaxial	21,11 a	18,56 ab	14,44 b
Parênquima paliçádico	76,29 b	123,97a	87,56 ab
Parênquima lacunoso	144,08 a	132,03 a	150,37 a
Epiderme abaxial	15,39 a	15,67 a	14,20 a
Limbo	256,87 a	286,64 a	266,56 a

¹Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

Tabela 3 - Espessura dos tecidos foliares de *P. guajava* (μm) não lesionados e lesionados por *Cephaleuros* sp.2.

Tecidos	Espessura (μm) ¹	
	sem lesão	com lesão
Epiderme adaxial	7,10 a	4,90 b
Parênquima subepidérmico	34,40 a	28,80 a
Parênquima paliçádico	70,00 a	66,98 a
Parênquima lacunoso	52,57 a	49,27 a
Epiderme abaxial	7,10 a	6,13 a
Limbo	171,22 a	156,10 a

¹Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

5.4 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Os parâmetros analisados da fluorescência transiente da clorofila *a* não foram comparados entre as espécies de hospedeiros (café Conilon e goiabeira), apenas entre folhas lesionadas e não lesionadas, da mesma planta hospedeira.

Os parâmetros avaliados da fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas de *C. canephora* e *P. guajava*, com e sem lesões (adaptadas ao escuro), da coleta de setembro de 2010, não apresentaram diferença significativa. O mesmo ocorreu para os parâmetros avaliados da fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas de *P. guajava*, da coleta de dezembro de 2010 (Figura 15).

A Figura 16 apresenta os quatro parâmetros derivados do teste JIP, que apresentaram diferenças significativas e foram avaliados nesse estudo. Os parâmetros apresentaram valores menores nas folhas lesionadas de *C. canephora*, da coleta de dezembro de 2010: $\phi R_0 = RE_0/ABS$; $\delta R_0 = RE_0/ET_0$; RE_0/RC e $\delta R_0/(1-\delta R_0)$. Nessa mesma figura também foram apresentados os índices de performance: PI_{ABS} e PI_{TOTAL} .

Lembrando que o parâmetro $\phi R_0 = RE_0/ABS$ indica o quanto de elétrons (rendimento) vindos da Q_A^- os aceptores finais do FSI, conseguem absorver, quando estão oxidados. O parâmetro $\delta R_0 = RE_0/ET_0$ representa a eficiência com que um elétron pode mover-se da plasto-hidroquinona (PQH_2) para os aceptores finais do FSI, quando estão oxidados. O parâmetro RE_0/RC representa o fluxo específico de energia para o transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores finais do FSI, quando estão oxidados. O parâmetro $\delta R_0/(1-\delta R_0)$ descreve a performance das reações de oxidação e redução do FSI. O parâmetro PI_{ABS} representa o índice de desempenho que incorpora os processos da cascata de energia dos primeiros eventos de absorção até a redução de PQ. E o parâmetro PI_{TOTAL} que representa o índice de desempenho que incorpora todos os processos da cascata de energia dos primeiros eventos de absorção até a redução dos aceptores finais do FSI (Figuras 2 e 3).

As reações do complexo citocromo *b6f* (intersistema) ainda não estão totalmente elucidadas, mas um mecanismo conhecido como ciclo Q é responsável pela maioria dos eventos observados. Nesse mecanismo a PQH_2 é oxidada e um elétron é passado ao longo da

cadeia linear de transporte de elétrons do FSI.

Os transportadores de elétrons que atuam na região aceptora do FSI são agentes redutores fortes (vitamina K₁ = quinona A₁; FeSx e ferredoxina, essas formadas por um aglomerado de ferro-enxofre) (MAJEROWICZ, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Analisando os menores valores dos parâmetros do FSI (δR_0 ; ϕR_0 ; RE_0/RC ; $\delta R_0/(1-\delta R_0)$) nas folhas de *C. canephora* com lesões de dezembro de 2010 (Figura 16). E observando a descrição detalhada desses parâmetros pode-se sugerir alteração em um, ou mais de um, dos aceptores finais de elétrons do FSI. Moléculas podem não estar aptas a receberem elétrons (estado não oxidado). Sugere-se, ainda uma alteração da PQH₂ do intersistema, que no estado não oxidado interrompe o transporte de elétrons para o FSI (Figuras 2 e 3).

Na literatura pesquisada, não foram encontrados trabalhos que utilizam os parâmetros relacionados ao FSI, para avaliar estresse biótico. Portanto, os resultados dessa pesquisa foram comparados com trabalhos que relacionam estresse abiótico e fluorescência da clorofila *a*. Os dois trabalhos citados abaixo encontraram, assim como observado nesse estudo, menores valores dos parâmetros (δR_0 , $\delta R_0/(1-\delta R_0)$, ϕR_0 e RE_0/RC) em plantas sob estresse.

Oukarroum, Schansker e Strasser (2009) avaliaram os efeitos do estresse hídrico em variedades de cevada utilizando a fluorescência da clorofila *a*. Esses autores observaram menores valores para os parâmetros (δR_0 , $\delta R_0/(1-\delta R_0)$, ϕR_0 e RE_0/RC) da cultivar Lannaceur, sensível a seca, comparando com os valores dos parâmetros do controle dessa cultivar. Eles ainda sugerem que RE_0/RC , ϕR_0 e δR_0 estão relacionados com o fluxo de elétrons dos aceptores reduzidos do intersistema para os aceptores finais de FSI. E acreditam que uma perda de aceptores finais pode representar perda dos centros de reação de FSI em resposta ao estresse.

Yusuf e outros (2010), por meio de análises fisiológicas e medições de fluorescência da clorofila *a* observaram que a superexpressão do gene metil-transferase (*γ -tocoferol*) em plantas transgênicas (*Brassica juncea*) reduz o efeito do estresse abiótico. Esses autores também encontraram valores menores para os parâmetros (RE_0/RC , δR_0 e ϕR_0) nas plantas

selvagens sob estresse de salinidade, metal pesado e estresse osmótico. Os transgênicos foram resistentes a esses estresses, visto que os parâmetros de FSI (RE_0/RC , δR_0 e ϕR_0) não apresentam diferença significativa entre plantas controle e sob estresse.

Na coleta de dezembro de 2010, o PI_{TOTAL} foi mantido em altos níveis nas folhas não lesionadas de *P. guajava* e *C. canephora*, mesmo não apresentando valores significativamente diferentes das folhas lesionadas. Em folhas de *P. guajava* o PI_{ABS} apresentou maior valor nas folhas sem lesões, mesmo não apresentando diferença significativa das folhas lesionadas (Figuras 15 e 16).

O elevado coeficiente de variação de PI_{TOTAL} e PI_{ABS} , tanto em folhas de *C. canephora* quanto em folhas de *P. guajava*, pode sugerir a ausência de diferença significativa entre os parâmetros das folhas lesionadas e não lesionadas da coleta de dezembro de 2010 (APÊNDICES A e B). Considera-se ainda, que o PI_{TOTAL} é o produto de PI_{ABS} por $\delta R_0/(1-\delta R_0)$ lembrando que o último parâmetro apresentou valor significativamente maior em folhas de *C. canephora* não lesionadas e pôde contribuir para os valores elevados do PI_{TOTAL} . O índice de performance total (PI_{TOTAL}), parâmetro considerado como o mais representativo do teste JIP (STRASSER et al., 2007; ZUBEK et al., 2009; YUSUF et al., 2010) é considerado um indicador de vitalidade da planta (MEHTA et al., 2010) e vem sendo muito utilizado e discutido nas investigações de estresse abiótico (STRASSER et al., 2010).

Os parâmetros encontrados nesse estudo sugerem que a colonização pela alga interfere de alguma maneira no FSI das folhas de *C. canephora* com maior número e diâmetro das lesões, fato observado na coleta de dezembro de 2010 (Figura 16). As folhas de *C. canephora* e *P. guajava* coletadas em setembro de 2010 apresentaram menor número e diâmetro das lesões, não representando uma situação de estresse para as plantas.

A interação planta e alga da família Trentepohliaceae é pouco estudada. Tendo destaque o trabalho de Joubert e Rijkenberg (1971) que observaram algumas algas da família provocando danos aos hospedeiros por meio da redução da área fotossintética das folhas. E de Scot (2008) que estudou folhas de goiaba, magnólia e abacate, colonizadas por *Cephaleuros* e verificou a redução da fotossíntese e do vigor das plantas.

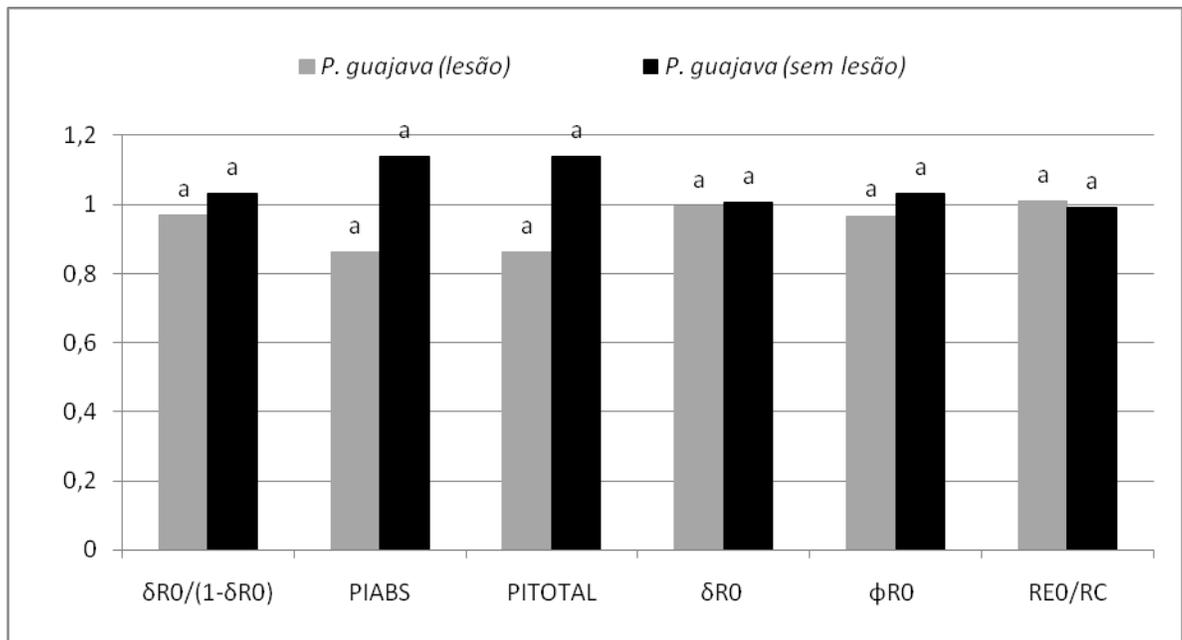


Figura 15 – Parâmetros da fluorescência da clorofila a, após teste JIP, obtidos em folhas lesionadas e não lesionadas de *P. guajava*, da coleta de dezembro de 2010. Foi aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=12$). Cada parâmetro foi normalizado usando a média de folhas com e sem lesões.

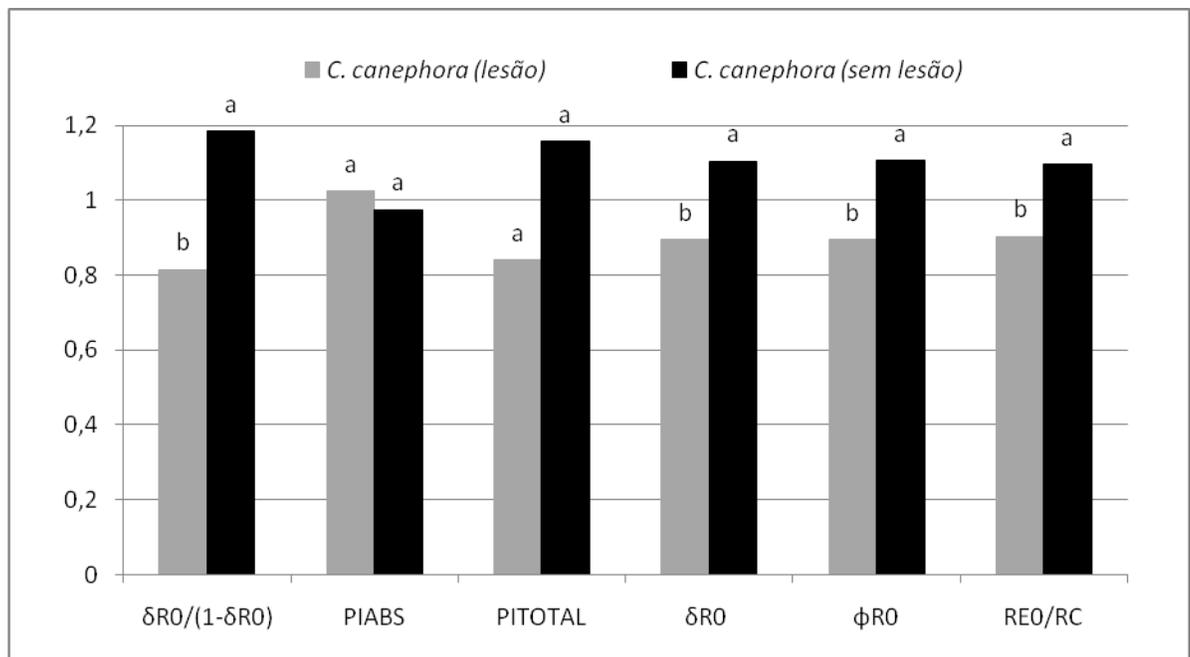


Figura 16 – Parâmetros da fluorescência da clorofila a, após teste JIP, obtidos em folhas lesionadas e não lesionadas de *C. canephora*, da coleta de dezembro de 2010. Foi aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$) ($n=12$). Cada parâmetro foi normalizado usando a média de folhas com e sem lesões.

6 CONCLUSÕES

As algas Trentepohliaceae que ocorrem nas folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* pertencem ao gênero *Cephaleuros*. De acordo com as características morfológicas observadas há evidências de se tratar de espécies diferentes. *Cephaleuros* sp.1 colonizando *Coffea canephora* e *Cephaleuros* sp.2 colonizando *Psidium guajava*.

A presença de algas do gênero *Cephaleuros* em folhas de *Coffea canephora* e *Psidium guajava* causou alteração na estrutura e histoquímica foliar evidenciada por epiderme adaxial achatada, lignificada e com acúmulo de compostos fenólicos, nas duas espécies.

Folhas de *Coffea canephora* coletadas em dezembro de 2010, com maior densidade de lesões/folha e diâmetro de lesões apresentaram menores valores de parâmetros relacionados ao FSI da fluorescência da clorofila *a* indicando estresse.

Os resultados da anatomia, histoquímica e fluorescência da clorofila *a* das folhas colonizadas indicam que as folhas de *Coffea canephora* foram mais afetadas pela colonização de *Cephaleuros* do que as folhas de *Psidium guajava*.

7 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. Flórida: Elsevier Academic Press, 2005, 948p.

AGUIAR, R. et al. A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. **J. Phycol.**, n.44, p.1322-1334, 2008.

AKIYAMA, M. On some brazilian species of Trentepohliaceae. **Natural Science**, Japão, v. 5, p.81-95, 1971.

ALMEIDA, R. T; VASCONCELOS, I.; FREIRE, V. F. Plantas hospedeiras da alga *Cephaleuros virescens* Kunze no estado do Ceará, Brasil. **Ciências Agrônômicas**, Fortaleza, v. 16, n. 2, p. 53-55, 1985.

BATISTA, A. C.; LIMA, D. A. Lista de suscetíveis da alga *Cephaleuros mycoidea* Karsten em Pernambuco. (Host list of the alga, *Cephaleuros mycoidea* Karsten, in Pernambuco). **Indus. e Com. B.**, v. 16, p. 32-46. 1949.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, Lancaster, v.1, n.127, p.617-633. 1994.

BROOKS, F. E. Plant-Parasitic Algae (Chlorophyta: Trentepohliales) in American Samoa. **Pacific Science**, Hawaii, v. 58, n. 3, p. 419-428, 2004.

CARVALHO, L. M. et al. Alterações morfológicas em cafeeiros submetidos a baixas temperaturas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.131-136, 1998.

CASTRO-VARGAS et al. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 319-324, 2010.

CHAPMAN, R. L. Ultrastructure of *Cephaleuros virescens* (Chroolepidaceae; Chlorophyta). I. Scanning Electron Microscopy of Zoosporangia. **American Journal of Botany**, v. 63, n. 8, p. 1060-1070, 1976.

CHAPMAN, R. L. Ultrastructure of *Cephaleuros virescens* (Chroolepidaceae; Chlorophyta). II. Gametes. **American Journal of Botany**, v. 67, n. 1, p. 10-17, 1980.

CHAPMAN, R. L. Ultrastructure of *Cephaleuros virescens* (Chroolepidaceae; Chlorophyta). III. Zoospores. **American Journal of Botany**, v. 68, n. 4, p. 544-556, 1981.

CHAPMAN, R. L.; GOOD, B. H. Ultrastructure of plasmodesmata and cross walls in *Cephaleuros*, *Phycopeltis* and *Trentepohlia* (Chroolepidaceae; Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 13, n. 3, p. 241-246, 1978.

CHAPMAN, R. L.; HENK, M. C. Ultrastructure of *Cephaleuros virescens* (Chroolepidaceae; Chlorophyta). IV. Absolute Configuration Analysis of the Cruciate Flagellar Apparatus and Multilayered Structures in the Pre- and Post-Release Gametes. **American Journal of Botany**, v. 70, n. 9, p. 1340-1355, 1983.

CHAPMAN, R.L; HENK, M. C. Observations on habitat, morphology and ultrastructure of *Cephaleuros parasiticus* (Chlorophyta) and a comparison with *C. virescens*. **Journal of Phycology**, v. 21, p. 513–522, 1985.

COSTA, A. F. S.; COSTA, A. N. (eds). **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: INCAPER, 2003, 341p.

COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E.V. Botânica e variedades. In: COSTA, A. F. S.; COSTA, A. N. (eds). **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: INCAPER, 2003, p. 25-56.

DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, v. 86, p. 99-114, 2004.

DAVIES, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 465–512, 2006.

DÔRES, R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica da Fava D’Anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**. 2009. (Tese) (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

FALQUETO, A. R. et al. Respostas fotossintéticas de *Carica papaya* L. à infecção fúngica. In: MARTINS, D.S. (Org.). **Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória:INCAPER, 2003 .

FALQUETO, A. R. et al. Características da fluorescência da clorofila em cultivares de arroz com ciclo precoce, médio e tardio. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p. 579-581, 2007.

FASSIO, L. H.; SILVA, A. E. S. Importância Econômica e Social do Café Conilon. In: FERRÃO et al. (Eds.). **Café Conilon**. Vitória: INCAPER, 2007. p. 37-49.

GERRITS, P.O. **The application of glycol metacrylate histotechnology: some fundamental principles**. Germany: Leica Gmbh, 1964.

GUIDI, L. et al. Effects of ozone exposure or fungal pathogen on white lupin leaves as determined by imaging of chlorophyll *a* fluorescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, p. 851-857, 2007.

GUREVITCH, J.; SCHEINER, S. M.; FOX, G. A. **Ecologia Vegetal**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 574p.

HOEK, C. van den; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

- HOLCOMB, G. E. Hosts of the Parasitic Alga *Cephaleuros virescens* in Louisiana and New Host Records for the Continental United States. **Plant Disease**, v. 70, n. 11, p. 1080-1082, 1986.
- HORST, R. J. et al. Infection of maize leaves with *Ustilago maydis* prevents establishment of C4 photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p. 19-28, 2008.
- HUI-ZHENG, F. et al. Psidials A-C, Three Unusual Meroterpenoids from the Leaves of *Psidium guajava* L. **Organic Letters**, v. 12, n. 4, p. 656-659, 2010.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Co, 1940.
- JOUBERT, J. J.; RIJKENBERG, F. H. J. Parasitic green algae. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 9, p. 45-64, 1971.
- LIBERATO, J. R.; COSTA, H.; VENTURA, J. A. **Índice de doenças de plantas do estado do Espírito Santo**. Vitória:EMCAPA, 1996, 110p.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J. M.; CHAPMAN, R. L. Phylogenetic affinities of the Trentepohliales inferred from small-subunit rDNA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2099-2106, 2003.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J. M.; RINDI, F.; CASAMATTA, D. The systematics of subaerial algae. In: SECKBACH, J. (ed.). **Algae and cyanobacteria in extreme environments**. Springer, 2007, p. 599-617.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J. M.; RINDI, F.; GUIRY, M. D. Molecular systematics of the subaerial green algal order Trentepohliales: an assessment based on morphological and molecular data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1709-1715, 2006.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J. M.; WATERS, D. A.; CHAPMAN, R. L. The Trentepohliales revisited. **Constancea**, v. 83, n. 1, p. 1-23, 2002.
- LÓPEZ-BAUTISTA, J. M.; WATERS, D. A.; CHAPMAN, R. L. Phragmoplastin, green algae and the evolution of cytokinesis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1715–1718, 2003.
- LORENZETTI, E. R. **Interação patógeno-hospedeiro no patossistema capim limão-ferrugem das folhas e avaliação de ingredientes ativos naturais no controle da doença**. 2009. (Dissertação) (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.
- MALAGI, G.; SANTOS, I. **Ocorrência de mancha de alga causada por *Cephaleuros virescens* em pitangueira, no Brasil**. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Vitória, 2008.

- MARLATT, R. B.; ALFIERI, Jr. S. A. Hosts of *Cephaleuros*, a parasitic alga in Florida. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, Flórida, v. 94, p. 311-317, 1981a.
- MARLATT, R. B.; ALFIERI, Jr. S. A. Hosts of a parasitic alga, *Cephaleuros* Kunze, in Florida. **Plant Disease**, Flórida, v. 65, p. 520-522, 1981b.
- MEDEIROS, R. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; DIANESE, J.C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003, 90p.
- MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 16-20, 2010.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, p.368-373, 1964.
- OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v.137, p. 188-199, 2009.
- PARDO-CARDONA, V. M. Directorio de hospedantes de *Cephaleuros virescens* Kunze en Colombia y primer registro de *Tectona grandis* L. (Verbenaceae) como hospedante. **Ascolfi Informa**, v. 30, n. 2, p. 10-12, 2004.
- PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta bot. bras.**, v. 23, n. 4, p.1129-1132, 2009.
- PEREIRA, F.M. **A cultura da goiabeira**. Jaboticabal: Funep, 1995, 47p.
- PORTO, S. I.; SILVA, A. C. P.; BESTÉTTI, C. R. **Acompanhamento da safra brasileira de café**. CONAB. dez. 2010. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&ordem=produto&Pagina_objcmscontudos=1#A_objcmscontudos>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- PRINTZ, H. Vorarbeiten zu einer Monographie der Trentepohliaceen. **Nytt Magasin f. Naturv.**, v. 80, p. 137–210, 1939.
- RAVEN, J.A. Biochemistry, biophysics and physiology of chlorophyll b-containing algae: implications for taxonomy and phylogeny. **Progress in Phycological Research**, v.5, p.1-122, 1987.
- RINDI, F.; LAM, D. W.; LÓPEZ-BAUTISTA, J. M. Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) from Panama. **Nova Hedwigia**, v. 87, n. 3, p. 421-444, 2008.
- RIVERO, T.; CASTELLANOS, L. Estudio de la nocividad del alga *Cephaleuros virescens* Kunze. **Fitosanidad**, v. 8, n. 2, p. 41-43, 2004.

ROBERT, C. et al. Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. **New Phytologist**, v. 165, p. 227-241, 2005.

RODRÍGUEZ-MORENO, L. et al. Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. **Photosynth Res**, v. 96, p. 27-35, 2008.

ROZANE, D. E.; OLIVEIRA, D. A.; LIRIO, V. S. Importância Econômica da cultura da goiabeira. In: ROZANE, D. E.; COUTO, F. A. D. (ed.). **Cultura da Goiabeira: Tecnologia e mercado**. Viçosa: UFV, 2003. p. 1-20.

SCOT, C. N. *Cephaleuros* Species, the Plant-Parasitic Green Algae. **Plant Disease**, Hawaii, v. 43, p. 1-6, 2008.

SECRETARIA DE ESTADO DE DESENVOLVIMENTO. **Setores produtivos: Café**. Disponível em: <<http://www.sedes.es.gov.br/default.asp?arq=cafe>>. Acesso em 10 nov. 2010.

SERRANO, L. A. L. et al. Goiabeira 'Paluma' sob diferentes sistemas de cultivo, épocas e intensidades de poda de frutificação. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.6, p.785-792, 2007.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.18, n.1, p.119-147, 2006.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 35, p. 235-270, 1997.

STRASSER, R.J. et al. Biophysical phenomics reveals functional building blocks of plants systems biology: a case study for the evaluation of the impact of Mycorrhization with *Piriformosporandica*. In: VARMA, A.; OELMÜLER, R. (eds.). **Advanced Techniques in Soil Microbiology**. Soil Biology, 2007. p. 319-341.

STRASSER, R.J. et al. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p.1313-1326, 2010.

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: MATHIS, P. (ed.). **Photosynthesis: From Light to Biosphere**. Proceeding of the Xth International Photosynthesis Congress. Montpellier, France. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 977-980.

STRASSER; R. J.; TSIMILLI- MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the Fluorescence Transient. In: PAPAGEORGIOU, G.; GOVINDJEE (eds.). **Chlorophyll fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration Series**. 2004. p. 321-362.

STRASSER R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M., SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C.; Govindjee (eds.). **Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis**. London: Kluwer Academic Publishers, 2005. p. 1–50.

SUTO, Y.; OHTANI, S. Morphology and taxonomy of five *Cephaleuros* species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, including three new species. **Phycologia**, v. 48, n. 4, p. 213-236, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009, 819p.

THOMPSON, R.H.; WUJEK, D. *Printzina* gen. nov. (Trentepohliaceae), including a description of a new species. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 232–237, 1992.

THOMPSON, R.H.; WUJEK, D. **Trentepohliales: *Cephaleuros*, *Phycopeltis*, and *Stomatochroom*. Morphology, Taxonomy and Ecology**. United States of America: Science Publishers, 1997. 149 p.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. In Vivo Assessment of Stress Impact on Plants' Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. In: VARMA, A. (ed). **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**. Springer, 2008. p. 679-703.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Manejo integrado das doenças da goiabeira. In: COSTA, A. F. S.; COSTA, A. N. (eds). **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 231-282.

WEHLBURG, C. et al. **Index of plant diseases in Florida**. 11 ed. Flórida: Fla. Dept. Agr. & Consumer Services. Div. Plant hid. Bui., 1975, 285 p.

YUSUF, M. A. et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p.1428-1438, 2010.

ZUBEK, S. et al. Response of endangered plant species to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Mycorrhiza**, v.19, p.113-123, 2009.

GLOSSÁRIO

Célula-cabeça - Célula inicial, terminal ou lateral, em um esporangióforo que produz e contém o *esporangiato lateral*.

Célula *suffultory* - Célula dobrada retornável que sustenta o esporângio.

Esporangiato lateral - Pequeno inchaço terminal ou lateral que na maturidade consiste na célula *suffultory* e o esporângio.

Esporângio - Célula onde os esporos são produzidos. Existem dois tipos característicos no *Cephaleuros*. Os zoosporângios descritos como simples esporângio, onde estão os zoósporos, ele está contido no esporangióforo. O segundo tipo, meiosporângios são produzidos na planta esporófito. Os dois tipos de esporângios são produzidos na maturidade.

Esporangióforo - Filamento ereto que contém as células-cabeça, das quais são produzidos os *esporangiatos laterais*.

Gametângio - Célula em que os gametas são produzidos. Ela é globular a irregular, ou de tamanho variável e se desenvolve de células laterais e terminais ou sésseis dos filamentos principais do sistema prostrado do talo.

Inconspícuo - Que não é facilmente perceptível.

Lobado - Arredondado e saliente.

Orbicular - Que tem formato circular, esférico ou globular.

Papila - Pequena saliência cônica.

Reniforme - Que tem forma de rim.

Rizóide - É irregular, com crescimento celular reduzido da superfície inferior do talo que ocorre horizontalmente. Pode penetrar no espaço intercelular do hospedeiro.

Seta - Existem dois tipos: Um filamento estéril ereto de três a trinta e três células que na maturidade vai afinando para o ápice. Não pode ser confundida com um esporangióforo imaturo que a célula terminal é inflada. Outro tipo de seta contém uma ou duas células. É afilada para o ápice e pode ter bulbos na ou logo acima da base.

Talo - É composto de um sistema prostrado e um sistema ereto. O sistema ereto é reduzido a setas e esporangióforos. O sistema prostrado, muito desenvolvido, pode ser conspícuo (visível) ou inconspícuo, de acordo com hábito de crescimento das espécies.

Talo ramificado - Usado na descrição dos talos pseudoparenquimatosos prostrados, para designar o discreto sistema de ramificações, que compõem os segmentos do talo.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*, deduzidos a partir do teste JIP, em folhas de *Coffea canephora*, sem lesão e com lesão, da coleta de dezembro de 2010 (n=12)¹.

Hospedeiro	PI _{TOTAL}	PI _{ABS}	$\delta R_0/(1-\delta R_0)$	δR_0	ϕR_0	RE ₀ /RC
<i>C.canephora</i> (sem lesão)	3,19 a	37,91 a	0,86 a	0,44 a	0,21 a	0,37 a
<i>C.canephora</i> (com lesão)	2,31 a	39,84 a	0,59 b	0,36 b	0,17 b	0,30 b
CV	47	41	33	20	22	22

¹Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste Tukey (P<0,05). CV = coeficiente de variação.

APÊNDICE B - Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*, deduzidos a partir do teste JIP, em folhas de *Psidium guajava*, sem lesão e com lesão, da coleta de dezembro de 2010 (n=12)¹.

Hospedeiro	PI _{TOTAL}	PI _{ABS}	$\delta R_0/(1-\delta R_0)$	δR_0	ϕR_0	RE ₀ /RC
<i>P. guajava</i> (sem lesão)	4,35 a	6,63a	1,05a	0,50a	0,25a	0,46a
<i>P. guajava</i> (com lesão)	3,30a	5,68a	0,99a	0,49a	0,23a	0,47a
CV	47	32	27	13	10	13

¹Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste Tukey (P<0,05). CV = coeficiente de variação.

ANEXOS

ANEXO A - Chave para gêneros da família Trentepohliaceae.

Fonte: Thompson e Wujek (1997).

1. Alga superficial nas folhas, galhos, frutos, troncos, concreto, rochas e madeiras.....2.
1. Alga vivendo abaixo da cutícula ou dentro dos tecidos das folhas, galhos, ou frutos de plantas terrestres.....4.
 2. Poro papilar terminal no esporângio, oposto ao final do anexo. *Esporangiato lateral* solitário, séssil no final dos filamentos eretos. Gametângio intercalar ou terminal. Epifítica.....*Phycopeltis*.
 2. Poro papilar basal no esporângio, adjacente a área de anexo.....3.
3. Esporângio globular para reniforme. *Esporangiato lateral* solitário, séssil no final do filamento prostrado ou dos filamentos eretos. Sistema prostrado bem desenvolvido. Sistema ereto pouco desenvolvido. Gametângio terminal ou lateral. Algas de sombra e elevada umidade, inconspícuas, geralmente com coloração verde e epifíticas nas folhas.....*Printzina*.
3. Esporângios ovóides. *Esporangiatos laterais* solitários ou agrupados, suportados em célula-cabeça de esporangióforo ramificado. Sistema prostrado pouco desenvolvido ou ausente. Sistema ereto abundante. Gametângio terminal. Algas de habitat exposto, em massas conspícuas, com coloração amarelada a laranja.....*Trentepohlia*.
 4. Apenas um esporangióforo, clavado, célula-cabeça emitida de um estômato do hospedeiro. Suporta um ou mais *esporangiatos laterais*.....*Stomatochroon*.
 4. Esporangióforos em filamentos eretos de (2) 3-7 (11) células. *Esporangiatos laterais* crescendo na célula-cabeça sozinha, terminal e conspícua, ou produz várias células-cabeça ao longo do esporangióforo (no final ou nas laterais).....*Cephaleuros*.

ANEXO B - *Cephaleuros* Kunze, 1827. Espécie tipo: *Cephaleuros virescens* Kunze, 1827.
Fonte: Thompson e Wujek (1997).

Alga heterotríquea. Porção prostrada de filamento aberto até pseudoparenquimatosa, com ramificação dicotômica a pinada, crescimento subcuticular, pelo menos inicialmente, nos ramos e frutos de plantas vasculares. A porção ereta consiste de esporangióforos simples a multicelulares os quais se projetam externamente ao hospedeiro. Os esporangióforos contêm de uma a muitas células-cabeça de onde são produzidos os *esporangiatos laterais*, que são formados por células *suffultory* contendo os esporângios. Reprodução assexuada é por zoósporos quadriflagelados. Reprodução sexuada ocorre entre isogametas biflagelados produzidos nos gametângios, que brotam lateralmente, terminalmente ou ainda intercalados, em uma espécie, nos filamentos principais do sistema prostrado do talo. O zigoto desenvolve-se imediatamente consistindo de uma célula haste e célula-cabeça contendo uma ou mais células *suffultory*, cada uma, terminada por um meiosporângio. Meiósporos são quadriflagelados.