



**FERNANDA GONÇALVES MARTINS MAIA**

*Colletotrichum gloeosporioides:*  
**TRANSMISSIBILIDADE EM SEMENTES E  
MECANISMOS DE DEFESA EM MUDAS  
MICROPROPAGADAS DE CAFEEIRO (*Coffea  
arabica* L.)**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**FERNANDA GONÇALVES MARTINS MAIA**

***Colletotrichum gloeosporioides*: TRANSMISSIBILIDADE EM SEMENTES  
E MECANISMOS DE DEFESA EM MUDAS MICROPROPAGADAS DE  
CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

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

Orientador

Dr. Mario Sobral de Abreu

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Maia, Fernanda Gonçalves Martins.

*Colletotrichum gloeosporioides* : transmissibilidade em sementes e mecanismos de defesa de mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Fernanda Gonçalves Martins Maia. – Lavras : UFLA, 2011.

111 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Mário Sobral de Abreu.

Bibliografia.

1. Mancha manteigosa. 2. Sanidade de sementes. 3. Marcadores fluorescentes. 4. Microscopia de epifluorescência. 5. GFP. 6. PR proteínas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.73944

**FERNANDA GONÇALVES MARTINS MAIA**

***Colletotrichum gloeosporioides*: TRANSMISSIBILIDADE EM SEMENTES  
E MECANISMOS DE DEFESA EM MUDAS MICROPROPAGADAS DE  
CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

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

APROVADA em 04 de novembro de 2011.

Dr. Edson Ampelio Pozza	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG

Dr. Mario Sobral de Abreu  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2011**

**A DEUS** que me deu a vida e sempre esteve comigo, me guiando, iluminando e me dando forças para seguir. Pela presença e proteção em todos os momentos.

Aos meus pais, **MARIA e JOSÉ** (in memoriam), pelo início de tudo.

A meu irmão **ROSIVALDO**, pela continuidade dos laços

**DEDICO**

Ao meu esposo **JADER**, pela paciência e pelo amor incondicional.

As minhas irmãs **ROSE, LUCIANA e MEIRE**, pelo amor e compreensão.

A todos os meus sobrinhos **MANÚ, DIEGO, BÁRBARA, KAIQUE, CADU,**

**RYAN, MARIA EDUARDA, VICTÓRIA e VITOR**, pelo amor e carinho.

Aos meus cunhados **JÔ, OZANA, CLAUDIA E GECYARA** pela amizade.

Aos meus sogros **TEREZA e NILSON** por todo carinho e incentivo.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o qual foi minha fonte de forças para superar todos os desafios e dificuldades enfrentadas durante a realização desse trabalho.

Ao professor Mario Sobral de Abreu (um verdadeiro “pai”), a quem faço um agradecimento especial, pela orientação, dedicação amizade e paciência demonstrada em todos os momentos. Sua confiança foi essencial para a realização do meu trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Ao meu esposo Jader Braga Maia pela paciência, pelo amor, pelo carinho e pela força na realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas, pela ajuda incondicional na realização desse trabalho

A todos os meus familiares, tios, tias, primos, avós em especial ao meu avô Gregório (in memorian) por todo o carinho que sempre tiveram comigo.

Aos amigos Cleilton, Luciane, Jucilayne, Rosana, Lahyre, Elma, Nuza, Cleuza, Duda e Mário, que mesmo de longe estão no meu coração e sempre me dando muita força para agüentar os trancos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

Enfim,

A todos que direta ou indiretamente contribuíram e foram muito importantes para realização não só desse trabalho, mas como na realização desse sonho meus singelos agradecimentos.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu esposo Jader pela companhia, amizade, cumplicidade, atenção e dedicação com meus gráficos.

Aos meus companheiros de laboratório Cecília e o Bruno, por toda ajuda.

Ao Pedro, pela ajuda incondicional, paciência, carinho e amizade.

Ao Pablo pela paciência e dedicação com meus gráficos.

Muito obrigada!

*“Ao se caminhar para um objetivo, sobretudo um grande e distante objetivo, as menores coisas se tornam fundamentais. Uma hora perdida é uma hora perdida, e quando não se tem um rumo definido é muito fácil perder horas, dias ou anos, sem se dar conta disso”.*

*(Amyr Klink)*

## RESUMO

No complexo *Colletotrichum* x cafeeiro, poucos são os estudos no que se referem transmissibilidade do patógeno em plantas infectadas e aos mecanismos de defesa o que dificulta a elucidação de aspectos importantes da doença na cultura. Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de acompanhar via microscopia de epifluorescência, a de transmissibilidade do patógeno semente-plântulas, os efeitos da presença do patógeno na semente sobre parâmetros de qualidade destas e os mecanismos de defesa que cafeeiros utilizam em reação a presença do patógeno e dessa maneira esclarecer pontos importantes do patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro. O efeito de *C. gloeosporioides* na germinação, na viabilidade da semente e no estabelecimento de plântulas foi realizado com um isolado não transformado (I2) e um transformado pela técnica da GFP (I2-T) inoculados em sementes da cultivar Catuaí Vermelho (sementes de plantas com (PCS) e sem (PSS) sintomas de mancha-manteigosa) submetidas por diferentes potenciais de inóculo ( P0 – P5), pelo contato direto com a colônia em placas de Petri. Foram consideradas as variáveis, sanidade, germinação, índice de velocidade de emergência, tetrazólio e transmissibilidade. Verificou-se que, com o aumento do potencial de inóculo, houve aumento da incidência nas sementes para os dois materiais estudados. A porcentagem máxima de infecção nas sementes foi de 6% para PSS (I2) e 26,66% para PCS (I2-T). Em relação à variável germinação, só foi possível observar interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre material genético x potencial de inóculo. Pelo teste do IVE ficou evidenciado que houve decréscimo de vigor, à medida que se aumentou o potencial de inóculo em ambos os materiais estudados. Em relação ao estande inicial e final, foi possível observar diminuição de valores dessas variáveis, tanto em MOPSS como em MOPCS para todos os tratamentos. O teste de tetrazólio mostrou que os prejuízos fisiológicos relacionados à elevação do potencial de inóculo apresentaram a mesma tendência que no teste de germinação, sendo possível observar em PSS, que a viabilidade das sementes foi superior a PCS. Através do teste de isolamento em placas com MEA ficou evidenciado que *C. gloeosporioides* é capaz de ser transmitido de semente – plântula, confirmando desta forma a capacidade infectiva do isolado transformado. Para identificar reações de defesa de cafeeiro em resposta à invasão por *C. gloeosporioides* o experimento foi conduzido em esquema fatorial 3 x 4 x 2 {(2 isolados de *C. gloeosporioides* –I2 e I2-T + 1 testemunha), 4 períodos de exposição das mudas aos isolados (6, 12, 24 e 48 horas) – coletas e 2 tipos de mudas: MOPCS e MOPSC } em DBC com 4 repetições. Para as análises enzimáticas foram plotadas curvas de progresso da atividade das enzimas por tempo de coleta e para os teores de fenóis solúveis totais o teste de Scott-Knott. Ficou evidenciado que *C. gloeosporioides*

transformado geneticamente não perde sua capacidade de se manifestar no hospedeiro e ser percebido pelo mesmo, ativando desta forma os mecanismos de defesa da planta observados pelos picos de atividades da peroxidase e polifenoloxidase e do aumento dos teores de fenóis solúveis totais no caso de MOPSC.

Palavras-chave: Mancha manteigosa. GFP. PR proteínas. Sanidade de sementes.

## ABSTRACT

In the *Colletotrichum* x coffee complex, there are few studies which refer to the pathogen transmissibility in infected plants and defense mechanisms which became hard the elucidation of important aspects of this complex in the coffee plants. In this context, this work was carried out with objective of accompanying, through epifluorescence microscopy, the transmissibility of the pathogen seed-seedlings, the effects of the pathogen on quality seeds parameters and to study the defense mechanisms that coffee plants use in reaction to the presence of the pathogen and this way to explain important points in the *Colletotrichum* x coffee plant pathosystem. The effect of *C. gloeosporioides* on seed germination, the seed viability and seedling establishment were conducted with the isolates I2 and I2- inoculated in seeds of Catuaí Vermelho (seeds with (PCS) and without (PSS), butterfly spot symptoms), and the seeds submitted to the inoculation at 48, 96, 120 and 144 hours of exposure to the fungus by direct contact with the colony in a Petri dish. After this procedure all variables were evaluated: sanity test, germination test, emergence speed index, tetrazolium test and transmissibility. It was found that with increasing time of exposure to the fungus, there was an increased incidence of the fungus in the seeds for both materials studied. The maximum percentage of infected seeds was 6% for PSS at 144 hours after inoculation with isolate I2 and 26.66% for PCS also at 144 hours after inoculation with isolate I2-T. The independent variables, the evaluation period and exposure time showed a significant interaction for seed germination of both materials (seedlings from plants with (MOPCS) and without (MOPSS) butterfly spot symptoms). The highest percentages of MOPSS was verified within 96 hours of exposure of seeds to pathogens, causing a decrease in these values as they increased the exposure period of both I2- T and I2 seeds. The emergence speed index test gave evidence that there was a decrease in plant vigor, as the exposure time of the seed to the pathogen increased in both materials studied. In MOPSS the highest rates were observed until 120 hours of exposure in both I2 and I2-T isolates, with a slight drop from this time onward. In the case of MOPCS increases were observed in emergence speed index only up to 96 hours of exposure as well as in both isolates I2 I2-T and it decreased after this. Regarding the initial and final plant stands, we observed decreased values of these variables in MOPSS and MOPCS for all treatments. The tetrazolium test showed that the physiological damage associated to an increased period of exposure of seeds to *C. gloeosporioides* showed the same trend as in the germination test. It was, possible to see that in PSS, the viability of seeds was higher than in PCS after the exposure time to the pathogen. The isolation test on plates with MEA culture medium evidenced that *C. gloeosporioides* can be transmitted from seed to seedling, thus confirming the infective capacity of the

transformed and non-transformed unprocessed isolates. To identify the coffee defense reactions in response to invasion by *C. gloeosporioides* the experiment was conducted in a 3 x 4 x 2 factorial {(2 *C. gloeosporioides* isolates - I2 and I2-T + 1 control), 4 seedling exposure periods to *C. gloeosporioides* isolates (6, 12, 24 and 48 hours) - collections and two types of seedlings: MOPCS in DBC and MOPSC} with 4 repetitions. For the enzymatic analysis, enzyme activity progress curves were plotted by collection time and for the the total soluble phenol levels the Scott-Knott test was used. It was demonstrated that genetically transformed *C. gloeosporioides* does not lose its ability to be expressed in the host crop and be perceived by it, thus activating the plant defense mechanisms observed through the peroxidase and polyphenoloxidase activity peaks and increased total soluble phenols levels in the case of plant seedlings without butterfly spot symptoms.

Key words: Butter spot. GFP. PR proteins. Seed sanity.

## SUMÁRIO

	<b>CAPITULO 1</b> Introdução geral.....	15
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1</b>	<i>Colletotrichum</i> spp. em cafeeiros.....	19
<b>2.2</b>	Mancha manteigosa e sua importância.....	21
<b>2.3</b>	Sintomas e sinais da mancha manteigosa e transmissibilidade..	23
<b>2.4</b>	Mecanismos de resistência de plantas em resposta à invasão por patógenos.....	24
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
	<b>CAPÍTULO2</b> Transmissibilidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sem e com transformação por GFP e efeitos sobre a germinação, viabilidade e estabelecimento de plântulas	31
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>2.1</b>	Inoculação das sementes.....	35
<b>2.2</b>	Incidência de <i>C. gloeosporioides</i> em sementes.....	37
<b>2.3</b>	Teste de germinação.....	37
<b>2.4</b>	Índice de velocidade de emergência.....	37
<b>2.5</b>	Teste de tetrazólio.....	38
<b>2.6</b>	Transmissibilidade.....	39
<b>2.7</b>	Análise dos dados.....	41
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>3.1</b>	Incidência de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> nas sementes.....	42
<b>3.2</b>	Teste de germinação.....	46
<b>3.3</b>	Índice de velocidade de emergência.....	53
<b>3.4</b>	Teste de tetrazólio.....	60
<b>3.5</b>	Transmissibilidade.....	63
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	71
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
	<b>CAPITULO 3</b> Reação de defesa de cafeeiro em resposta à invasão por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> transformado e não transformado com GFP.....	79
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	81
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	83
<b>2.1</b>	Obtenção de plantas a partir de cultura de tecido de embriões zigóticos.....	83
<b>2.2</b>	Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , cultura fúngica e concentração para inoculações.....	84
<b>2.3</b>	Inoculações e coleta do tecido vegetal.....	84

<b>3</b>	<b>ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>86</b>
<b>3.1</b>	<b>Extração e determinação das atividades da peroxidase de guaiacol (POX), polifenoloxidase (PPO) e proteína total (PT)....</b>	<b>86</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparo de tecidos foliares para a determinação do conteúdo de fenóis solúveis totais.....</b>	<b>87</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise dos dados.....</b>	<b>87</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Atividades da peroxidase de guaiacol (POX) e polifenoloxidase (PPO).....</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Determinação do conteúdo de fenóis solúveis totais.....</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>101</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>104</b>

## CAPITULO 1

### ***Colletotrichum gloeosporioides*: Transmissibilidade em sementes e mecanismos de defesa em mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**

#### **1 INTRODUÇÃO**

O café é um dos produtos naturais de maior importância mundial, tanto no aspecto econômico quanto no social, o que faz com que a cultura tenha posição de destaque na história e no desenvolvimento do país. O Brasil é o maior produtor e exportador de café com uma área total cultivada de arábica e conilon estimada em 2,35 milhões de hectares, fazendo com que a cultura seja uma das principais fontes de rendas para o país. Segundo estimativa de produção feita pela Conab para a safra 2011, o país deverá colher entre 41,89 e 44,73 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado. Esse resultado representa redução entre 12,9% e 7,0%, quando comparada com a produção obtida na safra anterior. Essa redução deve-se ao ano de baixa bienalidade, condições climáticas desfavoráveis e também devido aos problemas enfrentados pela cultura, como é o caso do ataque de doenças (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

As doenças representam os fatores mais limitantes para a produção e produtividade do café, tanto para os pequenos agricultores de base familiar, como para os grandes produtores em escala empresarial, podendo causar perdas que chegam a inviabilizar a exploração da cultura. Sejam de origem biótica (fungos, bactérias, nematóides e vírus), sejam de abiótica (que não tem o envolvimento de patógenos e estão associados a problemas intrínsecos da planta ou a fatores ambientais do local de implantação da cultura, bem como ao manejo

inadequado das lavouras, principalmente na formação das mudas), causam problemas significativos na cultura e podem afetar todas as partes das plantas (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2007).

As doenças de etiologia fúngica como a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br), cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke), mancha de phoma (*Phoma spp*), antracnose e mancha manteigosa estas duas ultimas pertencentes ao complexo *Colletotrichum*, são focos de diversos estudos e estão entre os principais problemas enfrentados pela cafeicultura por serem importantes fontes de perda na produção (CHALFOUN, 1997).

No Brasil varias lavouras de café já vêm sendo acometidas por essas doenças ocasionadas pelo complexo *Colletotrichum spp.*, Dentre essas, um dos mais graves problemas enfrentados atualmente é a mancha manteigosa, porque os cafeeiros doentes têm sua produção totalmente afetada, o que pode ser observado pela morte de hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos (OROZCO-MIRANDA et al., 2002a).

Considerando que a mancha manteigosa é uma doença altamente destrutiva, que a patogenicidade de *C. gloeosporioides* em cafeeiro ainda é objeto de estudo, visto que, os sintomas associados ao fungo são constantemente atribuídos a causas fisiológicas, desnutrição do cafeeiro em ramos de alta carga e condições climáticas, podendo o fungo pode apresentar relação endofítica nos tecidos de *Coffea arábica* (PARESQUI et al., 2003) e sendo a semente a principal forma de disseminação da mancha manteigosa, é importante ter um método confiável de detecção do patógeno, na semente, para facilitar o seu diagnóstico, permitindo maior precisão na sua quantificação, assim como, estudos mais detalhados sobre a transmissibilidade e a influência do fungo na germinação, viabilidade e no estabelecimento de plântulas uma vez que, a obtenção de sementes de café de alta qualidade fisiológica e sanitária é de

fundamental importância, proporcionando bons resultados na produtividade, além de lavouras mais vigorosas (FERREIRA et al., 2004).

Com a falta de dados relacionando o patógeno com o principal sintoma da doença, somado aos poucos estudos voltados aos aspectos acima citados, uma das alternativas que tem propiciado uma melhor compreensão da interação de fungos fitopatogênicos com a sua hospedeira é a transformação desses patógenos com genes que possibilitem a sua rastreabilidade dentro dos tecidos e órgãos da planta (ZANETTE, 2007). Diversos genes marcadores têm sido empregados, dentre os quais os que codificam proteínas fluorescentes têm sido considerados ferramentas importantes, que revolucionaram a biologia celular principalmente no estudo de células vivas (FREITAG et al., 2004). O motivo pelo qual estes têm sido considerados excelentes marcadores moleculares, é que a visualização dos seus produtos não requer substratos ou co-fatores e podem ser empregadas em qualquer organismo que possa ser geneticamente modificado (CZYMMEK; BOURETT; HOWARD, 2005; ISHIKAWA, 2009).

O gene *gfp* tem sido amplamente utilizado no estudo da interação entre plantas hospedeiras e microorganismos fitopatogênicos visando estudar a sua penetração, colonização e disseminação, como: *Erwinia amylovora* em macieiras (BIGS; GEIDER, 1999); isolados de *Colletotrichum acutatum* patogênicos e não patogênicos (HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002), *Fusarium virguliforme* em soja (MASOURI; PUYESKY; SHARON, 2009), *Rosellinia necatrix* em abacate (PLIEGO et al., 2009), e ainda na quantificação de *Trichoderma harzianum* no solo (ORR; KNUDSEN, 2004).

A obtenção do *Colletotrichum gloeosporioides* transformado com o *gfp* pode ser um passo importante na elucidação de aspectos relevantes do patossistema mancha manteigosa, esclarecendo o real potencial de isolados do patógeno estarem relacionados com sintomas observados na planta e com sua transmissibilidade.

Diante do exposto, objetivou-se: 1) acompanhar via microscopia de epifluorescência, a transmissibilidade do patógeno semente-plântulas; 2) verificar os efeitos da presença do patógeno na semente sobre parâmetros de qualidade destas e 3) observar os mecanismos de defesa que cafeeiros utilizam em reação a presença do patógeno e dessa maneira esclarecer pontos importantes do patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro.

Para alcançar os objetivos almejados, o trabalho foi dividido em dois capítulos, o primeiro considerando os aspectos relacionados à sanidade e transmissibilidade de *C. gloeosporioides* em sementes e o segundo relacionado aos mecanismos de defesa da planta em resposta a invasão pelo patógeno.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Colletotrichum* spp. em cafeeiros

*Colletotrichum* é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos nas regiões tropicais e subtropicais. Espécies desse gênero causam doenças significativas, economicamente, em cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças e em culturas perenes.

No complexo *Colletotrichum* x cafeeiro há diversos patossistemas, como mancha-manteigosa, antracnose de folhas e frutos, seca ou morte de ponteiros (*die-back*), queima-castanha (*brown blight*) e a antracnose-dos-frutos-verdes ou *coffee berry disease*, CBD (OROZCO-MIRANDA, 2003).

Segundo Abreu, Ferreira e Martins (2008), o gênero *Colletotrichum* está amplamente distribuído em todas as regiões produtoras de café no mundo, tanto como saprófito ou como causador de doenças. Dentre as doenças mais importantes causadas pelo gênero, destacam-se a *Coffee Berry Disease* (CBD), cujo agente etiológico é *Colletotrichum kahawae*, restrita ao continente africano e a mancha-manteigosa, que tem como agente etiológico *Colletotrichum gloesporioides* Penz. No Brasil, o gênero *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro é composto de diversos patossistemas e também está associado a doenças, como antracnose (que atinge folhas, ramos e frutos) e seca dos ponteiros, sendo esta a mais antiga doença atribuída ao fungo. Mundialmente, são reconhecidas três espécies isoladas de frutos, folhas e ramos, associadas ao patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro: *C. kahawae*, *C. gloesporioides* Penz. e *C. acutatum* Simmonds (WALLER et al., 1993).

A antracnose nas folhas do cafeeiro apresenta-se como manchas irregulares, grandes, de coloração castanha a castanho-acinzentada, ocorrendo comumente nas margens das folhas (OROZCO-MIRANDA, 2003; PARADELA

FILHO et al., 2001). Segundo Paradela Filho et al. (2001), as lesões mais críticas e prejudiciais para o cafeeiro são aquelas em que o fungo incide sobre gemas, flores e chumbinho, provocando sua morte e queda, e enegrecimento e morte de ramos. Esses autores relataram, ainda, que os sintomas não estão relacionados com plantas injuriadas ou culturas mal manejadas; pelo contrário, eles são mais intensos e evidentes em culturas novas e muito bem desenvolvidas.

A mancha manteigosa cujos ataques mais intensos ocorrem nas folhas e ramos novos em plantas adultas, durante a fase de maior vegetação (MANSK; MATIELLO, 1977). Em cafeeiros com mancha-manteigosa, a produção pode ser grandemente afetada (FERREIRA et al., 2004).

Segundo Orozco-Miranda et al. (2002b), o complexo *Colletotrichum* x cafeeiro no Brasil é composto por populações de espécies de *Colletotrichum* associadas ao café, ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma invasiva, sem manifestação de sintomas. Orozco-Miranda et al. (2002a) afirmam, ainda, sobre a existência de raças patogênicas para os isolados da espécie *C. gloeosporioides* que ocasionam os sintomas de mancha-manteigosa, seca de ponteiros e necrose em frutos.

Pereira (2005), estudando a variabilidade do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro por meio da técnica que utiliza mutantes nit, caracterizou grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) para isolados de *C. gloeosporioides*. Este autor relata que a variabilidade encontrada entre os isolados deve-se ao alto número de grupos de VCG, concluindo sobre a complexidade dos estudos envolvendo espécies de *Colletotrichum*, já que a alta variabilidade pode interferir nos resultados.

## 2.2 Mancha manteigosa e sua importância

A mancha manteigosa, cujo agente etiológico é *C. gloeosporioides* foi relatada em *Coffea arabica*, por Wellman (1957), na Costa Rica, reportando-se de natureza virótica, mas sem conseguir demonstrar a sua transmissão. Vargas e González (1972) demonstraram ser ocasionada pelo gênero *Colletotrichum*. No Brasil, o primeiro relato data-se de 1958, feitos por Bitancourt (1958). Mas, somente a partir da década de 90 quando foi constatada, em lavoura cafeeira do município de Cristais, Minas Gerais, observando ataque de *Colletotrichum*, causando manchas foliares - sintomas da mancha manteigosa - e morte dos cafeeiros, Dorizzotto e Abreu (1993), é que se começou a dar maior ênfase aos estudos deste patossistema, pois a doença afeta diretamente a produtividade (FERREIRA et al., 2004).

Desde a sua aparição, na Costa Rica, como medida de controle, recomendava-se erradicar todas as plantas doentes; apesar disso, novos casos da doença surgiram (VARGAS; GONZÁLEZ, 1972). Atualmente, têm-se relatos da doença nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, na espécie *C. arabica* e nos estados de Espírito Santo, Rondônia e Amazonas, na espécie *C. canephora* (FERREIRA et al., 2004). Na espécie arábica, têm sido relatados e observados sintomas da doença nas cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo, Rubi, Mundo Novo e Catucaí Vermelho.

Orozco-Miranda (2003) observou que a coloração das colônias de isolados de mancha manteigosa do Brasil é similar à dos isolados da CBD (*C. kahawae*) na África. No entanto, por meio da caracterização molecular, comparando-se isolados de CBD e mancha manteigosa, pode-se concluir que aqueles isolados da mancha manteigosa se agruparam dentro do grupo *C. gloeosporioides*, corroborando com as afirmações de Chalfoun (1997), Varzea, Rodrigues Junior e Lewis (2002) e Waller et al. (1993), de que não se conhece

nenhum relato confirmado da ocorrência da CBD no continente americano. A partir de observações de coloração e patogenicidade de isolados provenientes de mancha manteigosa, Orozco-Miranda (2003) concluiu que pode, então, tratar-se de uma nova raça patogênica e ainda sugeriu a denominação de *C. gloeosporioides*, raça mancha manteigosa.

Atualmente, a mancha manteigosa é uma doença de destaque e observações em campo têm revelado o seu agravamento, principalmente quando o fungo ataca flores e frutos em expansão e as plantas doentes não conseguem produzir frutos, mesmo tendo boa floração. Na medida em que começam a se desenvolver os frutos “chumbinhos”, estes mumificam e caem ao solo, chegando a perdas totais das produções (COSTA; VENTURA; FERRÃO, 2003; FERREIRA, 2004; FERREIRA et al., 2004).

A mancha manteigosa é uma doença de tal complexidade que, apesar dos esforços das pesquisas, ainda é incerta a reprodutibilidade de alguns sintomas. Diversas metodologias de inoculações com diferentes isolados da doença foram realizadas, mas, a característica típica da doença em folha (mancha oleosa, cor verde-pálida) ainda não foi elucidada (FERREIRA, 2004; OROZCO-MIRANDA, 2003; VARGAS; GONZÁLEZ, 1972).

Em estudos de monitoramento da mancha manteigosa em campo, Ferreira (2004) verificou que, naquelas plantas com sintomas de mancha manteigosa, foi possível observar declínio vegetativo e, conseqüentemente, produtivo. Durante os dois anos de monitoramento, o autor observou perda significativa de produção, a qual chegou a ser nula em algumas plantas. Plantas recepadas tiveram suas brotações atrofiadas e, à medida que emitiam novas brotações, surgiam também sintomas da doença. Ferreira (2004) e Ferreira et al. (2004), por meio de estudos de colonização nos ovários, observam que as plantas com sintomas de mancha manteigosa foram mais suscetíveis ao *C.*

*gloeosporioides*, com média de 27,91%, enquanto as plantas sem sintomas tiveram média de 5,83%.

### **2.3 Sintomas e sinais da mancha manteigosa e transmissibilidade**

Wellman (1957) foi o primeiro a descrever os sintomas da mancha manteigosa. Posteriormente Vargas e González (1972), dando maior detalhamento. No Brasil, a mesma descrição foi confirmada por Bitancourt (1958) e Mansk e Matiello (1977) que, de forma detalhada, descrevem os seguintes sintomas: em folhas novas aparecem, inicialmente, manchas de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. Em estádios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares. Por fim, as manchas coalescem, determinando queda prematura das folhas. Os mesmos autores descrevem que, nos ramos e frutos, as lesões são menores, com 2 a 3 mm de diâmetro, deprimidas, necróticas de cor marrom-clara e bordas irregulares.

Ataques intensos são observados em folhas e ramos novos em plantas adultas, ocorrendo necrose e seca dos ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente (FERREIRA et al., 2004). Em estudos histopatológicos, por meio de microscopia eletrônica de varredura em ramos de cafeeiro com sintomas da mancha manteigosa, Pereira (2005) observou que, nos tecidos doentes, houve intensa colonização dos vasos do xilema e floema, e células do tecido cortical. Nestas regiões pode-se observar um intenso crescimento de hifas, responsáveis pela murcha e morte dos ramos.

A principal forma de transmissão de *C. gloeosporioides* é via sementes infectadas (FERREIRA et al., 2010), pois, em lavouras de café aparentemente sadias aparecem plantas isoladas ou pequenas reboleiras de plantas com sintomas foliares da mancha manteigosa. Além disso, abaixo dessas plantas,

observa-se a presença de plântulas com sintomas característicos da doença (FERREIRA, 2006). Orozco-Miranda (2003) colheu sementes de plantas com sintomas foliares de mancha manteigosa e semeou-as em areia estéril. O autor isolou dessas plântulas o fungo com as mesmas características daquelas observadas em isolados de plantas adultas sintomáticas, sugerindo que a doença é expressa somente em condições especiais de suscetibilidade da planta e ou modificação das condições ambientais.

#### **2.4 Mecanismos de resistência de plantas em resposta à invasão por patógenos**

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (MENDGEN; DEISING, 1993; PASCHOLATI; LEITE, 1995). As plantas defendem-se dos fitopatógenos passiva ou ativamente e para fins de estudo desses mecanismos, são geralmente subdivididos em duas categorias: pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzíveis). Em ambas as categorias, os fatores podem ser estruturais e bioquímicos. Os primeiros atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto, as reações bioquímicas nas células do hospedeiro produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Estas respostas variam para as diferentes interações hospedeiro-patógeno, e na mesma interação, em função da idade da planta, órgão/tecidos afetados, estado nutricional e condições ambientais. Menciona-se também, que o fenômeno da resistência adquirida ou induzida às doenças em plantas tem sido estudado intensivamente em anos recentes, permitindo a compreensão das rotas de sinalização envolvidas na expressão da

resistência sistêmica, assim como a regulação genética da resistência induzida ou adquirida. Contudo, conforme Hammerschmidt e Smith-Becker (1999), como as plantas restringem o desenvolvimento do patógeno não está bem especificado.

Algumas formas de resistência do hospedeiro interferem justamente no estabelecimento do patógeno na planta, impedindo que a doença se desenvolva (AMORIM, 1995; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). Segundo Esquerré-Tugayé et al. (1992), resposta hipersensitiva não ocorre em interações compatíveis para o gênero *Colletotrichum*. Esses autores mencionam que em nível subcelular, aposições e papilas são freqüentemente encontradas em células vivas do hospedeiro que ficam em contato adjacente com o patógeno. Vários estudos histopatológicos realizados em diferentes interações têm permitido demonstrar esses mecanismos evolutivos nas plantas. Assim, por exemplo, a partir da interação de *C. gloeosporioides* e uva muscadínea (DAYKIN; MILHOLLAND, 1984), *C. lindemuthianum* e feijão (HAMMERSCHMIDT; SMITH-BECKER, 1999) foi observada uma rápida formação de papilas sob os apressórios, evitando a penetração no hospedeiro. Conforme Bergstrom e Nicholson (1999) a formação de uma papila lignificada na parede externa da célula epidermal embaixo do apressório do fungo, constitui evidência dos estímulos de fenilpropanoides. Ainda de acordo com os autores, a resposta do milho ao ataque de *C. graminicola* envolve a estimulação de biossíntese de compostos fenólicos, sendo a lignina o principal fenilpropanoide formado. Também relatam que compostos como ácidos hidroxâmicos e, principalmente o DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxin-3-one) foi um dos compostos antifúngicos de defesa pré-formados nessa relação. Analogamente, depósitos de lignina e callose ( $\beta$ -1,3-glucana) foram encontrados sob os apressórios de *C. orbiculare* (HAMMERSCHMIDT; SMITH-BECKER, 1999).

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S.; FERREIRA, J. B.; MARTINS, F. G. Mancha manteigosa no contexto do complexo *Colletotrichum* em cafeeiros. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PLANTAS, 2., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 105-126.
- AMORIM, L. Infecção. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 295-308.
- BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 7, p. 596-608, July 1999.
- BIGS, J.; GEIDER, K. Movement of *Erwinia amylovora* in host plants and bacterial sorbitol and sucrose metabolism assayed with the green fluorescent protein. In: \_\_\_\_\_. **New aspects of resistance research on cultivated plants: bacterial diseases**. Berlin: Springer Verlag, 1999. p. 55-57.
- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.
- CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93 p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra de café 2011-2012: levantamento agosto 2011**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 30 out. 2011.
- COSTA, H.; VENTURA, J. A.; FERRÃO, M. A. Mancha manteigosa em café arábica na região serrana do Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: EMBRAPA Café, 2003. p. 206.

CZYMMEK, K. J.; BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. Fluorescent protein probes in fungi. In: \_\_\_\_\_. **Microbial imaging**. London: Elsevier, 2005. p. 27-41.

DAYKIN, M.; MILHOLLAND, R. B. Histopathology of ripe rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on muscadine grape. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 11, p. 1339-1341, Nov. 1984.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOACK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 189, ago. 1993. Resumo. Suplemento.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. et al. Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species. In: BAILEY, R. J.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 121-133.

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.

\_\_\_\_\_. **Flutuação sazonal e associação de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. a diferentes órgãos e tecidos cafeeiros (*Coffea arabica* L.)**. 2004. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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, 10., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: NECAF, 2004. 1 CD-ROM.

\_\_\_\_\_. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 13-17, jan./fev. 2010.

FREITAG, M. et al. *Gfp* as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 10, p. 897-910, Oct. 2004.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J. A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS, 1999. p. 37-53.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use the green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 7, p. 743-749, July 2002.

ISHIKAWA, F. H. **A função das anastomoses entre conídios na recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum***. 2009. 159 p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café "Conilon" (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MASOURI, R.; PUYESKY, B. A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycology Research**, New York, v. 102, n. 4, p. 491-496, Apr. 2009.

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 2, p. 193-213, June 1993.

OROZCO-MIRANDA, 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.

OROZCO-MIRANDA, E. F. et al. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002a. p. 59.

\_\_\_\_\_. Transmissão de *Colletotrichum* spp., por sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002b. p. 93.

ORR, K. A.; KNUDSEN, G. R. Use of the green fluorescent protein and image analysis to quantify proliferation of *Trichoderma harzianum* in nonsteril soil. **Phytopatology**, Palo Alto, v. 94, n. 12, p. 1383-1389, Dec. 2004.

PARADELA FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

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: SBC, 2003. p. 208.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 1995. v. 1, p. 417-453.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos.** 2005. 147 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

PLIEGO, C. et al. GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 137-145, Feb. 2009.

VARGAS, G. E.; GONZALEZ, U. L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 2, p. 129-135, 1972.

VARZEA, V. M. P.; RODRIGUES JUNIOR, C. J.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Manejo das doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção.** Vitória: INCAPER, 2007. p. 229-308.

WALLER, J. M. et al. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 8, p. 989-994, Aug. 1993.

WELLMAN, F. L. Blister spot of Arabica coffee from virus in Costa Rica. **Turrialba**, San José, v. 7, n. 4, p. 115-116, 1957.

ZANETTE, G. F. **Caracterização fenotípica e tentativa de obtenção de fase sexuada em *Colletotrichum sublineolum*.** 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## CAPÍTULO 2

### **Transmissibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* sem e com transformação por GFP e efeitos sobre a germinação, viabilidade e estabelecimento de plântulas**

#### **RESUMO**

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de *C. gloeosporioides* com (I2-T) e sem (I2) transformação na germinação e viabilidade da semente, transmissibilidade do patógeno semente-plântula e no estabelecimento de plântulas. Para tanto os isolados I2 e I2-T foram inoculados em sementes da cultivar Catuaí Vermelho (sementes de plantas com (PCS) e sem (PSS) sintomas de mancha-manteigosa) que foram submetidas por diferentes potenciais de inóculo do patógeno, pelo contato direto com a colônia do fungo em placas de Petri. O efeito de *C. gloeosporioides* na germinação das sementes e no estabelecimento de plântulas de cafeeiro é variável, dependendo da suscetibilidade do material genético estudado e do tempo de exposição ao fungo. Mudanças obtidas de plantas com sintomas da mancha manteigosa apresentam maior suscetibilidade à ação do fungo na germinação. Decréscimos de vigor são observados à medida que se aumenta o potencial de inóculo. A viabilidade da semente decresce com o aumento do potencial de inóculo sendo observados prejuízos fisiológicos relacionados à elevação dos mesmos. *C. gloeosporioides* é capaz de ser transmitido de semente – plântula, confirmando desta forma a capacidade infectiva dos isolados transformados e não transformados.

Palavras-chave: *Coffea arábica*. Mancha manteigosa. Sanidade de sementes.

## ABSTRACT

The present work was accomplished to evaluate the influence of *C. gloeosporioides* with (I2-T) and without (I2) transformation in germination and seed viability, seed-transmission of the pathogen in the seedling and seedling establishment. Both I2 and I2-T isolates were inoculated in Catuaí Vermelho seeds (seeds with (PCS) and without (PSS), butterfly spot symptoms), the seeds were submitted to 48, 96, 120 and 144 hours of exposure to the fungus through direct contact with the fungal colony in a Petri dish. The effect of *C. gloeosporioides* on seed germination and seedling establishment of coffee varies, depending on the sensitivity of genetic material studied and the exposure time to the fungus. Seedlings obtained from plants with butterfly spot symptoms are more susceptible to the fungus at germination. Vigor decreases have been observed, but when the exposure time of the seed to the pathogen was increased. The seed viability decreases with increased exposure time of the pathogen and physiological damage, associated to an increased seed exposure period to *C. gloeosporioides* was observed. *C. gloeosporioides* can be transmitted from seed to the seedling, thus confirming the infective capacity of the transformed and non-transformed isolates.

Key words: *Coffea arabica*. Butter spot. Seed sanity.

## 1 INTRODUÇÃO

A forma mais utilizada para propagação do cafeeiro é através de mudas oriundas de semente, dessa forma segundo Favarin et al. (2003), é de fundamental importância a obtenção de sementes de café de alta qualidade fisiológica e sanitária, uma vez que o uso de sementes saudáveis, de procedência conhecida e com alto poder germinativo, têm sido considerados os principais fatores responsáveis pela obtenção de mudas mais vigorosas em condição de campo.

A semente é considerada um eficiente meio de disseminação de fitopatógenos pelo fato de ser um organismo vivo, rico em proteínas, carboidratos e minerais. Com isso, pode garantir a sobrevivência de inúmeros patógenos por longos períodos de tempo e sua disseminação a longas distâncias (MACHADO, 1988; TANAKA; MACHADO, 1985). A importância da mesma como meio de disseminação de patógenos é superior, quando comparados com outros meios, como vento, água, solo, etc., pois os patógenos nas sementes permanecem viáveis por mais tempo que nos propágulos vegetativos, prolongando-lhes o período potencial de transmissão (AGARWAL; SINCLAIR, 1997). Outro fato importante é que a fonte de inóculo primário presente nas sementes favorece a infecção precoce de plântulas (BRACCINI et al., 1999). Além disso, tem também o aspecto epidemiológico, levando-se em conta a incidência e o progresso da doença em uma população de plantas e as dificuldades que podem decorrer em termos de controle dessa doença (MACHADO, 1988). Muitas doenças são transmitidas via sementes como é o caso da mancha manteigosa do cafeeiro causada por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Atualmente, a mancha manteigosa é uma doença de destaque e observações em campo têm revelado o seu agravamento, principalmente quando

o fungo ataca flores e frutos em expansão e as plantas doentes não conseguem produzir frutos, mesmo tendo boa floração. Na medida em que começam a se desenvolver os frutos “chumbinhos”, estes mumificam e caem ao solo, chegando a perdas totais da produção (COSTA et al., 2003; FERREIRA et al., 2004). É uma doença de tal complexidade que, apesar dos esforços das pesquisas, ainda é incerta a reprodutibilidade de alguns sintomas. Há relatos de sua ocorrência nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo, Rondônia e Amazonas. Em Minas Gerais, tem sido relatada em lavouras das cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo, Rubi, Mundo Novo e Catuaí Vermelho. O patossistema *Colletotrichum*-cafeeiro ainda é pouco explorado no Brasil e também pouco se conhece sobre o real efeito desse patógeno sobre a cultura.

Para a cafeicultura, a transmissão de *C. gloeosporioides*, pela semente (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009; LINS, 2006), constitui-se num grande problema, uma vez que as lavouras de café são formadas a partir de mudas obtidas de sementes. Desta forma, o conhecimento dos mecanismos que envolvem a infecção e posterior transmissão de *C. gloeosporioides* via sementes, ainda é aspecto pouco esclarecido nas condições Brasileiras. Assim sendo, o uso de técnicas moleculares via marcadores genéticos, pode auxiliar na elucidação desses mecanismos.

Diversos marcadores genéticos são utilizados na atualidade, mas muitos empregam técnicas onerosas. Entretanto, o marcador molecular *Green fluorescent protein* (GFP), que codifica a proteína verde fluorescente, aparece como opção valiosa para estudos sobre a interação de agentes patogênicos (CHALFIE et al., 1994).

Diante dessas considerações, objetivou-se neste trabalho avaliar a influência de *Colletotrichum gloeosporioides* antes e após transformação com GFP na incidência, germinação e viabilidade da semente, transmissibilidade do patógeno semente-plântula e no estabelecimento de plântulas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades Fúngicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Foi realizado com sementes da cultivar Catuaí Vermelho obtidas de plantas com (SOPCS) e sem (SOPSS) sintomas de mancha manteigosa e inoculadas com *C. gloeosporioides*. Os frutos destinados à produção de sementes foram colhidos no estágio cereja, sendo feito o despulpamento manual e secagem a sombra. O perfil sanitário e fisiológico inicial dos lotes de sementes foi determinado pelos testes de germinação, conforme descrito nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) e a sanidade, pelo teste de incubação em substrato de papel umedecido (Blotter test).

### 2.1 Inoculação das sementes

A inoculação das sementes foi realizada com 2 isolados de *C. gloeosporioides*, sendo um isolado não transformado (I2) ou isolado “selvagem” e um isolado transformado (I2-T) geneticamente com a proteína verde fluorescente (GFP) pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades Fúngicas da UFLA em 2010 – dados não publicados.

Para tanto, placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo extrato de malte ágar a 2% foram inoculadas com suspensão de conídios na concentração  $2 \times 10^6$  conídios por  $\text{mL}^{-1}$ . Em seguida, as placas foram incubadas em câmara de germinação tipo BOD, com temperatura ajustada para 25°C e regime de luz de 12 horas, durante 7 dias, para o desenvolvimento das colônias do fungo. Após desenvolvimento das colônias, as sementes, provenientes de plantas com e sem sintomas de mancha-manteigosa, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio

(NaOCl) a 2%, durante dois minutos, seguindo-se lavagem, por duas vezes, em água destilada esterilizada e secagem sobre papel de filtro em câmara de fluxo laminar por 24 horas. As sementes, assim preparadas, foram distribuídas nas placas de Petri, contendo colônia do fungo, em uma única camada ocupando a superfície da colônia no meio MEA a 2% e incubadas, em câmara de germinação tipo BOD, à temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  por diferentes períodos de contato com o fungo, 48, 96, 120 e 144 horas, correspondendo aos diferentes potenciais de inóculo pretendidos (Tabela1). Após cada período de exposição, as sementes foram colocadas para secar por 24 horas, acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria até realização dos testes para avaliação da qualidade sanitária e fisiológica (sanidade, germinação, índice de velocidade de emergência e tetrazólio). A título de referencial uma testemunha foi preparada para cada tempo de incubação das sementes em meio MEA a 2% na ausência de *C. gloeosporioides*.

Tabela 1 Descrição do potencial de inóculo em função do tempo de contato das sementes com a colônia de *C. gloeosporioides*.

<b>Período de contato (horas)</b>	<b>Potencial de inóculo</b>
48	P1
96	P2
120	P3
144	P4

## **2.2 Incidência de *C. gloeosporioides* em sementes**

A incidência de *C. gloeosporioides* nas sementes (qualidade sanitária das sementes) foi avaliada pelo método de incubação em ágar-água a 0,5%, para cada tipo de material, que foram submetidos aos diferentes tempos de exposição ao fungo e testemunhas. Foram utilizadas 200 sementes para cada tempo de exposição ao fungo, divididas em 8 placas com 25 sementes por placa. As placas foram incubadas, em câmara de germinação tipo BOD, a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Ao final desse período, as sementes foram examinadas individualmente ao microscópio estereoscópico, verificando-se a incidência de *C. gloeosporioides*.

## **2.3 Teste de germinação**

O teste de germinação foi realizado utilizando sementes sem pergaminho em bandejas contendo areia lavada e esterilizada + Plantmax® na proporção de 2:1, à temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , com 50 sementes por bandeja, em 4 repetições para cada tratamento. Para avaliação, foram consideradas plântulas normais aquelas que, aos 50 dias, apresentaram sistema radicular principal bem desenvolvido, com emissão de, pelo menos, duas raízes secundárias. Foram também computados os somatórios de plântulas anormais infectadas e sementes mortas. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais infectadas e sementes mortas.

## **2.4 Índice de velocidade de emergência**

A avaliação do índice de velocidade de emergência de plântulas foi realizada com 25 sementes/repetição, em 8 repetições. As sementes, inoculadas

e não inoculadas, foram semeadas em bandejas contendo areia lavada e esterilizada + Plantmax® na proporção de 2:1. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação por 60 dias. As avaliações foram feitas a cada três dias, sendo consideradas como emersas as plântulas que emergiram completamente o endosperma. O cálculo do IVE foi feito segundo a metodologia proposta por Maguire (1962) Onde:

$$\text{IVE} = E_1/N_1 + E_2/N_2 + E_n/N_n, \text{ em que:}$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

$E_1, E_2, \dots, E_n$  = número de plântulas emergidas no dia, computadas na primeira, segunda, ... última contagem;

$N_1, N_2, \dots, N_n$  = número de dias da semeadura à primeira, segunda, ... última contagem.

Foi avaliado também o estande inicial (aos 34 dias) e estande final (aos 60 dias) determinados pela contagem direta do número de plântulas emergidas.

## 2.5 Teste de tetrazólio

A avaliação da viabilidade das sementes de café pelo teste de tetrazólio foi realizada com 200 sementes por tratamento, divididas em 4 repetições de 50 sementes. Após a retirada manual do pergaminho, as sementes foram pré-condicionadas em água por um período de 48 horas, à temperatura de 30°C. Decorridas às 48 horas, foram seccionadas para a extração do embrião, sem danificá-lo. Durante o processo de extração, os embriões foram mantidos em solução de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP). Ao término da extração, os embriões foram lavados em água corrente com auxílio de uma peneira e embebidos em solução de tetrazólio (2,3,5, cloreto de trifênil tetrazólio) a 0,5%,

utilizando-se frascos escuros e submetidos à temperatura de 30°C, por 2 horas. Em seguida, foram lavados em água corrente distribuídos sobre papel mata-borrão umedecidos e submetidos à avaliação em microscópio estereoscópico, de acordo com critérios estabelecidos por Vieira (1998). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de embriões viáveis.

## 2.6 Transmissibilidade

Tanto para plantas sintomáticas e assintomáticas, provenientes do ensaio 2.4 foram calculadas a taxa de infecção (TI) e taxa de transmissão (TT) de *C. gloeosporioides* por sementes, utilizando-se a fórmula empregada por Teixeira e Machado (2003). Para determinar a TI, foram retirados fragmentos com aproximadamente dois centímetros região de inserção dos cotilédones com o caule de 30 plantas das parcelas, representando a parcela total de 200 plantas. Em seguida, estes fragmentos foram seccionados e desinfestados com álcool 70% por 30 segundos, emergidos, posteriormente, em hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, enxaguados duas vezes em água destilada esterilizada e colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro com meio de cultura MEA.

As placas foram mantidas em câmara de incubação à 25°C e fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Diariamente foram feitos exames de todos os fragmentos.

A taxa de infecção foi obtida considerando-se o número de fragmentos com crescimento micelial em função do número de plantas avaliadas em cada parcela. O resultado foi expresso em porcentagem de plantas infeccionadas. A taxa de transmissão foi determinada com base na taxa de infecção e na incidência de *C. gloeosporioides* verificada nas sementes inoculadas, em cada tratamento. De maneira esquemática a taxa de transmissão foi calculada com base na fórmula:

$$T.T(\%) = \frac{T.I(\%)}{I.S(\%)} \times 100$$

Em que:

T.I.(%): taxa de infecção de *C. gloeosporioides* em fragmentos de hipocótilos, retirados de plantas de café com 60 dias de idade.

I.S.(%): incidência de *C. gloeosporioides* em sementes inoculadas, com base no teste de sanidade .

A taxa de transmissão também foi avaliada pelo isolamento de plantas infeccionadas. Após dez dias crescendo em meio MEA + Higromicina, as colônias foram avaliadas em microscópio estereoscópico. Em seguida foram feitas lamina das partes as quais estavam com fluorescência abundante. As mesmas foram então analisadas em Microscópio de epifluorescência. Destas colônias também foi feita a repicagem do material para novas placas com meio MEA + Higromicina e incubadas por 15 dias em BOD. 20 hipocótilos na fase “palito de fósforo”, foram então inoculados com suspensões de esporos na concentração de  $2 \times 10^6$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . Por 48 horas, os hipocótilos permaneceram em câmara úmida e, após este período, foram re-inoculados e mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas a  $25^\circ\text{C} \pm 1$ , por 15 dias. A avaliação seguiu a mesma escala usada no teste de patogenicidade do capítulo 1 (Tabela 1).

A transmissão também foi avaliada por meio de eletromicrografias feitas com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura. Para tanto, foram retirados pequenos fragmentos dos materiais genéticos estudados, estes foram fixados em fixador Karnovsky modificado e em seguida seguiu-se o protocolo

de preparo de amostras para microscopia de varredura estabelecida por Bossola e Russell (1998), utilizado como padrão para esse tipo de análise.

## **2.7 Análise dos dados**

As análises de variância das variáveis analisadas foram realizadas em esquema fatorial 2 x 2 x 4. Os fatores e seus níveis que constituíram o fatorial foram: plantas de cafeeiro (Catuai Vermelho, com e sem sintomas da mancha manteigosa, isolados e potenciais de inóculo do fungo: P1, P2, P3 e P4) no programa Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2000) versão 4.0. Em seguida, as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de F ( $P < 0,05$ ). As variáveis significativas foram submetidas à análise de regressão, ajustando-se o modelo estatístico adequado para explicar o comportamento do patossistema.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na caracterização inicial dos lotes, verificou-se que em sementes provenientes de plantas com sintomas de mancha-manteigosa, a germinação foi de 68%, enquanto em sementes provenientes de plantas sem sintomas de mancha-manteigosa a germinação foi de 89%. Isto mostra que as sementes apresentavam inicialmente alta qualidade devido à boa porcentagem de germinação. Nas sementes analisadas inicialmente, foram detectados *C. gloeosporioides* em uma incidência média de 7,5% em SOPCS e 0,5% em PSS, *Fusarium* em uma incidência média de 65,5 em PCS e 23,5% em SOPSS, seguidas de *Aspergillus* e *Cladosporium*. Sendo que, a maioria das colônias encontradas foi de *C. gloeosporioides* e *Fusarium*, que são comprovadamente prejudiciais ao cafeeiro.

Dados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram encontrados por Dias e Barros (1993) que observaram a presença dos fungos *Penicilium* sp., *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. em sementes de café arábica, sendo que o gênero *Fusarium* sp. foi observado em 100% das sementes, e por Carvalho (2011) que verificou a presença dos fungos *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp. e *C. gloeosporioides* observado em 2,0% das sementes de café também da cultivar Catuaí Vermelho.

Os resumos das análises de variância para os resultados dos testes realizados nos diferentes potenciais de inóculo de *C. gloeosporioides* estão apresentados nas Tabelas 1- 12, ANEXO B.

#### 3.1 Incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* nas sementes

Houve interação significativa entre o material genético estudado e os tratamentos e entre os tratamentos e o potencial de inóculo. Para os tratamentos,

com o fungo tanto sem, quanto com transformação quando inoculados em SOPSS e em SOPCS o comportamento foi idêntico com maior incidência, quando comparado à testemunha (Tabela 2). Botelho (2011), trabalhando com 2 isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, inoculados em sementes de soja, verificou efeito semelhante ao encontrado no presente estudo. Galli, Panizzi e Vieira (2007), mostraram que existe diferença entre isolados de *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. O isolado 1 proveniente de plantas com sintomas de antracnose na região de Jaboticabal-SP, foi mais virulento que o isolado 2 proveniente de Campinas-SP. Observaram também que, no preparo do inóculo, o isolado 2 apresentou maior quantidade de esporos, no entanto essa maior concentração de esporos não foi suficiente para promover o maior transporte do fungo pelas sementes. Além disso, a maior esporulação do isolado menos virulento pode ser um mecanismo de sobrevivência do fungo. Em teoria, fungos com maior virulência, necessitam de menor quantidade de esporos para infectar seus hospedeiros.

Tabela 2 Incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação (I2-T), em sementes de cafeeiro provenientes de plantas com (SOPCS) e sem (SOPSS) sintomas da mancha manteigosa. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Tratamento	Incidência (%)	
	SOPSS	MOPCS
I2	11.000000 Aa	29.062500 Ab
I2-T	10.687500 Aa	28.875000 A b
Testemunha	0.000000 Ba	14.000000 Bb
CV(%)	10,07	

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

Tanto SOPSS quanto SOPSS apresentaram comportamento semelhante, independente do isolados à medida que houve aumento do potencial de inóculo de *C. gloeosporioides*, demonstrados pelo aumento da incidência do patógeno proporcionalmente, à medida que se aumentou o tempo de contato das sementes com o mesmo (Gráfico 1). De acordo com os resultados, a porcentagem inicial de incidência nas sementes foi de 29,49% e 27,5% para I2 e I2-T, respectivamente logo no primeiro potencial de inóculo (P0) e máxima de 58,25% e 56,75% para I2 e I2-T, respectivamente, quando submetidas ao potencial de inóculo 4. Pôde-se verificar que o potencial de inóculo do patógeno aumentou a incidência do mesmo e que a incidência na testemunha foi insignificante quando comparado os valores na testemunha e nos isolados. Esses dados sugerem que, para a obtenção de sementes infectadas por *C. gloeosporioides*, são necessários potenciais de inóculo maiores a partir de 48 horas de exposição. Outros fatores, como genótipo do hospedeiro e virulência do patógeno, devem ser levados em consideração nesse tipo de estudo. Tanaka, Menten e Mariano (1989) verificaram que, no patossistema *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* x algodoeiro, a partir de 12 horas de contato das sementes com a colônia fúngica, já ocorre infecção, mas o período de 24 horas de exposição seria mais adequado para se obter maiores taxas de infecção. Resultados semelhantes foram encontrados por Barrocas (2008), sugerindo que, para a obtenção de sementes infectadas, os tempos de exposição a partir de 24 horas são suficientes.

Braccini et al. (1999), estudando a incidência de microrganismos em sementes de café robusta durante o armazenamento, identificaram fungos dos gêneros: *Fusarium* sp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., com maior predominância do gênero *Fusarium* e de *Alternaria*, variando de 63%-73% e 7%-11%, respectivamente. Com relação à *Colletotrichum* spp., verificaram incidência variando de 4%-1%. Já com

tratamento fungicida (benzimidazol+ dimetilditiocarbamato), verificaram-se nenhuma presença de agentes fúngicos nas superfícies das sementes, tanto em sementes oriundas de plantas com sintomas de mancha manteigosa, como em sementes de plantas sem sintomas da doença.

Com base nos resultados deste ensaio percebe-se que os efeitos de *C. gloeosporioides* em níveis de infecção distintos, equivalentes a diferentes potenciais de inóculo, foram evidentes, interferindo negativamente no desempenho das sementes. Diante disso, fica evidente que a presença de colonização endofítica de *C. gloeosporioides* pode vir a ser um problema para a cultura do café devido à sua transmissão pelas sementes, as quais são usadas na formação de novas lavouras.

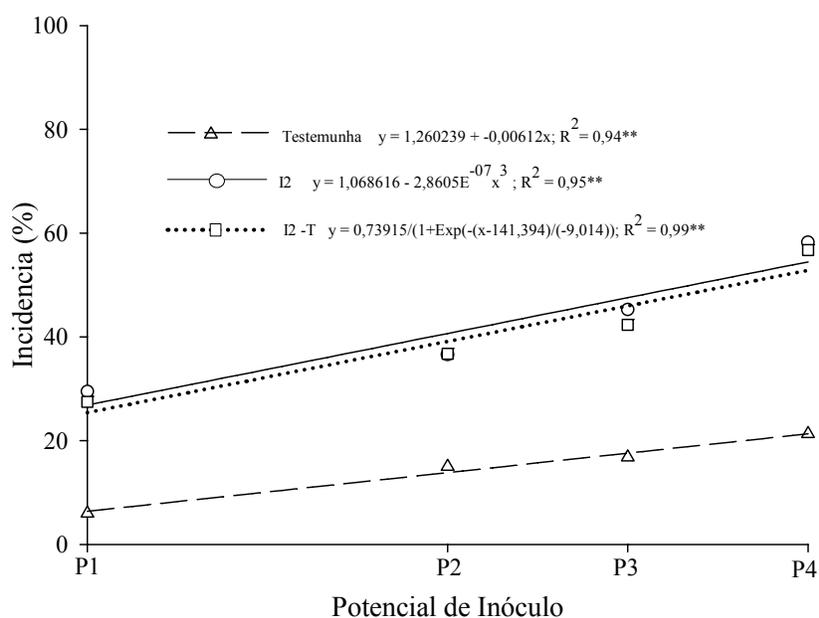


Gráfico 1 Incidência de *C. gloeosporioides* (%) sem (I2) e com transformação genética (I2-T) em sementes de café cultivar Catuaí Vermelho em função de diferentes potenciais de inóculo

### 3.2 Teste de germinação

Em relação à variável germinação, só foi possível observar interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre material genético x potencial de inóculo. Porém, houve diferença significativa para os fatores material genético, tratamento e potencial de inóculo isoladamente.

SOPCS comportaram de maneira distinta à SOPSS em relação à percentagem de germinação. Em SOPSS a média da germinação foi de x % enquanto que, pra SOPCS foi bem mais elevada atingindo x % (Tabela 3). Ficando desta forma evidente que plantas que possuem o fator de “susceptibilidade” a interferência do fungo nas suas funções fisiológicas são mais comprometidas, devendo assim, maior atenção em relação a plantas sem tal fator serem tomadas. Fato este também citado por Vargas e Gonzáles (1972), onde os autores dizem acreditar que, provavelmente, exista um caráter genético que predispõe plântulas oriundas de sementes de plantas com mancha-manteigosa a uma maior susceptibilidade.

Tabela 3 Percentagem média de germinação de sementes de cafeeiro, provenientes de plantas sem (SOPSS) e com sintomas (SOPCS) da mancha manteigosa, após inoculação (HAI) com *C. gloeosporioides* não transformado e transformado.

<b>Material genético</b>	<b>Médias da % de germinação</b>
SOPSS	30.395833 A
SOPCS	16.437500 B
CV(%)	28,64

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

Para os tratamentos com o fungo tanto sem quanto com transformação quando inoculados em SOPSS e SOPCS o comportamento foi idêntico com menor percentagem de germinação, quando comparado à testemunha (Tabela 4), mostrando desta forma o efeito nocivo que o patógeno pode causar às sementes. É possível considerar que se as sementes utilizadas não apresentassem contaminações microbianas como verificado no teste inicial dos lotes, os percentuais de germinação das mesmas, provavelmente seriam mais elevados. Botelho (2011), trabalhando com dois isolados de *S. sclerotiorum* em sementes de soja observou comportamento semelhante aos verificados no presente estudo, ou seja, as sementes inoculadas com o patógeno apresentaram menor percentagem de germinação quando comparado com a testemunha (Sementes sem a presença do patógeno).

Tabela 4 Percentagem média de germinação de sementes de cafeeiro inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação (I2-T), comparadas com a testemunha. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Tratamento</b>	<b>Médias de germinação (%)</b>
I2	21.250000 A
I2-T	19.718750 A
Testemunha	29.281250 B
CV(%)	28,64

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

Pela análise de regressão, ajustou-se modelo polinomial para a variável germinação em relação ao potencial de inóculo de *C. gloeosporioides*, verificando-se que houve um decréscimo gradual dos valores de germinação com o aumento do potencial de inóculo (Gráfico 2). Ficando evidente que em níveis mais elevados de potencial de inóculo, o patógeno foi responsável por sua redução e que essa redução foi observada do menor para o maior potencial de inóculo (P1 – P4).

Os resultados encontrados corroboram com os relatos de Carvalho (2011), a autora estudando o mesmo patossistema, porém, com o fungo não transformado também observou diminuição da porcentagem de germinação de plantas com o aumento do tempo de exposição ao patógeno. Araújo et al. (2006), estudando o patossistema *C. gossypii* var. *cephalosporioides* x algodoeiro também observaram diminuição da porcentagem de plantas de algodoeiro com o aumento do tempo de exposição ao patógeno. Garcia Júnior et al. (2007) também verificaram que a presença de *F. graminearum* em sementes de trigo, provocou a redução na germinação das sementes. Resultados semelhantes também foram observados por Botelho (2011) e Henrique et al. (2008), em seus trabalhos com inoculação de *A. alternata* em sementes de melão, e *S. sclerotiorum* em sementes de soja, respectivamente, os autores verificaram que a presença do fungo acarretou em decréscimo significativo no potencial germinativo das sementes.

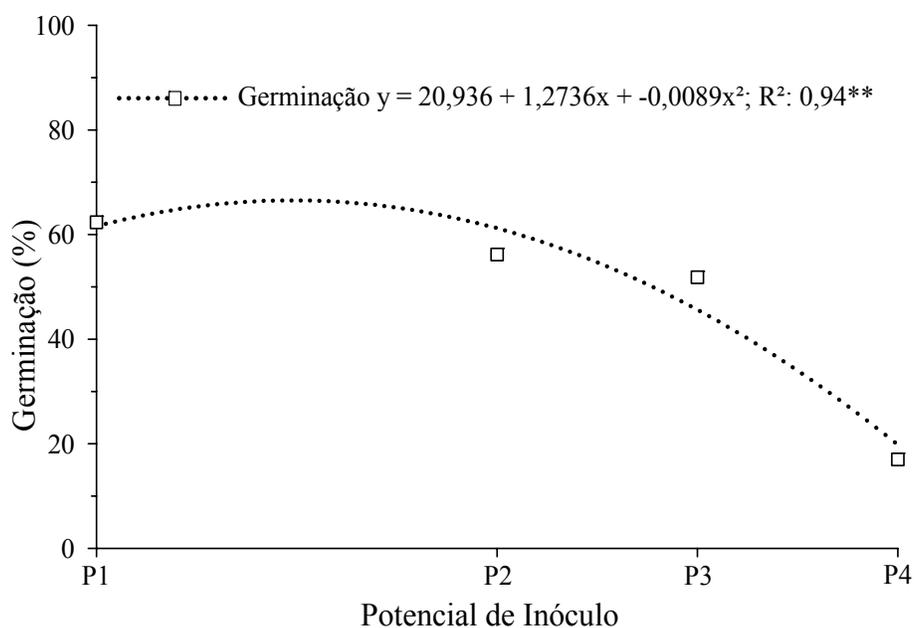


Gráfico 2 Valores médios de germinação de sementes de café em função dos diferentes potenciais de inóculo

De forma análoga aos resultados de germinação anteriormente apresentados, pode-se observar que as percentagens de plântulas infectadas e sementes mortas também sofreram influência negativa em relação ao tipo de material genético estudado, sendo que, SOPCS comportaram de maneira distinta à SOPSS, com maior percentual de plântulas infectadas (Tabela 5). Isto reforça a influência do fator de “suscetibilidade” como MOPCS em promover maiores prejuízos às sementes. O efeito negativo observado sobre a germinação de sementes indica que os isolados são capazes de atacar e matar o embrião. Nos casos em que a semente germina e a plântula emerge infectada, o vigor da planta sobrevivente é comprometido (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 1998, 2006). O que

foi verificado no presente estudo através da alta porcentagem de plântulas infectadas e sementes mortas em ambos os materiais estudados (MOPCS e MOPSS).

Tabela 5 Percentagem média de plântulas de cafeeiro infectadas e sementes mortas após inoculação com *C. gloeosporioides* não transformado e transformado, provenientes de plantas sem (SOPSS) e com sintomas (SOPCS) da mancha manteigosa.

<b>Material genético</b>	<b>Médias da % de plântulas infectadas</b>	<b>Médias da % de sementes mortas</b>
SOPSS	0.385417 A	10.583333
SOPCS	1.791667 B	14.947917
CV(%)	111,00	29,98

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

Em relação à percentagem de sementes mortas foram verificadas diferenças significativas para as variáveis material genético como observado na Tabela 5, para os tratamentos (Tabela 6) e potencial de inóculo (Gráfico 3). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores trabalhando com outros patossistemas (BARROCAS, 2008; BOTELHO, 2011; CARVALHO, 2011).

Tabela 6 Percentagem média de sementes mortas de cafeeiro inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação (I2-T), comparadas com a testemunha. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Tratamento</b>	<b>Médias de sementes mortas (%)</b>
I2	14.062500 B
I2-T	14.765625 B
Testemunha	9.468750 A
CV(%)	29,98

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

A exposição das sementes aos diferentes potenciais de inóculo promoveu um aumento significativo na percentagem de sementes mortas. Assim como para germinação fica evidente o efeito nocivo do patógeno, pois através dos resultados percebe-se que uma vez em contato com as sementes o mesmo pode vir a danificar ou até mesmo matar o embrião ocasionando a morte das mesmas.

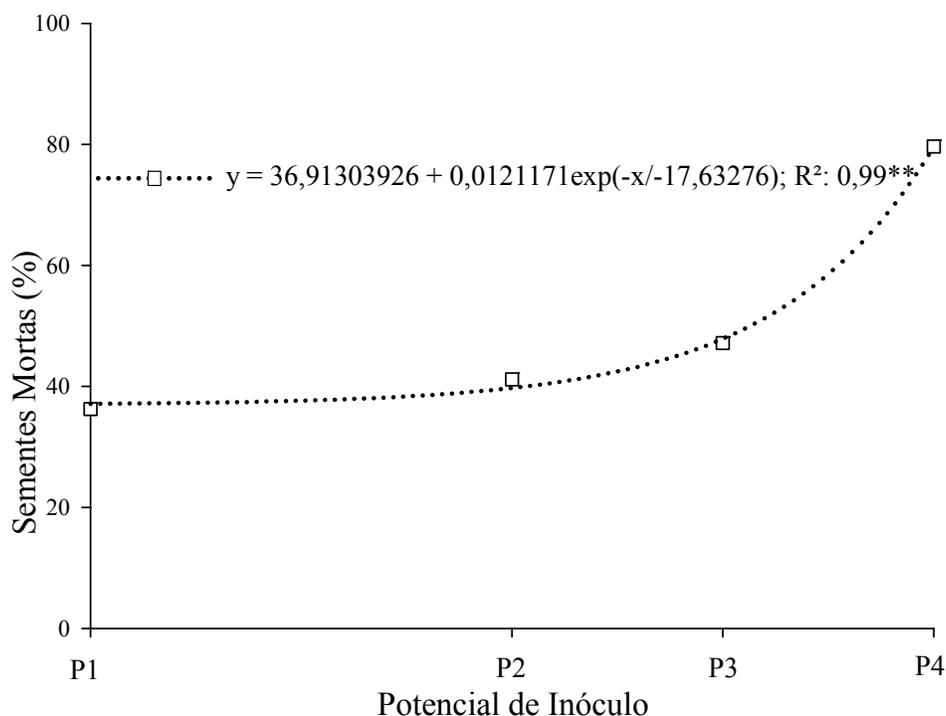


Gráfico3 Valores médios de sementes mortas (%) de café em função dos diferentes potenciais de inóculo

Nesse teste, fica clara a influência negativa do fungo no processo germinativo, pois os tratamentos que continham o patógeno diferenciaram-se das testemunhas em ambos os materiais estudados (MOPSS e MOPCS), não descartando, entretanto, a possibilidade de um efeito *priming* ou condicionamento fisiológico observado nos últimos potenciais de inóculo, que consiste da hidratação controlada das sementes, suficiente para promover atividades pré-metabólicas, sem, contudo, permitir a emissão da radícula (HEYDECKER; HIGGINS; GULLIVER, 1993).

Em resumo pode-se dizer que houve um comportamento semelhante entre o isolado transformado e não transformado. Isto reforça a hipótese de que

há preservação das características patogênicas dos isolados transformados em relação aos isolados originais, podendo os mesmos infectar sementes e plântulas manifestando-se por meio de prejuízos nas características fisiológicas das mesmas.

### 3.3 Índice de velocidade de emergência

Houve diferença significativa para os fatores material genético e potencial de inóculo isoladamente.

Para SOPSS a média do IVE foi de x%, enquanto que para SOPCS foi de x%, demonstrando desta forma um maior índice em mudas sem o fator de “suscetibilidade” quando comparadas a mudas com tal fator (Tabela 7).

Tabela 7 Valores médios de índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de cafeeiro provenientes de plantas sem (SOPSS) e com (SOPCS) sintomas da mancha manteigosa.

<b>Material genético</b>	<b>IVE (Médias)</b>
SOPSS	0.365123 A
SOPCS	0.649885 B
CV(%)	46,7

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

Os maiores valores de IVE foram verificados até o potencial P3 para todos os tratamentos, com decréscimos a partir deste, evidenciando o efeito do patógeno no vigor dessas sementes (Gráfico 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira (2008) trabalhando com *Colletotrichum dematium* var.

*truncata* inoculado artificialmente em sementes de soja, a autora relata que o fungo ocasionou influência negativa no índice de velocidade de emergência afetando o vigor das sementes. Carvalho (2011) também relata a queda no índice de velocidade de emergência de sementes de café submetidas a 96 e 120 horas de exposição a *C. gloeosporioides*. Assim como outros trabalhos conduzidos com outros patossistemas (BARROCAS, 2008; MACHADO et al., 2001; SARTORI; RESIS; CASA, 2004). Em todos eles foram observadas reduções do IVE, a partir de sementes inoculadas com diferentes potenciais de inóculo.

Diante dos resultados deste ensaio ficou evidenciado que houve decréscimo de vigor à medida que se aumentou o potencial de inóculo. Verificase que os maiores valores de IVE foram observados no potencial P0. Sendo estes resultados semelhantes aos observados no teste de sanidade o qual se obteve menor nível de infecção no maior potencial de inóculo. Este fato assim como para porcentagem de germinação, pode ser explicado considerando-se que o condicionamento hídrico aos quais foram submetidas as sementes (Placas com meio de cultura BDA), pode afetar seu vigor, mas quando utilizados em períodos menores, com a finalidade de potencializar o desempenho das sementes, costuma não acarretar decréscimos significativos de vigor.

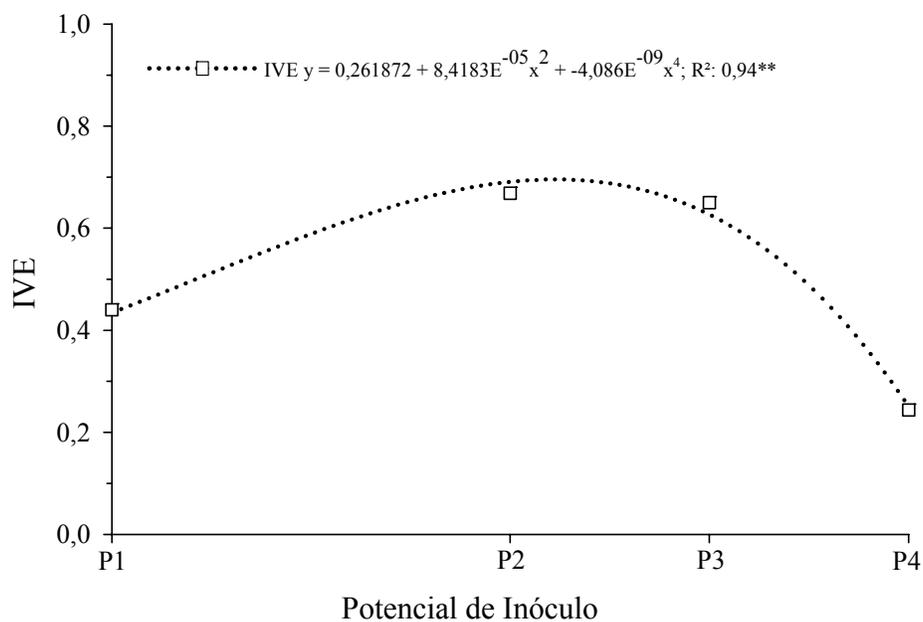


Gráfico 4 Valores médios de índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de cafeeiro, em função dos tempos de exposição a *Colletotrichum gloeosporioides*

Com base nos resultados de germinação anteriormente demonstrados, à medida que o potencial de inóculo nas sementes aumentou os valores da germinação assim como do vigor (IVE) foram significativamente reduzidos. O que possivelmente influenciou os dados do estande inicial (Tabela 8) e final (Gráfico 6) tanto em MOPSS como em MOPCS para todos os tratamentos.

De acordo com Eira e Marcos Filho (1990), um dos mais importantes sintomas do declínio da qualidade fisiológica é a lentidão do processo de germinação das sementes, acompanhada pelo aumento do período decorrido entre a germinação da primeira e da última semente de um lote e conseqüente desuniformidade entre plântulas de um mesmo lote. Além disso, quanto maior o

tempo requerido para a emergência das plântulas eleva-se os riscos oferecidos por estresses abióticos e bióticos no campo (KHAN; ABAWI; MAGUIRRE, 1992). Este fato explica então o ocorrido, pois, plantas as quais suas sementes mantiveram-se em maior tempo de contato com o fungo, ou seja, maiores potenciais de inóculo, a porcentagem de emergência foi bem menor. Foi possível também observar a diferença nesses valores em relação aos dois tipos de material aos 60 dias após plantio, sendo que MOPSS a porcentagem de plantas foi bem maior chegando a um máximo de 88% logo no potencial P1, enquanto MOPCS foi verificado um valor menor, 73,5% também no potencial P1, sendo observado decréscimo desses valores após este.

Foi observada diferença significativa do material genético isoladamente (Tabela 8), e interação significativa para tratamento x potencial de inóculo (Gráfico 5) para a variável estande inicial, demonstrando desta forma o efeito do patógeno. Em SOPCS a percentagem de plantas aos 40 dias (Estande inicial) foi bem menor que em SOPSS.

Tabela 8 Valores médios de estande inicial de sementes de cafeeiro provenientes de plantas sem (SOPSS) e com (SOPCS) sintomas da mancha manteigosa.

<b>Material genético</b>	<b>Médias do estande inicial (%)</b>
SOPSS	0.989583 A
SOPCS	0.458333 B
CV(%)	112,77

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

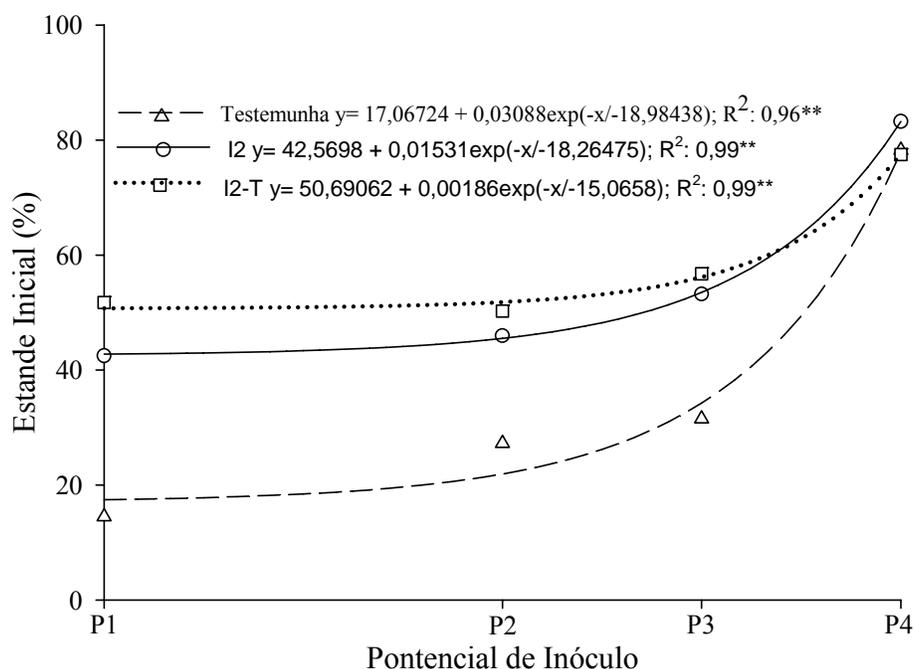


Gráfico 5 Valores médios do estande inicial (%), de sementes de cafeeiro em função dos potenciais de inóculo de *Colletorichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação genética (I2-T)

Todos os tratamentos comportaram-se de maneira semelhante à medida que houve aumento do potencial de inóculo de *C. gloeosporioides*, ocasionando em uma menor percentagem de plantas emergidas proporcionalmente, à medida que se aumentou o tempo de contato das sementes com mesmo.

Com relação ao estande final o efeito do aumento do tempo de exposição ao fungo seguiu a mesma tendência para ambos materiais genéticos testados neste trabalho, a exemplo do que ocorreu com a variável percentagem de sementes viáveis pelo teste de tetrazólio, apresentando interação tripla significativa entre material genético, tratamento e potencial de inóculo (Gráfico

6). De modo geral, os resultados desse estudo seguem a mesma tendência dos resultados de trabalhos conduzidos com outros patossistemas (BARROCAS, 2008; BOTELHO, 2011; SOUSA, 2006). Em todos eles foram observados reduções nos estandes inicial e final, germinação e IVE em sementes submetidas a diferentes potenciais de inóculo.

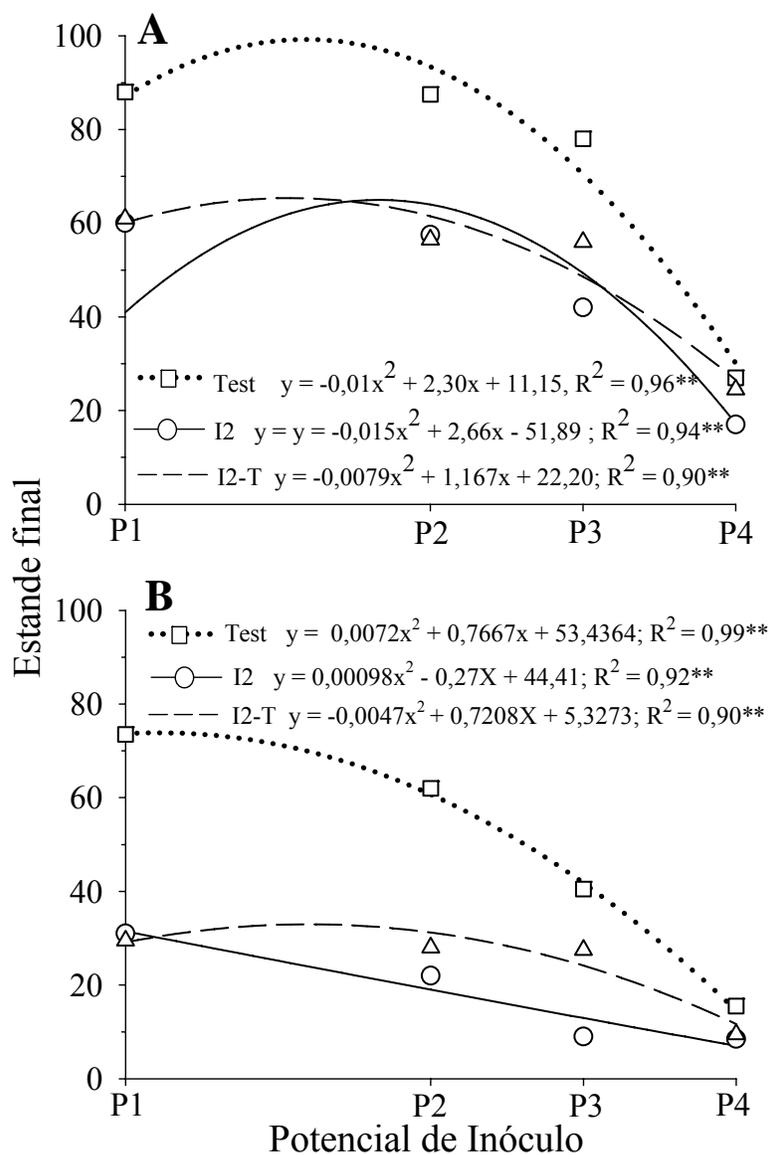


Gráfico 6 Valores médios do estande final (%), de sementes de cafeeiro. A) provenientes de plantas sem sintomas (SOPSS) e B) provenientes de plantas com sintomas (SOPPCS) da mancha manteigosa em função dos potenciais de inóculo de *Colletorichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação genética (I2-T)

É sabido que há vários fatores capazes de influenciar o desempenho de sementes em condições semi controladas, ou seja, que não sejam as ideais de laboratório, como é o caso da casa de vegetação. De acordo com Marcos Filho (2005), o estabelecimento adequado do estande depende da utilização de sementes com alto potencial fisiológico, capazes de germinar uniforme e rapidamente, sob ampla variação do ambiente. A emergência assim como a sua velocidade pode variar amplamente em função das condições edafo-climáticas, mesmo para sublotes de sementes que apresentem alta capacidade de germinação (CASAROLI, 2005). Assim sendo, acredita-se que além dos efeitos ocasionados pelos isolados possam também ter influenciado sobre o IVE, o estande inicial e o estande final as condições edafo-climáticas verificadas no decorrer da experimentação.

### **3.4 Teste de tetrazólio**

A interação tripla entre material genético x tratamento x potencial de inóculo foi significativa ( $p > 0,05$ ). Estes dados mostram que os prejuízos fisiológicos relacionados à elevação do período de exposição das sementes à *C.gloeosporioides* apresentaram a mesma tendência que no teste de germinação.

A viabilidade é definida como a estimativa do potencial de germinação e o teste de tetrazólio pode ser utilizado para determinar a viabilidade das sementes, principalmente quando estas apresentam germinação lenta. Como é o caso do café (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 1966).

Pelos resultados do teste de tetrazólio referentes à SOPSS (Gráfico 7 A), pode-se observar que os dados de viabilidade das sementes foram superiores aos observados em SOPCS (Gráfico 7 B) após contato das sementes aos diferentes potenciais de inóculo tanto transformado (I2-T) quanto sem transformação (I2).

Ocorrendo uma diminuição nessa viabilidade à medida que se aumentou o potencial de P0 a P5. (Gráfico 7 A e B).

Os resultados encontrados corroboram com Carvalho (2011), a autora estudando o mesmo patossistema, porém, com o fungo não transformado também observou diminuição da porcentagem de viabilidade de sementes de café com o aumento do tempo de exposição ao patógeno. Mantovanelli (2001), estudando a interferência de fungos no teste de tetrazólio em sementes de milho, detectou que sementes inoculadas com *Penicillium* sp. apresentaram viabilidade significativamente inferior.

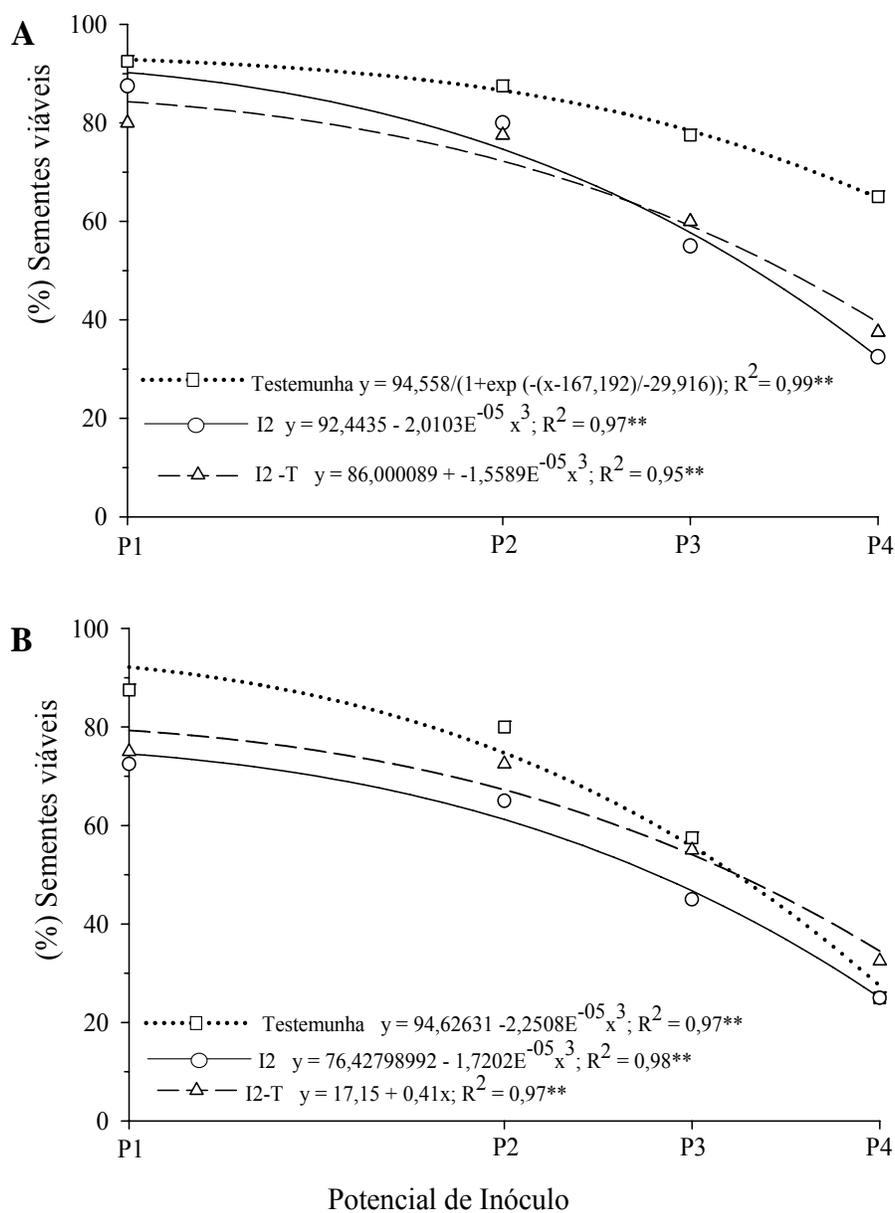


Gráfico 7 Valores médios de sementes viáveis (%), em função dos potenciais de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação genética (I2-T). A) sementes provenientes de plantas sem sintomas (SOPSS) e B) provenientes de plantas com sintomas (SOPCS) da mancha manteigosa

Os resultados do potencial de germinação (viabilidade) detectado pelo teste de tetrazólio foram superiores, quando comparados à porcentagem de germinação para sementes não inoculadas (Testemunhas). Esse fato segundo França Neto e Henning (1992) e Krzyzanowski, Vieira e França Neto (1999) pode ser explicado, enfatiza os autores que o teste de tetrazólio é realizado sob condições mais favoráveis de ambiente do que as proporcionadas para o teste de germinação, além de ser realizado em menor período de tempo, o que atenua a ação de possíveis fatores adversos, como exemplo microrganismos não permitindo que esses fatores interfiram na avaliação dos embriões, portanto são aceitáveis diferenças de até 5% entre o teste de viabilidade e germinação. Fato este que pôde ser detectado no presente estudo.

Em resumo, pôde-se observar que houve redução da viabilidade das sementes com o aumento do potencial de inóculo, indicando que *Colletotrichum gloeosporioides* afetou a viabilidade das sementes em ambos os materiais estudados. Segundo Vieira e Pinho (1999), a atividade bioquímica e metabólica dos fungos pode influenciar a viabilidade das sementes, quando da interpretação do teste de tetrazólio.

### **3.5 Transmissibilidade**

A transmissão de *C. gloeosporioides* foi caracterizada pela passagem do patógeno associado às sementes para as plantas de café em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença. O cálculo da taxa de transmissão foi baseado na incidência (infecção) de *C. gloeosporioides* nos fragmentos retirados da região entre o caule e o cotilédono em relação ao número total de plantas sintomáticas e assintomáticas em relação à incidência de sementes infectadas no teste inicial de sanidade. A taxa de infecção do patógeno foi avaliada por meio da incubação de fragmentos de tecido das plantas em placa de Petri com meio de cultura MEA. A

detecção do patógeno nos fragmentos das plantas de café emergidas encontra-se na Figura 3.

A interação tripla entre material genético, tratamento e potencial de inóculo foi significativa tanto para taxa de infecção quanto para taxa de transmissão (Gráfico 8 e 9).

Para SOPSS não houve infecção nem transmissão nas testemunhas, enquanto para o isolado transformado e não transformado a infecção foi 10 e 11 %, e a transmissão foi 48,4 e 46,5%, respectivamente, iniciado em P2. A partir deste potencial houve aumento exponencial para infecção e linear para transmissão até o P4. Nesse último ponto os valores de infecção foram de 30 e 30,9% e os de transmissão foram de 85,7 e 88,2%%, para isolado sem e com transformação, respectivamente (Gráfico 8 A e 9 A).

Nas SOPCS o comportamento foi diferente ao anterior. A testemunha apresentou infecção de 10% e transmissão de 83,33% logo no P1. Com progresso linear, até atingir o máximo de 40% de infecção e 93,76% de transmissão. Para os isolados não transformados e transformados a infecção foi bem mais elevada que no caso de SOPSS com 20 e 40% de infecção e 91,6 e 51,2% de transmissão, respectivamente, logo no P1(Gráfico 8 B e 9 B). Pôde-se observar que os valores de percentagem da taxa de infecção (Gráfico 8) foram menores que os observados para taxa de transmissão (Gráficos 9), em todos os tipos de materiais genéticos, isolados, potenciais de inóculo. Os altos valores observados evidenciam que mesmo algumas plantas sem sintomas apresentaram o patógeno nos seus tecidos, uma vez que para o referido ensaio foram consideradas todas as plantas sintomáticas e assintomáticas, mostrando desta forma que matérias cujo fator de “susceptibilidade” esteja presente como é o caso de MOPCS, atenção mais rigorosa de vê ser tomada uma vez que problemas futuros possam vir a ocorrer e danos severos possam acabar com a cultura. E apesar dessa diferença de transmissão dos isolados, os dois apresentaram

correlação significativa, ou seja, os dois se comportaram de maneira semelhante tanto na percentagem de infecção quanto na transmissibilidade, mostrando aumento das duas variáveis à medida que se aumentou o tempo de exposição das sementes ao mesmo

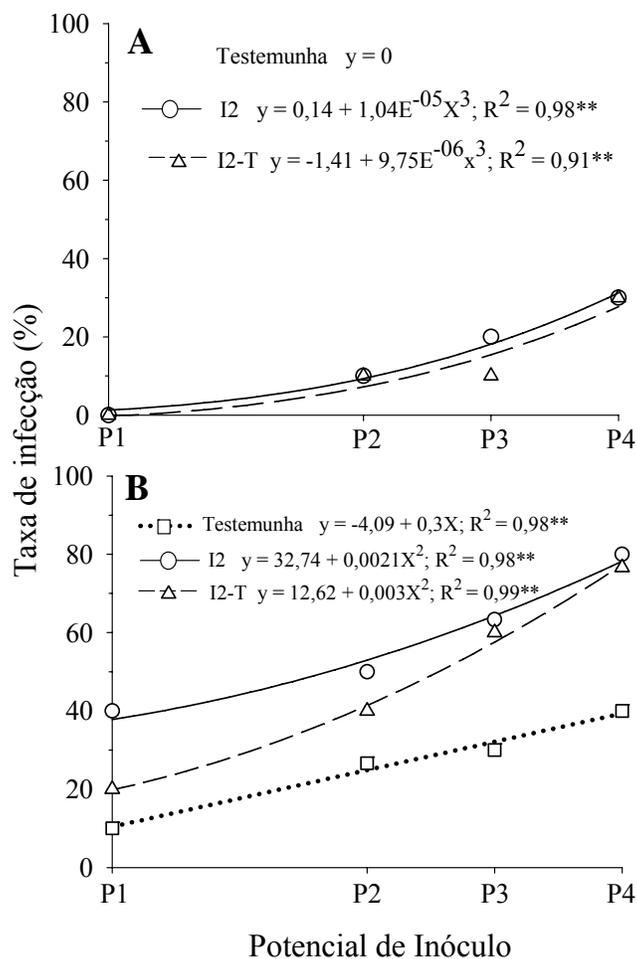


Gráfico 8 Taxa de infecção (TI) de *Colletorichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação genética (I2-T) em mudas de café em função dos diferentes tempos de exposição ao patógeno. A) mudas provenientes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa (MOPSS), e B) mudas provenientes de plantas com sintomas (MOPPCS) da mancha manteigosa

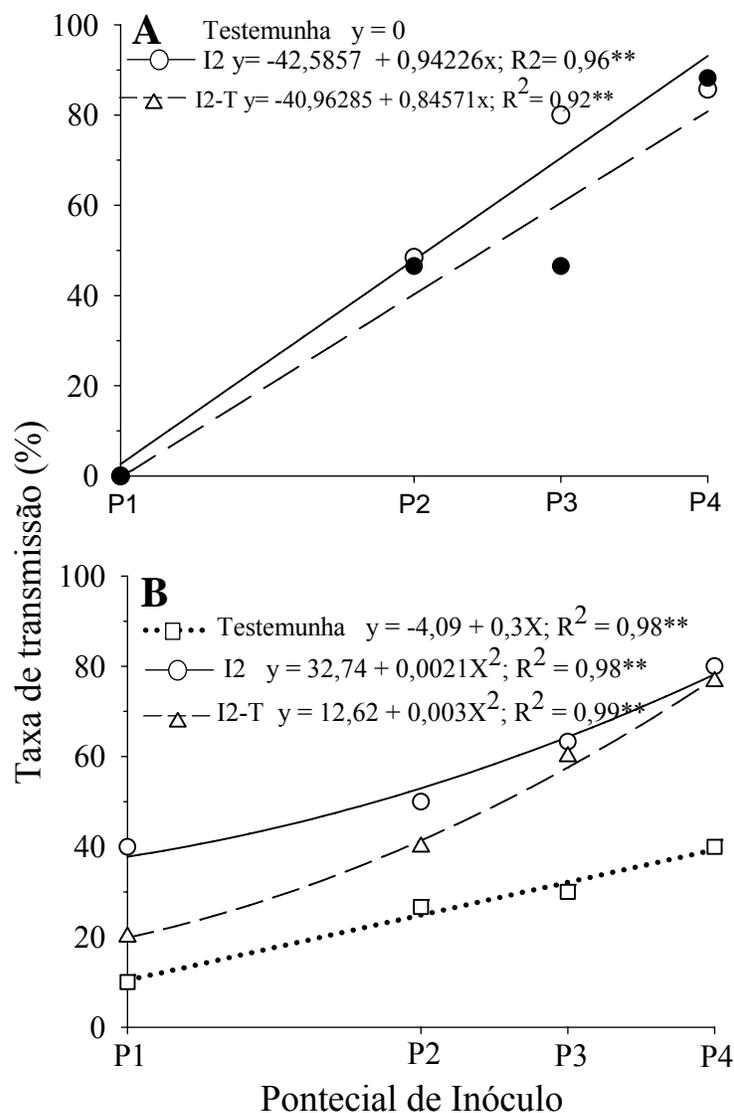


Gráfico 9 Taxa de transmissão (TT) de *Colletorichum gloeosporioides* sem (I2) e com transformação genética (I2-T) em mudas de café em função dos diferentes tempos de exposição ao patógeno. A) mudas provenientes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa (MOPSS), e B) mudas provenientes de plantas com sintomas (MOPPCS) da mancha manteigosa

Com base na literatura, vários fatores podem afetar os valores da taxa de transmissão do patógeno para a semente e no estabelecimento desta infecção, como por exemplo, a posição do mesmo na semente e sua intensidade. Diversos fatores físicos e biológicos tornam-se bastante variável este padrão de transmissão de patógenos por sementes, mesmo em se tratando de um único patógeno (MACHADO, 1988; NEERGAARD, 1979).

Como mencionado acima, as taxas de infecção e transmissão, avaliadas em fragmentos de plantas de café, foram maiores nos maiores tempos de exposição das sementes ao patógeno. Com isso, pode se dizer que a infecção dos tecidos pode estar diretamente relacionada com a quantidade de inoculo presente na semente. Segundo Talamini et al. (2002), as sementes são eficientes meio de disseminação de fitopatógenos, principalmente espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Os agentes etiológicos de doenças podem ser transportados em mistura, na superfície ou no interior de sementes e, em ambiente favorável, podem-se desencadear nos focos da doença (BAKER; SMITH, 1966; NEERGAARD, 1979; TALAMINI et al., 2002).

Diante dos resultados observados, presume-se que a transmissibilidade de *C. gloeosporioides*, a partir de sementes de café, é efetiva e pode refletir em maiores ou menores taxas de infecção e transmissão, dependendo do tempo em que estas ficam expostas a isolados desse patógeno. Em trabalhos semelhantes, porém, realizados com sementes de milho com *Acremonium strictum* e sementes de soja com *S. sclerotiorum*, Botelho (2011) e Teixeira e Machado (2003) observaram que a taxa de infecção assim com a de transmissão, avaliadas na parte aérea de plantas com 28 dias de idade, foi maior com o aumento do tempo de exposição das sementes ao patógeno. Resultados semelhantes para diferentes patossistemas também foram encontrados por Araujo (2008) e Barrocas (2008).

Alem do gráfico mostrado acima, a transmissão de *C. gloeosporioides* transformado fica evidenciada pela presença de fluorescência de colônias do

patógeno em placas de Petri, observadas em microscópio estereoscópico de fluorescência, em conídios retirados dessas placas e observados em microscópio de epifluorescência (Figura 2). Em tecidos de plantas infectadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura, pode-se verificar que, o micélio do patógeno no exterior de hipocótilos e no interior dos tecidos (Figura 3), demonstrando desta forma a presença do patógeno transformado nos tecidos de plantas de café, confirmando assim a necessidade de que a redução de inóculo primário do agente causal nas sementes seja realizada, haja visto que, a produção de mudas a partir de sementes infectadas, com toda a certeza esta diretamente relacionada ao aumento de focos a campo.

Com tudo que foi exposto, ficou evidenciado que esses isolados mantiveram a sua capacidade de infectar e causar danos e que a capacidade infectiva do isolado transformado (I2-T) com o marcador *gfp* neste estudo foi comparável à do isolado patogênico também chamado no presente estudo de I2. Este fato também já foi relatado em diversos trabalhos com *Colletotrichum destructivum* e *C. orbiculare*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* e *Rosellinia necatrix*, conforme relatos de Chen, Hsiang e Goodwin (2003), Nonomura et al. (2003), Oren et al. (2003) e Pliego et al. (2009), respectivamente. Outros autores também observaram que a capacidade infectiva dos fungos transformados foi mantida e equiparável aos isolados originais não transformados com esses marcadores (ARMESTO, 2010; PEDROZO, 2009; SIQUEIRA, 2009).

Em resumo, os resultados deste estudo tornam-se importantes para o processo de estabelecimento de padrões sanitários para patógenos como *C. gloeosporioides*, que são exigidos em programas de certificação. Assim, levando-se em consideração fatores, como genótipos do hospedeiro e potencial de inóculo, dentre inúmeros outros fatores que devem direcionar estes estudos, todas as condições estudadas mostraram risco para que ocorra uma epidemia da

doença em relação à quantidade de inóculo de sementes portadoras deste patógeno.

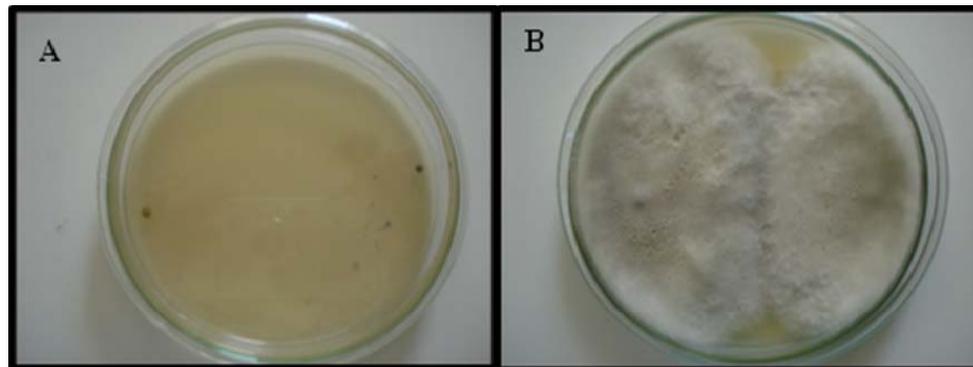


Figura 1 Fotografias mostrando a presença de *C. gloeosporioides* em fragmentos de plantas de café com 60 dias de idade. A) fragmentos de plantas saudáveis, B) fragmentos da região entre o caule e o cotilédono em plantas doentes

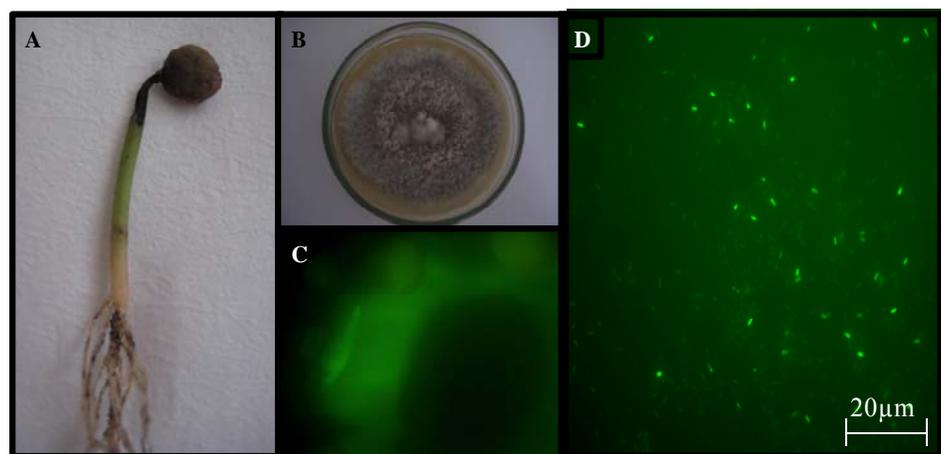


Figura 2 Imagens de planta com sintomas de *C. gloeosporioides* (A), Isolamento a partir de áreas com sintomas (B) Massa conidial observado em microscópio estereoscópico (C) e conídios retirados da massa conidial e observados em microscópio de epifluorescência (D).

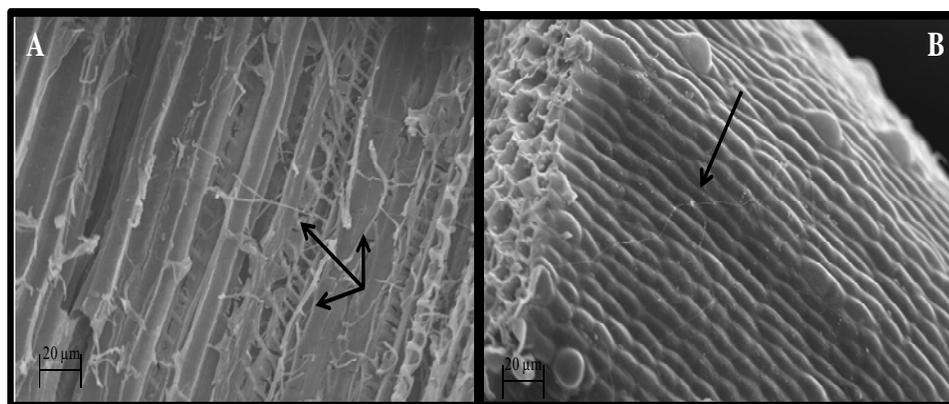


Figura 3 Eletromicrografia de varredura de plântulas de café após 144 de exposição à *C. gloeosporioide*. A) região interna do hipocótilo e B) região externa do hipocótilo. As setas na figura indicam crescimento micelial do patógeno.

#### 4 CONCLUSÃO

A presença de *Colletorichum gloeosporioides* tanto transformado quanto sem transformação na forma de micelial nas sementes de cafeeiro influenciou o desempenho fisiológico das mesmas de forma proporcional aos valores do potencial de inóculo do patógeno.

Na maior parte os isolados *C. gloeosporioides* comportarem-se de maneira semelhante diante dos parâmetros avaliados, dependendo ou independentemente do tipo de material genético.

A transmissibilidade de *C. gloeosporioides* com ou sem transformação por meio de sementes foi diretamente proporcional ao aumento do potencial de inóculo.

Considerando-se o risco de a taxa de transmissão nas condições estudadas atingir 100%, é compreensível sugerir tolerância zero deste patógeno em sementes de cafeeiro em programas de certificação de sementes no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC, 1997. 244 p.
- ARAÚJO, D. V. et al. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 35-40, jan./fev. 2006.
- ARMESTO, C. **Transformação genética de *Colletotrichum gloeosporioides* agente etiológico da mancha manteigosa em cafeeiro com o gene *gfp***. 2010. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- BAKER, K. F.; SMITH, S. H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 3, p. 311-334, 1966.
- BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de pcr, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas**. 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.
- BOTELHO, L. da S. de. **Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 156 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- BRACINI, A. de L. et al. Incidência de microorganismos em sementes de café robusta durante o armazenamento. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 305-315, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

CARVALHO, H. P. de. **Progresso da ferrugem e da cercosporiose em cultivares de cafeeiro sob cultivo orgânico e o efeito de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz na germinação e estabelecimento de plântulas**. 2011. 135 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*: revisão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 427-439, set./out. 2006.

\_\_\_\_\_. Fungos associados a sementes de milho produzidas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 370-373, jul./ago. 1998.

CASAROLI, D. **Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de abóbora variedade menina brasileira**. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 11, p. 802-805, Feb. 1994.

CHEN, N.; HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 113-122, Apr. 2003.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 197-202, abr./jun. 1993.

EIRA, M. T. S.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de alface: II., desempenho sob estresse hídrico salino e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 28-45, jan./mar. 1990.

FAVARINI, J. L. et al. Características da semente em relação ao seu potencial fisiológico e a qualidade de mudas de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 13-19, mar./abr. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.

FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: SIMPOSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. 1 CD-ROM.

FRANÇA NETO, J. de B.; HENNING, A. A. **DIACOM**: diagnóstico completo da qualidade de semente de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1992. 21 p. (Circular Técnico, 10).

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. de C.; VIEIRA, R. D. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2007.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Influência de *Fusarium graminearum* na germinação de genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 157-162, abr./jun. 2007.

HENRIQUE, D. F. et al. Inoculação de *Alternaria alternata* em sementes de melão através da restrição hídrica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 48., 2008, Maringá. **Anais...** Maringá: Associação Brasileira de Horticultura, 2008. 1 CD-ROM.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v. 246, n. 2, p. 42-44, 1993.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Proceedings International Seed Testing Association**, Vollebekk, v. 31, n. 1, p. 1-52, 1966.

KHAN, A. A.; ABAWI, G. S.; MAGUIRRE, J. D. Integrating matricconditioning and fungicidal of table beet seed to improve stand establishment and yield. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 1, p. 231-237, Jan. 1992.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LINS, S. R. de. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião**. 2006. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

MACHADO, J. da C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 95-101, mar./abr. 2001.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Apr. 1962.

MANTOVANELI, M. C. H. **Interferência de alguns fungos no teste de tetrazólio e de danos mecânicos, tratamento fungicida e do armazenamento na qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 173 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MARCO FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The MacMillan, 1979. 1191 p.

NONOMURA, T. et al. Distinguishable staining with neutral red for GFP-marked and GFPnonmarked *Fusarium oxysporum* strains simultaneously colonizing root surfaces. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, n. 1, p. 45-48, Jan. 2003.

OREN, L. et al. Early events in the *Fuzarium verticilloides*-Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1695-1701, Mar. 2003.

PEDROZO, R. **Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* com os genes marcadores *gfp* e *DsRed***. 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PEREIRA, R. B. **Potencial de óleos essenciais no manejo da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro**. 2008. 107 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PLIEGO, C. et al. GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 137-145, Feb. 2009.

SARTORI, S. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 456-458, abr. 2004.

SIQUEIRA, C. S. **Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores *gfp* e *DsRed* e patogenicidade dos transformados em sementes de milho**. 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SOUZA, M. V. **Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

TALAMINI, V. et al. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidas por sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 10, p. 219-248, 2002.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 40-46, fev. 1985.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANO, M. I. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 15, n. 6, p. 233-237, jul./dez. 1989.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1045-1052, set./out. 2003.

VARGAS, G. E.; GONZALES, U. L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 2, p. 129-135, 1972.

VIEIRA, M. das G. G. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).

VIEIRA, M. das G. G.; PINHO, E. V. R. von. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8-13.

### CAPITULO 3

#### **Reação de defesa de cafeeiro em resposta à invasão por *Colletotrichum gloeosporioides* não transformado e transformado com GFP**

#### **RESUMO**

Objetivou neste trabalho identificar reações de defesa de cafeeiro em resposta à invasão por *Colletotrichum gloeosporioides* não transformado e transformado com o gene *gfp* através da observação das alterações bioquímicas desenvolvidas por essas plantas e verificar se há alguma diferença no comportamento do patógeno após transformação. As mudas foram inoculadas com uma suspensão de  $2 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> pulverizada sobre folhas de cafeeiro, previamente feridas. Para as análises enzimáticas foram plotadas curvas de progresso da atividade das enzimas por tempo de coleta e para fenôis solúveis totais as médias, quando significativas pelo teste F, foram comparadas utilizando-se o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). Para a atividade da enzima peroxidase de guaiacol (POX) ambos os materiais estudados (MOPCS e MOPSS) a inoculação dos diferentes isolados (I2 e I2-T) induziu a atividade da POX, apresentando atividade superior ao observado no tratamento controle, mostrando que houve um possível reconhecimento do patógeno ao observar o aumento da atividade dessa enzima. Em relação à atividade da enzima polifenoloxidases (PPO), observou-se comportamento semelhante entre a testemunha e os isolados estudados para MOPSS nos diferentes tempos de exposição das mudas ao patógeno. Para MOPCS o maior pico da atividade enzimática ocorreu às 24 horas após inoculação com I2 ocorrendo decréscimo acentuado da atividade da mesma após esse tempo, já I2-T se comportou semelhantemente a testemunha em todos os tempos de exposição da planta ao patógeno. O tempo de exposição das plantas ao patógeno aumentou os teores de fenôis solúveis totais no caso de mudas obtidas de plantas sem sintomas da mancha manteigosa.

Palavras-chave: PR proteínas. Enzimas. Mancha manteigosa. *Coffea Arabica*.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to identify coffee defense reactions in response to invasion by wild type *Colletotrichum gloeosporioides* and transformed with *gfp* gene strains; to observe the biochemical changes developed by these plants and to verify the difference in behavior of the pathogen after transformation within plants. The plants were inoculated with a suspension of  $2 \times 10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ , and the suspension was sprayed on previously injured coffee leaves. For the enzymatic analysis, the sample collection times were used to plot enzyme activity progress curves and for total soluble phenols the averages were analyzed when they were significant by the F test subsequently they were compared using the Scott-Knott test ( $P \leq 0.05$ ). For the peroxidase (POX) enzyme activity both products (MOPCS and MOPSS), and the inoculation of different strains (I2 and I2-T) induced POX activity. The enzyme activity was significantly higher in the infected in comparison to the control plants, showing that there is a possible recognition of the pathogen. The polyphenol oxidase enzyme activity (PPO) showed the same trend, the strain I2 did not show significant enzyme production increase. The exposure of plants to the pathogen increased total soluble phenol levels in symptomless plants

Keywords: PR proteins. Enzymes. Blot spot. *Coffea arabica*.

## 1 INTRODUÇÃO

O complexo *Colletotrichum* no cafeeiro é composto por vários patossistemas, o que tem despertado interesse nas pesquisas para determinação da resistência. Trabalhos visando à determinação de mecanismos de defesa de plantas de café a esse patógeno podem ser realizados, principalmente, por meio de análises bioquímicas medindo-se a atividade das proteínas relacionadas à patogênese.

Uma das alternativas que tem propiciado uma melhor compreensão da interação de fungos fitopatogênicos com seu hospedeiro é a transformação desses patógenos com genes que possibilitem a sua rastreabilidade dentro dos tecidos e órgãos da planta (ZANETTE, 2007). Diversos genes marcadores têm sido empregados, dentre os quais os que codificam proteínas fluorescentes têm sido considerados ferramentas importantes, que revolucionaram a biologia celular principalmente no estudo de células vivas (FREITAG et al., 2004). O motivo pelo qual estes têm sido considerados excelentes marcadores moleculares, é que a visualização dos seus produtos não requer substratos ou cofatores e podem ser empregadas em qualquer organismo que possa ser geneticamente modificado (CZYMMEK; BOURETT; HOWARD, 2005; ISHIKAWA, 2009). O gene *gfp* que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) tem sido amplamente utilizado no estudo da interação entre plantas hospedeiras e microorganismos fitopatogênicos visando estudar a sua penetração, colonização e disseminação em vários fitopatógenos como: *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium virguliforme* (HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002).

Sabendo que a exposição das plantas a fatores do ambiente, como variações em temperatura, umidade e radiação, e a agentes biológicos, como fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e herbívoros, faz com que elas

necessitem reagir contra esses estresses, reconhecer a invasão e desenvolver diversos mecanismos de defesa elaborados contra a ameaça de ataque desses agentes (STASKAWICZ, 2001). A obtenção de *Colletotrichum gloeosporioides* transformado com o *gfp* pode ser um passo importante na elucidação de aspectos relevantes do referido patossistema.

Atualmente, está disponível uma série de estratégias utilizadas na obtenção de fungos transgênicos, podendo variar conforme o organismo utilizado, o objetivo do estudo e dos recursos disponíveis. Assim faz-se necessário a adequação destas técnicas a cada espécie estudada com a finalidade de se obter um processo eficiente de transformação.

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho identificar reações de defesa de cafeeiro em resposta à invasão por *Colletotrichum gloeosporioides* não transformado e transformado com o gene *gfp* através da observação das alterações bioquímicas desenvolvidas por essas plantas e verificar se há alguma diferença no comportamento do patógeno após transformação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado com mudas micropropagadas de café da cultivar Catuaí vermelho obtidas de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa inoculadas com 1 isolado de *C. gloeosporioides* transformado geneticamente pela técnica de GFP pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Diagnóstico em controle de Enfermidades Fúngicas da Universidade Federal de Lavras em 2011 e 1 isolado não transformado.

### 2.1 Obtenção de plantas a partir de cultura de tecido de embriões zigóticos

Frutos de café (*C. arabica*) de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa (Cultivar Catuaí vermelho), em estágio verde-cana, foram colhidos, lavados e desinfestados com álcool 70% durante 1 min., hipoclorito de sódio a 2% durante 15 min. e lavados três vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, com o auxílio de pinça, bisturi e lupa, os embriões foram excisados e depositados em tubos de ensaio com 15 ml de meio de cultura. Foi utilizado o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 1 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 300 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de giberelina com pH ajustado para 5,8 e solidificado com 6g.L<sup>-1</sup> de agar (RIBEIRO et al., 2003). As culturas de embriões foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±1 e fotoperíodo de 16 horas. Transferência das plântulas para outros tubos com o mesmo meio de cultura ocorreu a cada dois meses, até que estas plântulas estivessem aptas para a aclimação que foi feita conforme trabalho publicado por Carvalho et al. (1999). Plântulas com aproximadamente 2 a 3 cm de comprimento foram retiradas dos tubos de ensaio e transferidas para câmara de crescimento (ou fitotron), com aproximadamente

90% de umidade relativa do ar, temperatura média de 25°C, sistema de nebulização automático e iluminação natural.

Foi utilizado como substrato a vermiculita, sendo esta adicionada a bandejas de polipropileno com células de 11 x 5 x 5 cm. O fornecimento de nutrientes foi realizado semanalmente com a aplicação de 1mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) por plântula, iniciando no dia do plantio e estendendo-se até o período de inoculação.

## **2.2 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, cultura fúngica e concentração para inoculações**

Foram utilizados dois isolados de *C. gloeosporioides* (um transformado geneticamente (I2-T) e um não transformado (I2)) os quais foram anteriormente testados quanto a sua patogenicidade e selecionados quanto a sua virulência. Os mesmos foram mantidos e crescidos em meio de cultura MEA 2%. Suspensões de conídios foram então preparadas pela raspagem de conídios com auxílio de uma alça de Drigalsky e água destilada esterilizada (ADE) seguida pela filtragem em gaze esterilizada. A concentração utilizada para inoculação foi de  $2 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>, a qual foi calculada com o auxílio de uma lâmina de contagem (câmara de Newbauer).

## **2.3 Inoculações e coleta do tecido vegetal**

Nas inoculações foram empregados os dois isolados de *C. gloeosporioides* citados anteriormente e água destilada como testemunha. A inoculação foi feita com suspensão de conídio de  $2 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>, através da pulverização da suspensão de inoculo com o auxílio de um atomizador manual de 500 ml sobre as mudas de cafeeiros previamente feridas. Três dias antes da inoculação, estas plantas foram submetidas a condições de câmara

úmida, feita com o auxílio de sacos plásticos e mantidas em casa de vegetação à temperatura de 25°C acrescidos de <sup>+</sup>. 2. Os ferimentos foram feitos com o auxílio de agulhas entomológicas posicionadas a 0,5 mm eqüidistantes totalizando uma área de 1,3 cm de diâmetro, para garantir a melhor penetração do patógeno no tecido foliar. Após inoculação as mudas foram mantidas em casa de vegetação, sendo que nas primeiras 24 horas após a inoculação as mesmas foram submetidas a uma nova câmara úmida feita com o auxílio de sacos plásticos.

Foram realizadas coletas de toda a muda da parcela sendo utilizadas duas mudas /repetição/ tempo de exposição ao patógeno (6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação). Durante as coletas, as mudas foram protegidas com papel alumínio e colocadas em isopor contendo nitrogênio líquido e levadas ao Laboratório onde foram acondicionadas em freezer a -80° até a preparação dos extratos para a realização das análises enzimáticas.

### 3 ANÁLISES BIOQUÍMICA

#### 3.1 Extração e determinação das atividades da peroxidase de guaiacol (POX), polifenoloxidase (PPO) e proteína total (PT)

Primeiramente os tecidos vegetais foliares foram macerados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 2,0 g desse pó foram depositados em um tubo, no qual foi adicionado o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 (10,0 mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizado por 10 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos (4°C). Em seguida, o sobrenadante foi retirado, colocado em microtubos plásticos e utilizado como fonte enzimática, sendo armazenado a -80 °C para posteriores análises.

A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), ajustada para 10 µL do extrato enzimático, conforme ensaio de Bradford (1976).

A atividade de peroxidase de guaiacol foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático, 20 µL de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,2) e ajustado para 200 µL de solução contendo 473 µL do tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,2), 500 µL de guaiacol (20 mM) e 500 µL peróxido de hidrogênio (60 mM). Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 480 nm.

A atividade de polifenoloxidase (PPO) foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução contendo 473 µL de tampão fosfato de sódio (50 mM pH 5,2), e 527 µL de catecol (50 mM). Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 410 nm. Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

### **3.2 Preparo de tecidos foliares para a determinação do conteúdo de fenóis solúveis totais**

Os tecidos vegetais foliares coletados às 48 horas (2 dias) após inoculação foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação de lignina solúvel como descrito a seguir.

Em microplacas, alíquotas de 15 µL do extrato metanólico foram misturadas a 15 µL de metanol 80% e a 30 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N, por 5 minutos, homogeneizadas com 30 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, por 10 minutos e diluídas com 110 µL de água destilada, à temperatura ambiente, por uma hora.

Os valores de absorbância desta reação foram determinados, a 725 nm, em espectrofotômetro EIA compatível e calculados com base em curva de ácido clorogênico. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente micrograma de ácido clorogênico por miligrama de massa seca (SPANOS; WROLSTAD, 1990).

### **3.3 Análise dos dados**

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 3 x 4 {(2 tipos de mudas: obtidas de sementes de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa, 2 isolados de *C. gloeosporioides* -1 transformado e 1 sem

transformação + 1 testemunha, inoculada com água) e 4 períodos de exposição das mudas aos isolados de *C. gloeosporioides* (6, 12, 24 e 48 horas) – coletas} em DBC com 4 repetições constituídas de 2 plântulas cada. As médias, quando significativas pelo teste F, foram comparadas utilizando-se o teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ) por meio do programa Sisvar<sup>®</sup> 5.1 (FERREIRA, 2000).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividades da peroxidase de guaiacol (POX) e polifenoloxidase (PPO)

Houve interação significativa entre material genético x tratamento e entre o tratamento e o tempo de exposição das plantas à *C. gloeosporioides* para a atividade da POX. Em ambos os materiais genéticos estudados (Mudas obtidas de plantas com sintomas - MOPCS e Mudas obtidas de plantas sem sintomas - MOPSS) a inoculação dos diferentes isolados de *C. gloeosporioides*, (I2 e I2-T) induziu a atividade da POX, apresentando atividade superior ao observado no tratamento controle (Testemunha - Inoculação com água (Tabela 1), mostrando que houve um possível reconhecimento do patógeno ao observar o aumento da atividade dessa enzima.

Tabela 1 Atividade da Peroxidase de guaiacol (POX) em mudas de caféiro obtidas de plantas com (MOPCS) e sem (MOPSS) da mancha manteigosa inoculadas com *C. gloeosporioides* sem (I2) e com transformação genética (I2-T).

Tratamento	MOPSC	MOPCS
I2	3.65 Aa	3.48 Aa
I2-T	3.46 Aa	2.25 Bb
Testemunha	0.84 Ba	0.67 Ca
CV(%)	37,58	

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

O pico máximo da atividade dessa enzima foi às 6 horas após inoculação com I2-T e as 48 horas após inoculação com o I2 entretanto, pôde se observar que nas primeiras horas após inoculação com I2 teve um incremento maior na atividade enzimática em relação ao I2-T, o que pode ser atribuído a processos de adesão (por meio de tubos germinativos) e infecção mais tardios em relação ao I2 (Gráfico 1). Fato este que foi confirmado por Shiraishi et al. (1995), trabalhando com *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (raça 1) patogênica, e *Erysiphe pisi*, não patogênica, ressalva a importância do tubo germinativo primário para o processo de infecção e a influência nos níveis da POX, por meio da tentativa de penetração desses tubos, em tecidos hospedeiros.

As peroxidases são fundamentais na defesa de plantas contra os patógenos e relatadas na literatura como sendo induzidas por fungos, bactérias, vírus e viroides (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Os papéis dessas enzimas na defesa de plantas é o fortalecimento da parede celular como a formação de lignina, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, ou seja, proteção celular contra reações oxidativas e aumento na produção das fitoalexinas (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999). A atividade dessa enzima é freqüentemente aumentada em resposta ao ataque de fitopatógenos (ANTEROLA; LEWIS, 2002). Seguindo o mesmo raciocínio dos autores citados anteriormente, Pimenta, Bloch e Rasmussen (2004) ressaltam que fatores ambientais tais como ataque de insetos, infecções de microrganismos, alterações fisiológicas e danos mecânicos, provocam uma rápida deterioração, pois uma vez rompida a membrana celular, ocorre um maior contato entre as enzimas e os compostos químicos presentes intra e extra-celular no tecido, provocando dessa forma reações químicas que modificam a composição original do mesmo.

Neste contexto, acredita-se que a atividade da POX observada tenha ocorrido devido ao dano ocasionado na membrana pelo contato (ataque) do patógeno com o tecido vegetal.

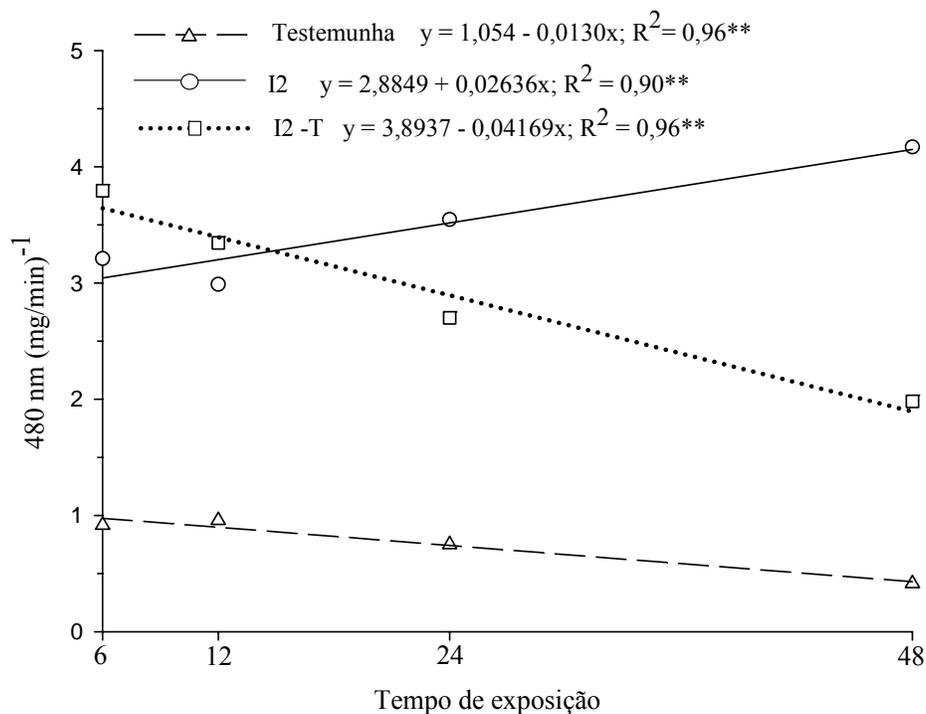


Gráfico 1 Atividade da peroxidase de guaiacol em folhas de café, após inoculação (HAI) com *C. gloeosporioides* não transformado e transformado em função do tempo de exposição ao patógeno

Em relação à atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), observou-se diferenças estatísticas isoladamente para tratamento e tipo de material genético. O tempo de exposição das plantas ao patógeno tanto I2-T quanto I2, não influenciou na quantidade de PPO tanto em MOPCS quanto em MOPSS não diferindo estatisticamente da testemunha.

Em MOPCS, foram observados maiores picos enzimáticos de PPO quando comparadas a MOPSS (Tabela 2). Assim como para POX, acredita-se

que a atividade da PPO observada tenha ocorrido devido ao dano ocasionado na membrana pelo ataque do fungo ao hospedeiro (pico de polifenoloxidase). Além disso, pode-se dizer que a infecção ocasionada pelo fungo pode ocasionar a explosão oxidativa e o acúmulo desses compostos fenólicos tanto em relações compatíveis quanto incompatíveis, como observado no presente estudo, pois em plantas as quais possuem o fator de “susceptibilidade” (MOPCS) os picos desta enzima foram maiores que em plantas sem tal fator (MOPSS).

Tabela 2 Atividade da polifenoloxidase em folhas de cafeeiro, provenientes de mudas obtidas de plantas de sem (MOPSS) e com sintomas (MOPCS) da mancha manteigosa, após inoculação (HAI) com *C. gloeosporioides* não transformado e transformado.

<b>Material genético</b>	<b>Atividade da PPO (mg/min)</b>
MOPSS	0.133625 B
MOPCS	0.180750 A
CV(%)	68,20

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $P \leq 0,05$ ).

O isolado tanto transformado, quanto sem transformação se comportaram de maneira distinta a testemunha, mostrando que o reconhecimento do patógeno interferiu no aumento da atividade dessa enzima. (Gráfico 2).

Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro Júnior et al. (2006), onde no patossistema *V. dahliae* – Cacaueiro, com aplicação do ASM (0,2 g/L) seguido por inoculação do patógeno induziu um aumento na atividade de PPO quando comparado com a testemunha. Altos picos desta enzima também

foram relatados por Ogoshi (2011) e Vieira (2009), trabalhando com plantas de café inoculadas artificialmente com *C. gloeosporioides*.

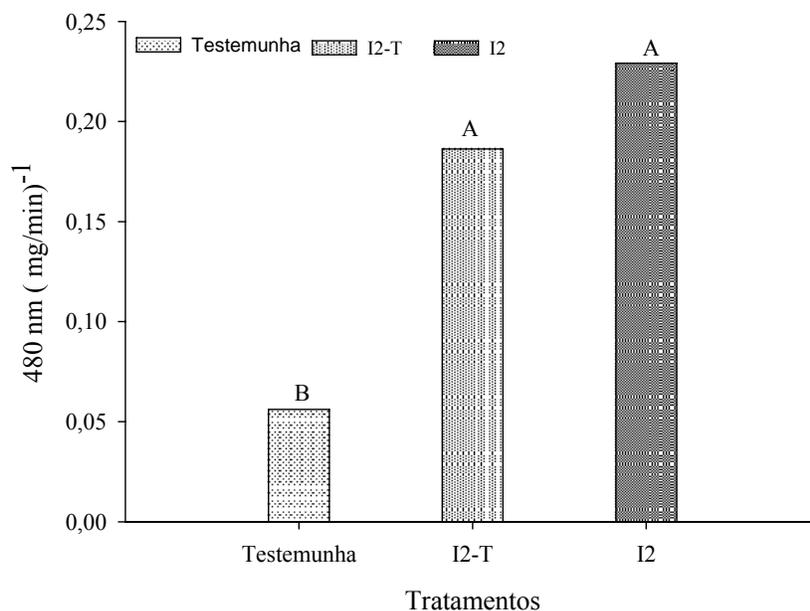


Gráfico 2 Atividade da polifenoloxidase em folhas de cafeeiro, após inoculação (HAI) com *C. gloeosporioides* não transformado e transformado.

De acordo com os resultados observados nos testes enzimáticos pode se concluir que, mesmo após passar pelo processo de transformação genética o fungo *C. gloeosporioides* não perde sua capacidade de se manifestar no hospedeiro e ser percebido pelo mesmo, fazendo com que os resultados de percepção de sinais sejam efetuados e que os mecanismos de defesa da planta sejam desenvolvidos.

#### 4.2 Determinação do conteúdo de fenóis solúveis totais

O tempo de exposição das plantas ao patógeno tanto I2-T quanto I2, não influenciou nos teores de fenóis totais em MOPCS não diferindo estatisticamente da testemunha. A distribuição e a localização dos fenóis nas plantas não são conhecidas claramente. Observa-se, no entanto, que as quantidades variam de acordo com os órgãos, a idade, o estágio de desenvolvimento das plantas e as condições climáticas (SALGADO, 2004). Portanto, a não observação desses compostos nos tecidos de MOPCS pode estar relacionado à idade da planta, pois as mesmas eram bem novas com as folhas ainda não totalmente expandidas. Pois segundo Salgado et al. (2008) folhas novas possuem menores teores de fenóis totais quando comparadas as folhas mais velhas. No caso de MOPSS observou-se, para os tratamentos (I2-T e I2), maiores teores de fenóis solúveis totais, que testemunha às 48 horas após inoculação. (Gráfico 3). A síntese desses compostos é considerada parte de um mecanismo efetivo de resposta, podendo ter um papel na expressão ativa da resistência de plantas a patógenos. Diante do observado os resultados obtidos no presente estudo corroboram com Nicholson e Hammerschmidt (1992), os autores afirmam que o aumento da síntese de várias substâncias fenólicas com atividade antimicrobiana tem sido detectado em plantas, em resposta ao tratamento com indutores de resistência ou à presença de patógenos potenciais como é o caso de *C. gloeosporioides*, sendo que o rápido acúmulo desses compostos pode resultar em um confinamento efetivo do patógeno no sítio de infecção.

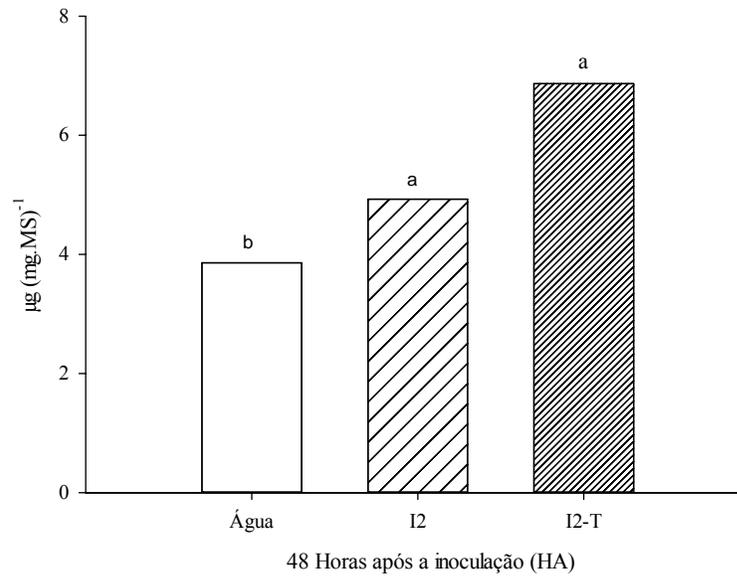


Gráfico 3 Teores de fenóis solúveis totais  $\mu\text{g (mg MS)}^{-1}$ , em folhas de caféiro provenientes de mudas obtidas de plantas sem (MOPSS) sintomas da mancha manteigosa, 48 horas após inoculação (HAI) com *C. gloeosporioides* não transformado e transformado)

Mais estudos devem ser realizados para elucidar o efeito desse patógeno na ativação de repostas de defesa em caféiro, uma alternativa pode ser feita em aumentando o tempo entre a inoculação e a coleta do material e, na verificação dos sintomas provocados pelos isolados.

## 5 CONCLUSÃO

*C. gloeosporioides* transformado geneticamente não perde sua capacidade de se manifestar no hospedeiro e ser percebido pelo mesmo em mudas obtidas de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa, ativando desta forma os mecanismos de defesa da mesma. O tempo de exposição das plantas ao patógeno aumentou os teores de fenóis solúveis totais em mudas obtidas de plantas sem sintomas da mancha manteigosa.

## REFERÊNCIAS

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct. 2002.

ARAÚJO, D. V. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasifectum* em algodoeiro**. 2008. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, G. R. et al. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, jul./set. 1999.

CZYMMEK, K. J.; BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. Fluorescent protein probes in fungi. In: \_\_\_\_\_. **Microbial imaging**. London: Elsevier, 2005. p. 27-41.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FREITAG, M. et al. *Gfp* as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 10, p. 897-910, Oct. 2004.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 249 p.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use the green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 92, n. 7, p. 743-749, July 2002.

ISHIKAWA, F. H. **A função das anastomoses entre conídios na recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum***. 2009. 159 p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptiles peroxidases: purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 2, p. 501-512, June 1999.

LOON, L. C. van; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, Sept. 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, 1962.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.

OGOSHI, C. **Fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de plantas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PIMENTA, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Peroxidases: purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 2, p. 501-512, June 2004.

RIBEIRO, L. S. et al. Desenvolvimento in vitro de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1479-1483, dez. 2003. Edição especial.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. et al. Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 629-636, jul./ago. 2006.

SALGADO, P. R. **Fenóis totais no cafeeiro em razão das fases de frutificação e do clima**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2004.

SALGADO, P. R. et al. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 4, p. 354-359, 2008.

SHIRAIISHI, T. et al. Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (race 1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, n. 1, p. 153-162, 1995.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July 1990.

STASKAWICZ, B. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 73-76, Jan. 2001.

VIEIRA, J. F. **Quimioterapia e termoterapia no controle do *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa, em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ZANETTE, G. F. **Caracterização fenotípica e tentativa de obtenção de fase sexuada em *Colletotrichum sublineolum***. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo de café no Brasil e no mundo, ao longo dos últimos anos, embora venha apresentando um crescimento dos mais expressivos, com produções recordes alcançadas em sucessões, encontra-se, de certa forma, ameaçado em termos de sustentabilidade, pela ocorrência de algumas doenças. Entre elas a mancha manteigosa, causada por *C. gloeosporioides*, vem tomando proporções. Um dos principais fatores atribuídos ao aumento da incidência dessa doença em áreas de cultivo tem sido o uso de sementes contaminadas, sendo isso devido ao uso de material sem previa certificação e também sem o controle da qualidade sanitária recomendado.

Os estudos sobre relação de patógenos com sementes, envolvendo alguns patossistemas de interesse no Brasil, têm sido escassos e, na maioria das vezes, pouco conclusivos, principalmente pelo fato de pesquisadores utilizarem metodologias distintas. É importante ressaltar que este tipo de conhecimento é de extrema importância por várias razões, dentre elas, a necessidade de estabelecimento de padrões sanitários em programas de certificação de qualidade de sementes.

Neste contexto, vale a pena ressaltar os poucos estudos vêm sendo realizados em relação à população de *Colletotrichum* em cafeeiros. Sabe-se que cepas patogênicas convivem com as saprofíticas, e não se manifestam de forma epidêmica em condições do Sul de Minas Gerais.

Diante destas colocações, a necessidade de estudos envolvendo tal patossistema, torna-se uma realidade que passa a constituir uma das mais importantes prioridades dos programas de apoio à pesquisa no país.

A condução de trabalhos de pesquisa relacionados a tal doença como foi proposto em diversos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório de Diagnóstico e controle de enfermidades fúngicas da Universidade Federal de

Lavras e principalmente no presente estudo, tem, portanto o intuito principal esclarecer pontos importantes do referido patossistema como, por exemplo, algumas dúvidas no que tange aos mecanismos de transmissão do patógeno em relação à semente, buscando desta forma determinar as taxas de infecção e transmissão do patógeno por esta via além de avaliar os mecanismos envolvidos na defesa de plantas de café à presença de *C. gloeosporioides*.

Mediante os resultados encontrados no presente estudo, fica evidenciado o enorme potencial de uso do marcador protéico, tipo GFP, lembrando que o mesmo poderá ser de grande utilidade em estudos de interação do patógeno com os seus hospedeiros, já na fase inicial de infecção, poderá ser mais bem acompanhada e compreendida proporcionando, assim, informações das mais valiosas para o estabelecimento de estratégias de controle e manejo deste tipo de doença de forma preventiva. Atualmente, há uma grande dificuldade de se estabelecer taxas de transmissão de patógenos por sementes, principalmente em casos que os sintomas da doença não são claros nas etapas iniciais dos cultivos em condições de campo como é o caso de *Colletotricum gloeosporioides* – mancha manteigosa. Por meio dessa ferramenta, será possível acompanhar a trajetória desse fungo a partir de sementes infectadas, independente da formação ou não de sintomas da doença em estudo, e desta forma elucidar pontos importantes sobre o referido patossistema, que ainda estão obscuros.

De modo geral, os resultados desta pesquisa propiciam bases adicionais importantes ao conhecimento atual da interação *C. gloeosporioides* x sementes de cafeeiro, fazendo com que a elaboração de programas de controle desta doença seja fortalecida, principalmente pela diagnose preventiva de seu agente causal e pelo manejo sanitário das sementes.

Como sugestões para futuras pesquisas, citam-se: verificar o efeito de extratos metabólicos de isolados de *C. gloeosporioides* (MM) aplicados em plântulas; estudar mais detalhadamente por meio de estudos bioquímicos e

anatômicos as possíveis reações dos sintomas típicos em folhas e se há efeito de resistência ou suscetibilidade no material vegetal pela expressão dos sintomas cloróticos observados em folhas; monitoramento dos eventos de pós-penetração do agente pela técnica de GFP e avaliação da transmissibilidade do patógeno não de sementes planta como foi feito neste estudo, mas, também de semente-planta-semente.

## ANEXOS

### ANEXO A

(Siglas utilizadas)

- Material genético – MG
- Potencial de inóculo – PI
- Tratamento – T
- Tempo de exposição - TP
- Graus de liberdade – GL
- Soma dos quadrados – SQ
- Quadrado médio – QM
- Fator de correção – FC
- Coeficiente de variação - CV

## ANEXO B

Tabela 1 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de cafeeiro em função do potencial de inóculo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr > Fc
MG	1	6733	6733	2708.44	0.0000**
T	2	3555	1777	714.87	0.0000**
PI	3	424	141	56.87	0.0000**
M.G x T	2	91	45	18.26	0.0000**
M.G x PI	3	152	51	20.32	0.0000**
T x PI	6	109	18	7.28	0.0000**
M.G x T x PI	6	33	5	2.18	0.0541 <sup>NS</sup>
Erro		179	2		
CV(%)			10,07		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 2 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de germinação de sementes de cafeeiro em função do potencial de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr > Fc
MG	1	4676	4676	88.52	0.0000**
T	2	1688	844	15.98	0.0000**
PI	3	7454	2485	47.04	0.0000**
M.G x T	2	129	64	1.21	0.3016 <sup>NS</sup>
M.G x PI	3	931	310	5.87	0.0012**
T x PI	6	641	107	2.02	0.0735 <sup>NS</sup>
M.G x T x PI	6	91	15	0.28	0.9419 <sup>NS</sup>
Erro		3803	53		
CV(%)			28,64		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 3 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de plântulas infectadas em função do potencial de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr > Fc
MG	1	47.460938	47.460938	31.945	0.0000**
T	2	8.661458	4.330729	2.915	0.0609 <sup>NS</sup>
PI	3	8.507813	2.835938	1.909	0.1362 <sup>NS</sup>
M.G x T	2	0.109375	0.054688	0.037	0.9639 <sup>NS</sup>
M.G x PI	3	13.341146	4.447049	2.993	0.0367*
T x PI	6	11.484375	1.914063	1.288	0.2742 <sup>NS</sup>
M.G x T x PI	6	11.744792	1.957465	1.318	0.2611 <sup>NS</sup>
Erro	69	102.513021	1.485696		
CV(%)			111.97		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 4 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de sementes mortas em função do potencial de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr > Fc
MG	1	457.190104	457.190104	31.217	0.0000**
T	2	529.640625	264.820313	18.082	0.0000**
PI	3	1726.070313	575.356771	39.286	0.0000**
M.G x T	2	24.223958	12.111979	0.827	0.4416 <sup>NS</sup>
M.G x PI	3	70.361979	23.453993	1.601	0.1970 <sup>NS</sup>
T x PI	6	193.234375	32.205729	2.199	0.0533 <sup>NS</sup>
M.G x T x PI	6	36.067708	6.011285	0.410	0.8697 <sup>NS</sup>
Erro	69	1010.533854	14.645418		
CV(%)			29,98		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 5 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de índice de velocidade de emergência de sementes de cafeeiro em função do potencial de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
MG	1	1.877	1.87	28.00	0.0000**
T	2	0.043	0.02	0.32	0.725 <sup>NS</sup>
PI	3	2.455	0.81	12.20	0.0000**
M.G x T	2	0.030	0.01	0.22	0.799 <sup>NS</sup>
M.G x PI	3	0.341	0.11	1.69	0.176 <sup>NS</sup>
T x PI	6	0.653	0.10	1.62	0.154 <sup>NS</sup>
M.G x T x PI	6	0.315	0.05	0.78	0.586 <sup>NS</sup>
Erro		4.693	0.06		
CV(%)			46,70		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 6 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de estande inicial em função do potencial de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
MG	1	6.773438	6.773438	10.162	0.0022**
T	2	44.755208	22.377604	33.572	0.0000**
PI	3	33.736979	11.245660	16.871	0.0000**
M.G x T	2	0.296875	0.148438	0.223	0.8009 <sup>NS</sup>
M.G x PI	3	3.028646	1.009549	1.515	0.2184 <sup>NS</sup>
T x PI	6	41.411458	6.901910	10.355	0.0000**
M.G x T x PI	6	0.619792	0.103299	0.155	0.9874 <sup>NS</sup>
Erro	69	45.992188	0.666553		
CV(%)			112,77		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 7 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste estande final em função do potencial de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
MG	1	15567.773438	15567.773438	2492.454	0.0000**
T	2	13791.140625	6895.570313	1104.005	0.0000**
PI	3	22642.445313	7547.481771	1208.378	0.0000**
M.G x T	2	139.328125	69.664063	11.153	0.0001**
M.G x PI	3	1519.716146	506.572049	81.104	0.0000**
T x PI	6	3642.484375	607.080729	97.196	0.0000**
M.G x T x PI	6	531.213542	88.535590	14.175	0.0000**
Erro	69	430.971354	245962		
CV(%)			5,89		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 8 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de viabilidade (Tetrazólio) de sementes de cafeeiro em função do potencial de inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
MG	1	425	425.0	147.841	0.0000**
T	2	693	346.6	120.547	0.0000**
PI	3	3883	1294.2	450.169	0.0000**
M.G x T	2	82	40.8	14.178	0.0000**
M.G x PI	3	81	26.8	9.338	
T x PI	6	33	5.4	1.890	0.0941 <sup>NS</sup>
M.G x T x PI	6	84	14.1	4.893	0.0000**
Erro		207	2.9		
CV(%)			6,35		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 9 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de Infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em fragmentos de plantas de café retirados da região entre o caule e o cotilédone em função dos períodos de exposição ao patógeno.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
MG	1	30472	30472	18704	0.0000**
T	2	9851	4925	3023	0.0000**
PI	3	13004	4334	2660	0.0000**
M.G x T	2	1250	625	383	0.0000**
M.G x TP	3	1963	654	401	0.0000**
T x TP	6	2142	357	219	0.0000**
M.G x T x TP	6	471	78	48	0.0000**
Erro	72	117	1		
CV(%)			4,75		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 10 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados do teste de transmissão de *Colletotrichum gloeosporioides* em fragmentos de plantas de café retirados da região entre o caule e o cotilédone em função dos períodos de exposição ao patógeno.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
MG	1	72581	72581	6049	0.0000**
T	2	14096	7048	5874	0.0000**
PI	3	19682	6560	5468	0.0000**
M.G x T	2	13993	6996	5831	0.0000**
M.G x TP	3	4067	1355	1130	0.0000**
T x TP	6	8552	1425	1188	0.0000**
M.G x T x TP	6	5751	958	798	0.0000**
Erro	72	8638	1199		
CV(%)			1,82		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 11 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da peroxidase de guaiacol em mudas de cafeeiro em função dos períodos de exposição à *Colletotrichum gloeosporioides*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
T	2	133.04	66.52	81.89	0.0000**
TP	3	2.59	81.89	1.065	0.3695 <sup>NS</sup>
MG	1	6.44	0.86	7.933	0.0063*
T x TP	6	20.18	6.44	4.141	0.0013*
T x MG	2	9.45	3.36	5.818	0.0045*
TP x MG	3	6.70	4.72	2.751	0.0488*
M.G x T x TP	6	8.66	2.23	1.778	0.1157 <sup>NS</sup>
Erro	72	58.48	1.44	0.812320	
CV(%)			37,58		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.

Tabela 12 Resumo da análise de variância (quadrados médios) para os resultados da atividade da polifenoloxidase em mudas de cafeeiro em função dos períodos de exposição à *Colletotrichum gloeosporioides*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
T	2	0.51	0.25	22.60	0.0000**
TP	3	0.08	0.02	2.59	0.0592 <sup>NS</sup>
MG	1	0.05	0.05	4.63	0.0346*
T x TP	6	0.10	0.01	1.53	0.1790 <sup>NS</sup>
T x MG	2	0.03	0.01	1.67	0.1944 <sup>NS</sup>
TP x MG	3	0.04	0.01	1.27	0.2907 <sup>NS</sup>
M.G x T x TP	6	0.05	0.00	0.80	0.5691 <sup>NS</sup>
Erro	72	0.82	0.01		
CV(%)			68.20		

\*Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.\*\*Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F. <sup>NS</sup> não significativo.