

PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ, AGENTE ETIOLÓGICO DA MANCHA-MANTEIGOSA, EM HIPOCÓTILOS DE CULTIVARES DE CAFEEIROS

HEBE PEREZ DE CARVALHO¹, MATHEUS BORNELLI DE CASTRO²; ANA PAULA BASTOS ÓRFÃO³; PAULO ESTEVÃO DE SOUZA⁴

RESUMO

Os fungos do gênero *Colletotrichum* associados ao cafeeiro apresentam grande variabilidade morfológica e patogênica, encontrando-se amplamente distribuídos em todas as lavouras cafeeiras em todo o mundo. Dentre as espécies de *Colletotrichum* que ocorrem no cafeeiro, *C. gloeosporioides* é relatado como agente etiológico da mancha-manteigosa. Alguns autores sugerem, ainda, que existem raças patogênicas para os isolados que ocasionam mancha-manteigosa. Objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar a patogenicidade de 5 isolados monospóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*, denominados I₁, I₂, I₃, I₄ e I₅, obtidos de plantas com sintomas de mancha-manteigosa, nas cultivares de cafeeiro, Catuaí Vermelho IAC 99 e Mundo Novo IAC 379-19. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x5), com 3 repetições. Foram utilizadas 5 plântulas por repetição. As inoculações foram realizadas em plântulas de cafeeiro no estágio de palito de fósforo, utilizando-se suspensão na concentração de 2 x 10⁶ conídios por mL, para cada isolado. As plântulas foram inoculadas pela deposição de 10 µL da suspensão sobre os hipocótilos, após fermento com alfinete entomológico. Depois de inoculadas, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento, a 25±2°C. Avaliaram-se a incidência e a severidade dos sintomas nas plântulas 15 dias após inoculação. Houve diferença significativa quanto à patogenicidade entre os isolados. A severidade (ID) dos isolados I₂, I₃ e I₄ foi maior que a dos isolados I₁ e I₅. A incidência foi maior para os isolados I₂ e I₃. Tanto a incidência como a severidade foram maiores em hipocótilos da cultivar Catuaí Vermelho IAC 99.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, inoculação, severidade, variabilidade patogênica.

INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Colletotrichum* associados ao cafeeiro apresentam grande variabilidade morfológica e patogênica, encontrando-se amplamente distribuídos em todas as lavouras cafeeiras em todo o mundo (PARADELLA FILHO & PARADELLA, 2001). Esse patógeno causa enfermidades, como antracnose em folhas e frutos, seca de ponteiros, mancha-manteigosa e antracnose dos frutos verdes do cafeeiro. Períodos contínuos de alta umidade e temperaturas amenas, em torno de 22°C, favorecem o seu desenvolvimento.

No Brasil, vários isolados de *Colletotrichum* já foram identificados no cafeeiro, atuando como saprófitas ou como patógenos (PARESQUI et al., 2003). Esses isolados foram relatados, em sua grande maioria, como *Colletotrichum gloeosporioides*.

Desde 1993, diversos trabalhos têm sido realizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, sobre a caracterização morfológica, genética, bioquímica e a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro (DIAS, 2002; DORIZZOTO, 1993; DORIZZOTO & ABREU, 1993a, 1993b; FERREIRA, 2006; FERREIRA et al.,

¹ Doutora em Fitopatologia, Bolsista CNPq, UFLA, hebecarvalho@yahoo.com.br

² Mestrando em Fitotecnia/Sementes, UFLA, matheuscastro@ig.com.br

³ Engenheira Agrônoma, CESEP, aninhadaagronomia@hotmail.com

⁴ Professor Titular DFP, UFLA, pauleste@ufla.br

2004; LINS, 2006; NECHET & ABREU, 2002; OROZCO, 2003; PEREIRA, 2005). Os estudos têm demonstrado que existe grande variabilidade morfológica entre os isolados e que a interação entre *Colletotrichum* spp. e plântulas de café é muito variável, dependendo da cultivar de cafeeiro utilizada, da variabilidade genética dos isolados e do tempo, após inoculação, para expressar sintomas.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a patogenicidade de diferentes isolados monospóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de plantas com sintomas de mancha-manteigosa, nas cultivares de cafeeiro Catuaí Vermelho IAC 99 e Mundo Novo IAC 379-19.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras/MG e no Laboratório de Fitopatologia do Centro Superior de Ensino e Pesquisa de Machado, em Machado/ MG. Foram utilizados hipocótilos das cultivares Catuaí Vermelho IAC 99 e Mundo Novo IAC 379-19, fornecidos pela Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) de Machado, os quais foram inoculados com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de plantas com sintomas de mancha-manteigosa.

Obtenção dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

Foram utilizados cinco isolados obtidos de hastes de cafeeiro e seca de ponteiros de plantas da cultivar Catuaí Vermelho com sintomas de mancha-manteigosa do campo experimental da UFLA. Os isolados foram denominados de I₁ e I₂, provenientes de seca de ponteiros em plantas com sintomas de mancha-manteigosa e I₃, I₄ e I₅, provenientes de seca de haste de plantas com sintomas de mancha-manteigosa. Para a obtenção dos isolados, pequenos fragmentos do tecido infectado foram desinfestados com álcool 50%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, lavados por duas vezes em água destilada esterilizada e colocados para secar em papel de filtro esterilizado. Após a secagem, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura extrato de malte ágar (MEA) a 2%. As placas de Petri foram mantidas em câmara de incubação BOD, por sete dias, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após este período, as colônias caracterizadas como sendo de *Colletotrichum gloeosporioides* (SUTTON, 1980) foram transferidas para placas contendo MEA a 2%, incubadas por 5 dias em BOD, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. As colônias obtidas de cada isolado foram utilizadas para a obtenção de culturas monospóricas.

Obtenção das culturas monospóricas

Para a obtenção das culturas monospóricas, foram preparadas suspensões, de cada isolado separadamente, contendo 2×10^6 conídios por mL⁻¹. Essas suspensões foram diluídas por 4 vezes, colocando-se 1 mL da suspensão em tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL das diluições foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-água a 2% e espalhadas com alça de Drigalsky. As placas, assim preparadas foram incubadas por 6 horas, em BOD, a 25°C. Após a emissão do tubo germinativo, em câmara de fluxo laminar, com auxílio de um microscópio óptico, os esporos germinados foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo MEA a 2%. As placas foram incubadas em BOD, por 7 dias, para a obtenção das culturas puras. As culturas puras de *C. gloeosporioides* foram transferidas para tubos de ensaio contendo MEA a 2%, inclinados, para preservação.

Preparo e inoculação dos hipocótilos

Hipocótilos das cultivares de cafeeiro Catuaí Vermelho IAC 99 e Mundo Novo IAC 379/19 foram lavados e submetidos a processo de desinfestação em câmara asséptica com álcool 50%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos e lavados, por duas vezes, em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, os hipocótilos foram transferidos para placas de Petri contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. Os hipocótilos foram inoculados com suspensão de conídios, numa concentração de 2×10^6 conídios por mL⁻¹ para cada isolado. Em cada um dos hipocótilos colocaram-se 10 µL da suspensão de conídios. As testemunhas foram inoculadas com água destilada esterilizada. Antes da inoculação, foram realizados fermentos nos hipocótilos, com auxílio de agulha entomológica. Após a inoculação as placas de Petri

contendo os hipocótilos inoculados foram colocadas em câmara de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas durante o período de avaliação.

Avaliação dos hipocótilos

Após quinze dias da data da inoculação, as plântulas foram individualmente avaliadas pela observação dos sintomas nos hipocótilos, segundo escala de notas adaptada por Várzea (1995), citado por Orozco, 2003.

Determinaram-se o índice de doença (ID) conforme fórmula proposta por McKinney (1923) e a incidência da doença (I), considerando-se o percentual de plantas que apresentavam algum tipo de sintoma em relação às plantas sadias.

Em adição a essas avaliações, as partes das plantas que apresentaram sintomas foram desinfestadas com álcool 70%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1%, por um minuto, lavadas em água destilada esterilizada por duas vezes e plaqueadas em MEA 2%, para verificação do crescimento fúngico.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições em esquema fatorial 6×2 , sendo 5 isolados mais a testemunha, com duas cultivares de cafeeiro, Catuaí Vermelho IAC 99 e Mundo Novo IAC 379-19. Foram inoculados 15 hipocótilos por tratamento, ou seja, 5 por repetição.

A análise estatística do experimento foi realizada pelo programa SISVAR, versão 4.8, do qual foi obtida análise de variância (FERREIRA, 2008). Para comparação de médias, quando necessário, utilizou-se o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se efeito significativo dos isolados e das cultivares, tanto para o índice de doença (severidade) como para incidência. A interação entre os fatores não foi significativa para nenhuma das variáveis estudadas.

Verifica-se, pelos dados da Tabela 1, que o índice de doença (ID) e a incidência foram maiores na cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 em relação à cultivar Mundo Novo IAC 379-19, demonstrando que ambas são suscetíveis aos isolados testados, embora a cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 tenha mostrado maior suscetibilidade.

Tabela 1. Índice de doença (ID) e incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiro das cultivares Catuaí Vermelho IAC 99 e Mundo Novo IAC 379-19.

Cultivares	ID (%)	Incidência (%)
Catuaí Vermelho IAC 99	13,06a	40,00a
Mundo Novo 379-19	8,33b	22,22b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{y + 1,0}$.

Aos 15 dias após inoculação, observou-se morte de hipocótilos das cultivares Mundo Novo IAC 379-19 e Catuaí Vermelho IAC 99 inoculadas com os isolados I₄ e I₃, respectivamente (Figura 1).

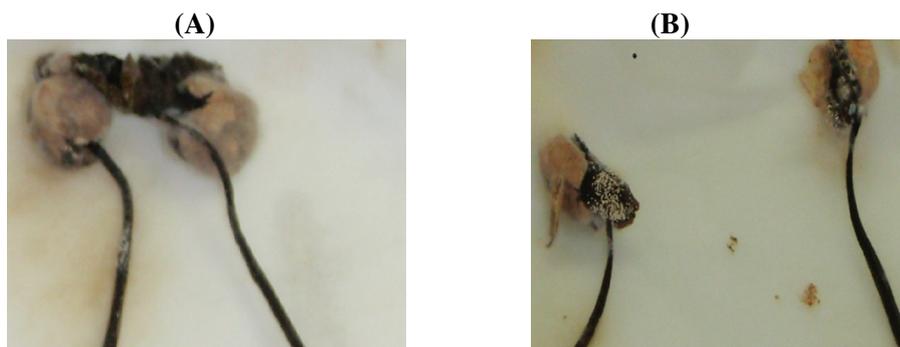


Figura 1. Morte de hypocótilos de cafeeiro inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides*: (A) hypocótilos de Mundo Novo IAC 379-19 - I₄; (B) hypocótilos de Catuaí Vermelho IAC 99 - I₃.

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram encontrados por Juliatti et al. (2006), os quais, avaliando a agressividade de diferentes isolados de *Colletotrichum* sp., verificaram que as variedades Catuaí Vermelho 99 e Mundo Novo 379-19 foram suscetíveis aos vários isolados testados, tendo o índice de doença na variedade Catuaí Vermelho MG 99 sido maior do que na variedade Mundo Novo MG 379/19.

A interação entre *Colletotrichum* spp. e plântulas de café é muito variável, dependendo da suscetibilidade do material genético, da variabilidade genética dos isolados e do tempo após inoculação para expressar sintomas. Na maioria dos relatos, tem se verificado que a expressão dos sintomas pode ocorrer de 15 a 30 dias após a inoculação (DIAS, 2002; DORIZOTTO, 1993; JULIATTI et al., 2006; NECHET & ABREU, 2002; OROZCO, 2003).

Todos os isolados testados foram patogênicos a hypocótilos de cafeeiro, independente da cultivar inoculada, diferindo significativamente da testemunha (Tabela 2). Nos isolados I₂, I₃ e I₄, o índice médio de doença foi maior que nos isolados I₁ e I₅. A incidência foi maior nos isolados I₂ e I₃, seguidos dos isolados I₁, I₄ e I₅, que não diferiram significativamente entre si.

Tabela 2. Índice de doença (ID) e incidência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em hypocótilos de cafeeiro das cultivares Catuaí Vermelho IAC 99 e Mundo Novo IAC 379-19.

Isolados	ID (%)	Incidência (%)
Testemunha	0,00a	0,00a
I ₁	5,83b	23,33b
I ₂	12,50c	43,33c
I ₃	24,17c	60,00c
I ₄	15,00c	36,67b
I ₅	6,67b	23,33b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{y + 1,0}$.

Os isolados I₁, I₂ e I₅ não ocasionaram morte de hypocótilos até 15 dias após a inoculação. Os sintomas que ocorreram com maior frequência foram lesões superficiais acastanhadas e lesões acastanhadas coalescentes (Figura 2). Foi possível reisolar *C. gloeosporioides* das plântulas inoculadas que apresentaram sintomas.

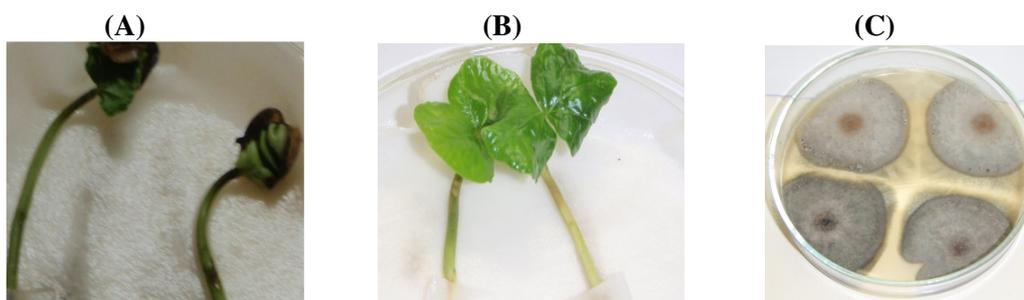


Figura 2. Sintomas de *Colletotrichum gloeosporioides* em plântulas das cultivares Mundo Novo IAC 379-19 (A) e Catuaí Vermelho IAC 99 (B). Reisolamento em extrato de malte ágar 2% (C).

CONCLUSÃO

Todos os isolados testados são patogênicos a hipocótilos de cafeeiro com diferenças quanto à sua agressividade.

A cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 apresenta maior suscetibilidade que a cultivar Mundo Novo IAC 379-19, independente do isolado utilizado.

REFERÊNCIAS

- DIAS, M. D. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L.** 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- DORIZZOTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais.** 1993. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.
- DORIZZOTO, A.; ABREU, M. S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum coffeanum* Noack e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 1993, Aracaju. **Anais...** Brasília: SBF, 1993a. p. 306.
- _____. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* Noack e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 1993, Aracaju. **Anais...** Brasília: SBF, 1993b. p. 285.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.
- FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Necaf, 2004. 1 CD-ROM.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

JULIATTI, F. C. et al. Agressividade e divergência genética por RAPD de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em lavouras cafeeiras de Minas Gerais. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 159-169, 2006.

LINS, S. R. de O. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolado de *Colletotrichum* spp em plantas obtidas por cultura de embrião.** 2006. 117 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MCKINNEY, R. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Cambridge, v. 26, p. 195-218, 1923.

NECHET, K. de L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

OROZCO, M. E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*.** 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PARADELA FILHO, O.; PARADELA, A. L. O complexo *Colletotrichum* cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade.** Viçosa, MG: UFV, 2001. cap. 8, p. 269-275.

PARESQUI, L. et al. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Coffea arabica* L. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: UFBA, 2003. p. 208.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos.** 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SUTTON, B. C. **Coelomycetes.** Surrey: CMI Kew, 1980. 696 p.

VÁRZEA, V. M. P.; SILVA, M. do C. M. L.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J. Resistência do cafeeiro a antracnose dos frutos verdes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café.** Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 327-368.