

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,
BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM
Coffea arabica L.**

MOAB DIANY DIAS

2002

55893
17/11/047885

MOAB DIANY DIAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E
PATOGENICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM
Coffea arabica L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

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

Dias, Moab Diany

Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de
Colletotrichum spp. em *Coffea arabica* L. / Moab Diany Dias. -- Lavras : UFLA,
2002.

64 p. : il.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. *Colletotrichum*. 3. Patogenicidade. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

MOAB DIANY DIAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E
PATOGENICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM
Coffea arabica L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

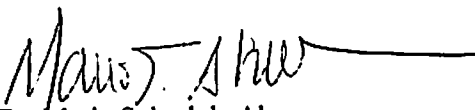
APROVADA em 22 de fevereiro de 2002

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

UFLA

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA


Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Excelência do Amor

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine.

Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, não sou nada.

O amor jamais acabará. As profecias desaparecerão, o dom das línguas cessará, o Dom da ciência findará. A nossa ciência é parcial, a nossa profecia imperfeita. Quando chegar o que é perfeito o imperfeito desaparecerá.

(Cor. 13)

Ao professor e amigo Erich Collicchio,

OFEREÇO.

Aos meus pais, Divino e Marta, ao meu irmão Dierry, e as minhas sobrinhas Eliab e Cecília.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, razão de nossa existência.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização deste curso.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Mario Sobral de Abreu pela orientação e amizade.

Aos professores Dr. Edson Ampélio Pozza e Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Edin Orozco Miranda, pela amizade e colaboração, e ao Igor Pereira de Souza bolsista de iniciação científica, pela dedicação.

A Florisvalda da Silva Santos, Cristiano de Souza Lima, Karina Pereira Campos e Alcides Militão Júnior, pela amizade, apoio e companheirismo.

Enfim, agradeço a todos que, no anonimato, contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Nomenclatura e classificação.....	3
2.2 Doenças em <i>Coffea arabica</i> causadas por <i>Colletotrichum</i>	4
2.2.1 Doença da baga do café (CBD).....	6
2.2.2 Antracnose, die-back e queima castanha.....	8
2.2.3 Mancha Manteigosa.....	9
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO 2- Caracterização morfológica, bioquímica e estudo do efeito da temperatura no crescimento micelial, capacidade de esporulação e germinação conidial de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em <i>Coffea arabica</i> L.....	16
1 RESUMO.....	17
2 ABSTRACT.....	18
3 INTRODUÇÃO.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Obtenção dos isolados.....	21
4.2 Avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial dos isolados de <i>Colletotrichum</i>	22
4.3 Dimensões dos conídios.....	23

4.4 Teste de utilização de tartarato e ácido cítrico como fonte exclusiva de carbono.....	24
4.5 Efeito de diferentes temperaturas no crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial.....	25
5.2 Características culturais e reprodutivas dos isolados.....	26
5.3 Dimensões dos conídios.....	29
5.4 Teste bioquímico para separação de espécies de <i>Colletotrichum</i>	30
5.5 Efeito de diferentes temperaturas no crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial de <i>Colletotrichum</i>	32
6 CONCLUSÕES.....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO 3- Avaliação da patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. Em <i>Coffea arabica</i> L.....	42
1 RESUMO.....	43
2 ABSTRACT.....	44
3 INTRODUÇÃO.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Obtenção dos isolados.....	47
4.2 Obtenção de plântulas pela metodologia de pré-germinação e inoculação de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.....	48
4.3 Obtenção de plântulas por meio de cultura de tecidos (cultura de embrião) e inoculação de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Teste de patogenicidade em plântulas obtidas por pré-germinação.....	54

5.2 Teste de patogenicidade em plântulas obtidas por meio de cultura de tecidos (cultura de embrião).....	56
6 CONCLUSÕES.....	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63

RESUMO

DIAS, Moab Diany. Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp em *Coffea arábica* L. 2002. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Fitopatologia da UFLA, no período de dezembro de 2000 a janeiro de 2002. No estudo foram avaliados nove isolados e teve como objetivos: 1) caracterizar morfológica e bioquimicamente isolados de *Colletotrichum* spp. Provenientes de folhas, ramos e frutos de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa e seca de ponteiros; 2) estudar o efeito de diferentes temperaturas no comportamento dos isolados de *Colletotrichum* spp; 3) realizar teste de patogenicidade em plântulas de cafeeiro (*Coffea arábica* L.). As características avaliadas na caracterização morfológica e no estudo de diferentes temperaturas dos isolados foram: índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação, porcentagem de germinação dos conídios, dimensão dos conídios, coloração das colônias e formação de estruturas reprodutivas. No teste bioquímico observou-se a capacidade dos isolados em metabolizar tartarato e ácido cítrico como fontes exclusivas de carbono. Os testes de patogenicidade foram efetuados em plântulas de cafeeiro obtidas por meio de pré-germinação e de cultura de tecidos. As características morfológicas dos isolados caracterizados e os resultados do teste de metabolização de tartarato de amônio e o teste de patogenicidade sugerem ser *Colletotrichum gloeosporioides* o agente causal da Mancha manteigosa.

Comitê orientador: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)
Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA

ABSTRACT

DIAS. Moab Diany. Morphological, biochemistry and pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. in *Coffea arabica* L. 2002. 64p. Dissertation (Master of Science in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The present work was carried out in the department of Phytopathology of UFLA, during the period of December, 2000, to January, 2002. In this trial were assessed 9 isolated and the objectives were: 1) the morphologic and biochemistry characterization of *Colletotrichum* spp. isolated from branches, leaves and fruits of coffee with symptoms of Blister spot and tip blight; 2) to study the effect of different temperatures in the behavior of the *Colletotrichum* isolates; 3) As pathogenic test in coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) The characteristics evaluated in the morphologic characterization and in the study of different temperatures on behavior of the isolates were: mycelial growth speed index, sporulation capacity, percentage of conidia germination, conidia measurements, colony color and formation of reproductive structures. The isolate capacity of metabolize tartaric and citric as exclusive source of carbon was observed. The pathogenic tests were made in coffee seedlings obtained from pre-germination seeds and of tissue culture. The morphologic characteristics and the results of the test with tartaric and citric acid as exclusive source of carbon and the pathogenic test suggests to be *Colletotrichum gloeosporioides* the causal agent of the Blister spot.

Comitê orientador: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)
Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum*, encontra-se amplamente distribuído em todas as regiões produtoras de café do mundo. Ocorre como saprófita ou causando enfermidades como: antracnose, morte regressiva, mancha manteigosa e doença da baga do café (CBD), (Carrillo & Zambrano, 1994).

No Quênia e em outros países da África, a antracnose do café, conhecida como coffee berry disease (CBD) é o principal fator limitante à produção dos cafeeiros. Nesses países, essa doença pode causar perdas de até 50% da produção (Griffiths et al., 1971).

Todas as espécies de cafeeiros são suscetíveis à antracnose. Dentre elas, a suscetibilidade é maior em *Coffea canephora* Pierre e *C. arabica* L. (Pereira & Chaves, 1978).

O primeiro relato do fungo foi feito por Noak, em 1901, que o classificou como *Colletotrichum coffeanum* Noak (Pereira & Chaves, 1978). A importância da antracnose nos cafezais brasileiros é bastante discutida. Alguns relatos de sintomas que poderiam estar relacionados ao CBD são descritos na literatura: Bitancourt (1958) em São Paulo; Mansk & Matiello (1977), em regiões do Espírito Santo e Dorizzotto & Abreu (1993), no município de Cristais, MG.

Doenças que ainda não ocorrem no Brasil ou cuja importância não se encontra bem elucidada, devem ser ainda estudadas. Esses estudos visam à proteção do parque cafeeiro, pela aplicação de medidas preventivas à sua introdução ou a ocorrência de epidemias explosivas (Chalfoun, 1998).

A identificação correta do patógeno, principalmente aqueles que com grande potencial de risco para a cultura, é o primeiro passo no estudo de uma

nova enfermidade. Evita-se assim, erro, tanto em diagnóstico como nas medidas de controle a serem adotadas.

Diante desse fato, o estudo detalhado do agente causal da mancha manteigosa e de outros que ocasionam sintomas de antracnose e seca de ponteiros, é de grande importância para a cafeicultura brasileira. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: 1) caracterizar morfológica e bioquimicamente isolados de *Colletotrichum* spp; 2) comprovar a patogenicidade de isolados provenientes de folhas com sintoma de mancha manteigosa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nomenclatura e classificação

A descrição original de *Colletotrichum* em café foi feita por Noak em 1901, referente a um isolado proveniente do Brasil, o qual denominou de *Colletotrichum coffeanum* (Noak, 1902). Em 1922, no Quênia, o micologista Mac Donald relatou a variante “virulans” de *Colletotrichum* em café, associada a “coffee berry disease” (CBD), diferenciando da denominação original onde o CBD não existe (Waller et al., 1993).

Uma gama de diferentes raças de *Colletotrichum* spp. pode ser encontrada associada ao café. Elas podem ser separadas em grupos, com base na morfologia dos isolados monospóricos. Gibs (1969) definiu quatro grupos de *Colletotrichum*, isolados de frutos verdes e cerejas, em cafeeiros no Quênia. Com base na morfologia de suas colônias em extrato malte ágar (MEA), esses grupos são: a) ccm: crescimento rápido, micélio aéreo claro, com conídios crescendo diretamente das hifas; b) cca: crescimento rápido, micélio aéreo claro, com conídios curtos e presença de acérvulos; c) ccp: crescimento lento, micélio aéreo rosado com conídios crescendo diretamente das hifas; d) CBD ou variante “virulans”: com crescimento lento, micélio de coloração cinza-escuro a verde-oliva, com setas raramente presentes.

Por meio de estudos das características culturais de cepas de *Colletotrichum* spp. isoladas de cafeeiro no Quênia, Hindorf (1970), citado por Waller et al. (1993), classificou o grupo ccp como *C. acutatum* Simmonds. Os grupos ccm e cca foram classificados como formas de *C. gloeosporioides* Penz. e o grupo CBD ou variante “virulans”, como *C. coffeanum* Noack. Além desses, foram identificados dois novos grupos: 1) *C. gloeosporioides* Penz: micélio inicialmente branco, tornando-se cinza esverdeado e, posteriormente, marrom;

conídios cilíndricos, arredondados nas duas extremidades, às vezes recurvados, de tamanho maior que as formas de *C. gloeosporioides* descritas anteriormente; presença da forma peritecial, *Glomerella cingulata*, em meio de cultura; crescimento lento em meio de cultura; 2) *Glomerella cingulata* (Stonem.) Sapuld e Srenk: micélio ocasionalmente branco, estéril; formando peritécios em cultura; restrita a ramos e folhas; crescimento rápido em meio de cultura.

A nomenclatura atual do agente etiológico da CBD, divide-se da seguinte maneira: o nome *C. Coffeanum* não é usado como referência para *C. gloeosporioides* e o nome *C. coffeanum* var. *virulans* não é válido para publicação. O nome do agente da CBD é *C. kahawae* (Waller et al., 1993).

2.2 Doenças em *Coffea arabica* causada por *Colletotrichum*

Espécies de *Colletotrichum* estão presentes em todos os órgãos do cafeeiro: frutos em todos os estádios, folhas e hastes maduras. O grupo CBD pode ser encontrado em todos os órgãos do hospedeiro em diferentes proporções, sendo em maior proporção nos frutos. Raramente infectam folhas novas e são menos frequentes em hastes quando comparado com as outras espécies saprofíticas de *Colletotrichum*. *C. acutatum*, apesar de ser encontrado em todos os órgãos do cafeeiro, não é patogênico a cafeeiro arábica. A espécie de *C. gloeosporioides* coloniza hastes e folhas, mas algumas vezes cresce também em frutos mumificados já infectados pelo CBD (Hindorf, 1975).

Vários autores relatam que a ocorrência da estirpe patogênica do fungo é relativamente baixa em relação ao complexo da população de *Colletotrichum* em ramos de cafeeiros, ela restringe-se aos tecidos da casca ainda esverdeados, amarelados e pardacentos, na parte dos ramos produtivos mais próximos à extremidade apical (Vermeulen, 1970; Gibbs, 1969). (FIGURA 1A).



FIGURA 1. Sintomas causados por *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L. A) seca de ponteiros; B) Coffee Berry disease; C e D) Mancha manteigosa. UFLA, lavras, MG, 2002.

A forma peritecical do fungo *Glomerella cingulata* é relatada apenas em casca de ramos e em folhas. Porém, estudos realizados por Hocking, Johannis e Vermeulen (1967) constataram a presença, em baixa porcentagem, de peritécios férteis em frutos verdes de café incubados durante cinco semanas em câmara úmida, apresentando 7% de infectividade em frutos verdes, quando inoculados sem fermento. Este fato foi observado também por Foucart (1961).

A presença da forma perfeita do fungo restrita aos ramos foi reafirmada por Vermeulen (1970), que classificou-o de baixa virulência. Esse trabalho permitiu concluir que *Glomerella cingulata* não constitui perigo na disseminação da doença no Quênia, onde a CBD é bem disseminada. Contudo, pode ser importante em países como o Brasil, onde não foi constatada a presença de CBD (Rosseti, Feichteberger & Feitosa, 1975).

2.2.1 Doença da baga do café (*Coffee Berry Disease*)

A primeira informação da raça virulenta de *C. coffeanum* foi dada pelo micologista Mac Donald, em outubro de 1922, em um distrito do Quênia, Sotik, na parte oeste do país. De acordo com tais informações, a severidade foi pequena, mas suficiente para o abandono da cultura do café em algumas localidades. Entretanto, Butler (1918) já havia encontrado o patógeno causando antracnose nas folhas e manchas em frutos maduros em cafeeiro no sul da Índia (Nutman & Roberts, 1960).

Por volta de 1950, a doença estabeleceu-se nas principais áreas produtoras de café do oeste africano (Nutman, 1970). Até 1961, ficou restrita aos cafezais localizados acima de 1.900m. Esse comportamento foi alterado e a doença atingiu também cafezais abaixo de 1.900m de altitude (Brows & Cocheme, 1969, citados por Pereira e Chaves, 1978). A doença já foi relatada em vários países africanos, como Zaire, Camarões, Ruanda, Uganda, Tanzânia,

Etiópia e, mais recentemente foi confirmada em Malawi, Zimbabwe e Zâmbia, em, 1985 (Waller, 1987).

A baixa taxa de progresso espacial da doença contrasta com a rápida taxa da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Os esporos de *Colletotrichum kahawae* são disseminados principalmente pela chuva, mas podem também ser dispersos por material infectado, vetores passivos, como pássaros, homem e implementos agrícolas e por sementes provenientes de frutos infectados (Massaba & Waller, 1992). A quantidade de inóculo está relacionada com o número de bagas doentes que apresentam esporulação e não com a capacidade de esporulação do fungo em casca madura. Esse potencial de inóculo, subsequente desenvolvimento da doença e perdas no campo são intensificados pela presença de poucas bagas doentes, sendo provenientes do topo das plantas as mais importantes, durante a epidemia da doença (Waller, 1972). Condições necessárias para a germinação do conídio foram determinadas em laboratório por Nutman e Roberts (1960). A germinação só ocorre na presença de molhamento foliar; a temperatura ótima está em torno de 22°C e deve persistir por, no mínimo, cinco horas para ocorrer o início da infecção.

Colletotrichum kahawae, quando cultivado várias vezes em meio artificial, apresenta colônias que se tornam indistintas morfológicamente de espécie do grupo de *C. gloeosporioides* (Sutton, 1992). Com base nessas observações, Hocking, Johanns e Vermeulen (1976) afirmam que o CBD era apenas um segregante de *Glomerella cingulata*. Porém, Massaba & Waller (1992) afirmam não existir evidência da forma perfeita do patógeno *C. kahawae*.

O fungo ataca todos os estádios da cultura, desde a floração até frutos maduros e, ocasionalmente folhas. Mas, as maiores perdas ocorrem com a infecção de bagas verdes. Podem ser observados dois sintomas nas bagas: lesões ativas (Nutman, 1970) e lesões tipo “sarna” ou inativas (Muller, 1970). As lesões ativas começam com pequenas lesões deprimidas escuras, as quais se

espalham rapidamente até cobrir a superfície total da baga. Em condições de alta umidade, uma massa rosada de esporos é produzida na superfície da lesão. O fungo penetra no interior da baga e destrói as sementes, deixando os frutos vazios, ressecados e mumificados (FIGURA 1B). Lesões tipo sarna normalmente são pálidas, apenas levemente deprimidas e com anéis concêntricos de acérvulos pretos. Esporulam lentamente e, embora possam desenvolver lesões ativas quando as bagas amadurecem, esse tipo de lesão não afeta o crescimento das bagas em desenvolvimento e não tem efeito detectável no campo (Massaba & Waller, 1992).

2.2.2 Antracnose, die-back e queima castanha

A antracnose em folhas de cafeeiro foi caracterizada por Roger (1953), como manchas irregulares de coloração castanha a castanha-acinzentada, grandes, ocorrendo comumente nas margens das folhas. Com o envelhecimento das manchas formam-se anéis concêntricos, nos quais a massa de esporos do fungo é visível; peritécios têm sido encontrados em folhas doentes (Hindorf, 1975).

No Quênia, o sintoma de die-back foi descrito por Hindorf (1975), iniciando com queima das folhas próximas às extremidades dos ramos secundários, com posterior morte e queda. Em seguida, os internódios verdes dos ramos novos tornam-se necróticos e, em câmara úmida, apresentavam massa de conídios. Em alguns casos, podem ser encontrados nos tecidos mortos peritécios de *Glomerella cingulata*. As bagas verdes apresentam amadurecimento precoce e não desenvolvem sementes sadias.

Além desse tipo comum de die back, existem outras formas causadas por *C. gloeosporioides* Penz. O ataque de fungos sobre as folhas novas da ponta dos ramos pode causar o chamado *Elgon die back* (Nutman, 1970). De acordo

com D'Souza (1971), inicia-se uma prematura, súbita e parcial abscisão das folhas nas partes novas e suculentas da planta. Em seguida, a lesão progride em direção ao tecido vascular, originando uma murcha repentina e o colapso do ramo. Cerca de 74 a 96 horas após ocorre a morte dos ponteiros. Essa morte do ponteiro é paralisada nos nós quando ocorre queda de temperatura, afetando até oito internódios. Sobre eles o fungo forma, na superfície, acérvulos que, em condições favoráveis, liberam conídios. Posteriormente, as formas saprofíticas formam peritécios de *Glomerella cingulata* (Nutman, 1970).

O termo *Brown blingh* (queima castanha) é usado no leste africano para plantas atacadas por *Colletotrichum* em áreas infectadas pelo CBD. Suas características são lesões escuras, deprimidas, em bagas maduras ou em processo de maturação. É incapaz de atacar bagas verdes e, em alguns casos, observa-se a presença de peritécios (Höcking, 1996). Segundo o mesmo autor, infecções similares foram postuladas por Rayner (1948) como parte de um mecanismo de conversão de queima castanha para CBD, sem, entretanto, evidências experimentais. Nutman e Roberts (1960) mencionam que este agente causal não é o mesmo da CBD.

2.2.3 Mancha manteigosa

A doença foi descrita pela primeira vez em *Coffea arabica*, em 1957, por Wellman, na Costa Rica, suspeitou-se inicialmente de natureza virótica, mas sem conseguir demonstrar sua transmissão. Os sintomas foram descritos como manchas circulares de 2 a 6 mm de diâmetro, não necróticas, de coloração verde claro a amarelo, ligeiramente deprimidas e menos brilhante que a superfície normal da folha (FIGURA 1C e 1D). Quando há muitas lesões na folha, ocorre um encrespamento, flacidez e queda prematura das folhas. Nos frutos, as lesões são menores, não necróticas, segundo Mansk & Matiello (1977).

Segundo Biachini (1960), desde sua aparição na Costa Rica, como medida de controle, eliminou-se todas as plantas doentes. Apesar disso, surgiram novos casos e uma maior incidência no Valle Central, principal região produtora de café na Costa Rica. Vargas & Gonzalez (1972), iniciaram o estudo da doença, obtiveram resultados positivos quando inocularam suspensão de esporos de *Colletotrichum* em frutos e folhas derivados de parentais doentes. Progenies de plantas sadias F1, obtidas de cruzamentos de plantas sadias e doentes, não apresentaram sintomas. Devido a isso, os pesquisadores sugeriram haver um caráter genético que condiciona a suscetibilidade à enfermidade.

Em 1977, no Estado do Espírito Santo, Mansk & Matiello detectaram a ocorrência de mancha manteigosa. Nestas condições, os ataques mais intensos foram observados nas folhas e ramos novos em plantas adultas, apesar de terem sido constatados sintomas em mudas ainda no viveiro. Os cafezais atacados apresentavam desfolha e seca progressiva dos ramos, da extremidade para a base; as brotações novas foram atacadas, causando a morte prematura das plantas. Verificou-se maior incidência durante a estação quente e chuvosa, quando há intensas brotações nas plantas. A partir de isolamentos de lesões novas de folhas, ramos e frutos, foram obtidas colônias típicas de *Colletotrichum*.

Aviles et al. (1983) relataram a ocorrência da mancha manteigosa na região norte fluminense. Foi constatado grau intermediário do ataque do patógeno em lavoura de "conilon" de cinco anos de idade. Os autores propuseram uma escala de resistência de plantas: imune, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível. Acrescentam que a quantidade de cada um dos tipos é variável entre as diversas lavouras, predominando, porém, as do tipo moderadamente suscetível e suscetível.

Dorizzotto & Abreu (1990) constataram, em lavouras cafeeiras do município de Cristais, MG, ataque de *Colletotrichum*, que causava manchas



da mancha manteigosa e morte dos cafeeiros. As manchas, de formato circular, localizavam-se na parte ventral das folhas, em cor verde-claro, com diâmetro de 3-5mm. Geralmente, no centro destas lesões circulares desenvolviam-se áreas necróticas em cor marrom claro. (Dorizzotto, 1993b)

Por meio de estudos sobre a morfologia e patogenicidade do referido isolado, Dorizzotto (1993a) concluiu ser o isolado agente causal da mancha manteigosa, com algumas características morfológicas iguais ao CBD, mas não se tratando da variante “virulans” encontrada nos países africanos. O isolado foi identificado utilizando-se técnicas biológicas, como *Colletotrichum coffeanum* Noak, confirmada pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e pelo Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Holanda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILES, D.P. et al. Diversos graus de resistência do café Conilon à mancha manteigosa em condições de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1983, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1983. p.317.
- BEYNON, S. M. et al. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, n.6, p.457-470, 1995.
- BIANCHINNI, C. Informe resumido sobre la mancha mantecosa, chasparria y ojo de gallo del café en Costa Rica. **Café**, Turrialba, v.2, n.5, p.29-34, 1960.
- BITANCOURT, A. A. As manchas das folhas do cafeeiro. **Biológico**, v.24, n.10, p.191, 1958.
- CARRILLO, M. M. ; ZAMBRANO, C. Identificación y patogenicidad de cepas del genero *Colletotrichum* asociados al cultivo en la región centro occidental de Venezuela. **Agronomía Tropical**, v.44, n. 4, p.567-577, 1994
- CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 93p.
- DORIZZOTTO, A. **Caracterização Morfológica e Patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1992. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.306, 1993a. Suplemento.
- 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**, v.18, p.285, 1993b.

D'SOUZA, G.I. Studies on a die back of Arabica coffee in South India: Role of pest and parasitas. **Turrialba**, San Jose, v.21, n.2, p.146-148, Apr./June 1971.

FOUCART, G. Shedding et coffee berry disease du caféier arabic. **Review of Applied Micology**, Fanham Royal, v.40, p.120, Jan.1961.

GIBBS, J.N. Inoculum sources for coffe berry disease. **Annals of Applied Biology**, v.64, p.515-522, 1969.

GRIFFITHS, E.; GIBBS, J.N.; WALLER, J. M. Control of coffe berry disease. **Annals of Applied Biology**, v.67, p.45-77, 1971.

HINDORF, H. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: **Journal of Coffee Research**, Karanataka, v.5, n.3/3, p.43-46, 1975.

HOCKING, D. Brown blight (*Colletotrichum coffeanum* Noack) of arabica coffee in East Africa. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.58, p.409-421, 1966.

HOCKING, D. et al. Ascospore production, discharge and infection by *Glomerella cingulata* causing coffee berry discasc. **Nature**, London, v.214, n.5093, p.1144-1145, June 1967.

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

MASSABA, D.; WALLER, J.M. Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum* – biology, pathology and control. Wallingford, UK: CBA International, 1992. p.237-249.

MULLER, R.A L. Evolution de l' anthracnose des baies du caféier d'arabic (*Coffea arabica* L.) due a une forme du *Colletotrichum coffenum* Noack du Cameron. **Café Cacao Thé**, Paris , v.14, n.2, juin 1970.

NECHET, K.L. Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 1999. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n.1, jan. 1902.

NUTMAN, F. J. Coffee berry disease. *PANS*, v.16, n.2, p.277, June 1970.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noack; I. Some factors affecting by the pathogen. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v.43, n.3, p.489-505, 1960.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F.M. Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noak; I. Some factors affecting by the pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, v.26, p. 409-432, 1988.

PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Antracnose do cafeeiro. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.4, n.44, p.82-90, 1978.

RAINER, R.W. Latent infection in *Coffea arabica* L. *Nature*, v.161 n.4085, p.245-246, Feb. 1948.

ROSSETI, V. et al. A doença dos frutos de cafeeiro denominada "Coffee Berry Disease" (CBD) – revisão bibliográfica. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.42, p.265-284, 1975.

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

VARGAS, E.; GONZALEZ, L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. *Turrialba*, v.22, n.2, 1972.

VERMEULEN, H. Coffee Berry Disease in Kenia. I. *Colletotrichum* spp. colonizing the bark of *Coffea arabica* L. II. The role of *Glomerella cingulata* in the *Colletotrichum* population colonizing the bark of *Coffea arabica* L. *Netherlands Journal Plant Pathology*, Wageningen, v.76, p.277-284;285-292, 1970.

WALLER, J. M. Water-borne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, v.71, p.1-18, 1972.

WALLER, J. M. Coffee berry disease: current status and recent developments. *Review of Tropical Plant Pathology*, v.4, p.1-33, 1987.

WALLER, J. M.; BRIDGE, P.D.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, v.97, n.8, p.989-994, 1993.

CAPÍTULO 2

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E ESTUDO DO
EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL,
CAPACIDADE DE ESPORULAÇÃO E GERMINAÇÃO CONIDIAL
DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM *Coffea arabica* L.**

1 RESUMO

DIAS, M.D. Caracterização morfológica, bioquímica e estudo do efeito da temperatura no crescimento micelial, capacidade de esporulação e germinação conidial de isolados de *Colletotrichum* spp. EM *Coffea arabica* L. In: _____. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L. 2002. p.17-41. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.***

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Fitopatologia da UFLA, no período de dezembro de 2000 a janeiro de 2002, tendo como objetivos: 1) caracterizar morfológica e bioquimicamente isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de folhas, ramos e frutos de cafeeiro com sintomas de Mancha Manteigosa e seca de ponteiros; 2) estudar o efeito de diferentes temperaturas no comportamento dos isolados de *Colletotrichum*. As características avaliadas na caracterização morfológica e no estudo de diferentes temperaturas no comportamento dos isolados foram: índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação, porcentagem de germinação dos conídios, coloração das colônias e formação de estruturas reprodutivas. Em relação às características morfológicas, os isolados apresentaram alta variabilidade quanto à coloração e produção de estruturas reprodutivas, dentre outras. Os isolados avaliados no teste bioquímico, em relação à capacidade de metabolização de tartarato e ácido cítrico como fonte exclusiva de carbono, apresentaram o mesmo comportamento. Observando-se o efeito da temperatura, os isolados apresentaram comportamento diferenciado na velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e na formação de estruturas reprodutivas. Os resultados sugerem que todos isolados são pertencentes à espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, com exceção para o isolado I-7, que provavelmente, pertence à espécie *C. acutatum* Simmonds.

Orientador: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)
Ludwig Pffening - UFLA

2 ABSTRACT

DIAS, M.D. Morphologic and biochemistry characterization and study the effect of different temperatures in the Growth mycelial, sporulation capacity, percentage of conidia germination of isolates of *Colletotrichum* spp. in *Coffea arabica* L. In: _____. **Morphologic, biochemistry and pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. in *Coffea arabica* L.** 2002. p. 17-41. Dissertation (Master of Science in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The present work was carried out in the Phytopathology Department of UFLA, during the period of December, 2000 to January, 2002. The objectives were: 1) the morphologic and biochemistry characterization of *Colletotrichum* spp. isolated from branches, leaves and fruits of coffee with symptoms of blister spot and tip blight.; 2) To study the effect of different temperatures in the behavior of the *Colletotrichum* isolates. The characteristics evaluated in the morphologic characterization and in the study of different temperatures on behavior of the isolates were: growth mycelial speed index, sporulation capacity, percentage of conidia germination, colony color and formation of reproductive structures. The morphologic characteristics of isolates presented high variability, between their color and production of reproductive structures. The tartaric acid biochemical test with exclusive source of carbon showed the same behavior for the isolates. Assessed the temperature effect, the isolates presented behavior differentiated in the speed of growth mycelial, sporulation capacity and in the formation of reproductive structures. The results suggest that every isolated are belonging the species *Colletotrichum gloeosporioides*, with exception for the isolated I-7, that probably belongs the species *C. acutatum* Simonds.

Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Advicer),
Ludwig Pffening - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Colletotrichum* ocorrem como saprófitas e parasitas em quase todas as regiões do mundo onde se cultiva café. Elas causam enfermidades, como antracnose das folhas, morte regressiva, queima de frutos, mancha manteigosa e doença da baga do café (CBD). Destas enfermidades, a CBD é a mais importante e se encontra disseminada em vários países do continente africano, causando danos alarmantes (Carrillo & Zambrano, 1994).

A descrição original de *Colletotrichum* em café foi feita por Noack em 1901, referente a um isolado proveniente do Brasil, o qual denominou de *Colletotrichum coffeanum* (Noack, 1902). Em 1922, no Quênia, McDonald relatou a variante “virulans” de *Colletotrichum* em café, associada à raça que ocasionava CBD, diferenciando da denominação original onde o CBD não existe (Waller et al., 1993).

O fungo *Colletotrichum kahawae*, agente causal de CBD, pode ser distinguido das demais espécies que colonizam partes aéreas do cafeeiro e pelas suas características culturais, bioquímicas e patogênicas.

Massaba & Waller (1992) citam que isolados de *Colletotrichum kahawae* podem ser distinguidos de outras espécies saprofitas de *Colletotrichum*, por apresentarem coloração micelial cinza esverdeado cotonoso em extrato de malte ágar, além de patogenicidade em hipocótilos de plântulas e em frutos verdes. No entanto, após várias repicagens da cultura, os isolados tendem a reverter a coloração para branco, tornando-se indistintas de formas saprofitas de *Colletotrichum*. Mais recentemente, o Instituto Internacional de Micologia, Inglaterra, estabeleceu distinções bioquímicas para *C. Kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, sendo as duas últimas espécies consideradas como saprófitas .

O presente trabalho teve por objetivos caracterizar morfológica e bioquimicamente isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de vários locais de Minas Gerais, associados com sintomas de mancha manteigosa em folhas, ramos e frutos e seca de ponteiros. Também propôs-se estudar o efeito de diferentes temperaturas no índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial, cor das colônias e presença de estruturas reprodutivas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas e no de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, no período de dezembro de 2000 a janeiro de 2002.

4.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum*

Os materiais foram provenientes de diferentes localidades de Minas Gerais (TABELA 1).

TABELA 1. Isolados de *Colletotrichum spp.* contemplados na caracterização morfológica e cultural: procedência, sintomas e parte da planta onde foram associados. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Isolado	parte da planta	sintoma	localidade
I-1	folha	mancha manteigosa	Lavras, MG
I-2	folha	mancha manteigosa	Piumhi, MG
I-3	folha	seca de ponteiros	Santo Antônio, MG
I-4	fruto	seca de ponteiros	Santo Antônio, MG
I-6	ramo	mancha manteigosa	Lavras, MG
I-7	ramo	assintomática	Lavras, MG
I-8	folha	assintomática	Nepomuceno, MG
I-9	folha	mancha manteigosa	Nepomuceno, MG
I-10	ramo	mancha manteigosa	Nepomuceno, MG

O isolamento foi realizado utilizando-se fragmentos de folhas, ramos e frutos. Primeiramente, foram lavados em água e detergente. Posteriormente, foram passados em álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 1% por trinta segundos, lavados em água destilada e esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado. A seguir, foram colocados em placas de 9cm de diâmetro contendo, em média, 20 mL de meio de cultura MEA 2% (extrato de malte ágar) e acondicionadas em BOD a 25°C a um fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

As colônias foram repicadas para novas placas e, após sete dias de crescimento retirou-se conídios para obter culturas monospóricas. Sendo mantidas em frascos de vidro (4x1 cm) contendo água destilada e esterilizada em temperatura ambiente (Castellani, 1937).

4.2 Avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial dos isolados de *Colletotrichum* spp.

O inóculo dos isolados de *Colletotrichum* oriundos de culturas monospóricas foram colocado em placas contendo, em média, 20mL de meio MEA 2%, a uma temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas durante sete dias.

Foram avaliados nove isolados de *Colletotrichum* e para a avaliação do crescimento micelial, fez-se a medição, a cada 24 horas, do diâmetros das colônias em posição ortogonal durante sete dias a partir do momento de inoculação, obtendo-se sete leituras. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por isolado. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado pela seguinte fórmula utilizada por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

D_a= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

Para determinar a capacidade de esporulação dos isolados, fez-se suspensão de conídios, com a mesma quantidade de água por placa (2mL). Posteriormente, procedeu-se à contagem do número de esporos em câmara de Newbauer. Em relação à porcentagem de germinação conidial, uma alíquota de 50µL foi colocada em lâmina escavada para microscopia e mantida em BOD a 25°C. Após um período de 24 horas, procedeu-se à leitura, contando-se, em média cem conídios em três repetições por lâmina e por isolado. Outra característica observada foi a cor das colônias em meio MEA, com sete dias de idade.

Após trinta dias, foram observadas algumas características reprodutivas e de sobrevivência dos isolados, tais como: forma perfeita, acérvulos e escleródios.

Os dados obtidos foram submetidos ao programa SISVAR, para a análise de variância utilizando o teste de significância Scott Knot (0,01p).

4.3 Dimensões dos conídios

Os conídios foram obtidos de culturas monospóricas, desenvolvidos em meio MEA 2% a 25°C, e medidos com o auxílio de um micrômetro ocular de tambor de Huyghens, mediu-se trinta conídios por isolado.

As características observadas foram: comprimento e largura em micra, a relação comprimento/largura e a forma dos conídios. Feitosa et al. (1977) consideram: Ccc = cilíndrico muito curto, relação comprimento/largura menor que 2,00; Cc = cilíndrico curto, relação entre 2,00 e 2,50; C = cilíndrico, entre 2,50 e 3,00; f = fusiforme, entre 3,00 e 3,50; ff = fusiforme muito alongado relação maior que 3,5.

4.4 Teste de utilização de tartarato e citrato como fontes exclusivas de carbono

Para este ensaio, utilizou-se, como meio básico, o meio B (1g.l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.2g.l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g.l KCl; Lynnh et al., 1981), suplementado com ácido cítrico e tartarato de amônio (1%p/v). A cada combinação meio B + ácido cítrico e meio B + tartarato de amônio foi adicionada glucose (controle positivo) e a ausência de uma fonte adicional de carbono constou como controle negativo (Waller et al., 1993).

4.5 Efeito da temperatura no crescimento micelial, capacidade de esporulação, porcentagem de germinação conidial e presença de estruturas reprodutivas de *Colletotrichum* sp

Os isolados avaliados foram os mesmos contemplados na caracterização, com exceção do isolado I-7. Disco micelial de 4mm de diâmetro, obtidos a partir de colônias com sete dias de cultivo, foram transferidos para placas contendo 20 mL de meio MEA 2% e submetidos às seguintes temperaturas, 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C, com fotoperíodo de 12 horas durante sete dias, em BOD. Na avaliação do crescimento micelial, capacidade de esporulação, germinação conidial e presença de estruturas reprodutivas, procedeu-se de maneira semelhante ao realizado no experimento de caracterização. Os dados foram analisados empregando-se análise de regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial

Para a variável índice de velocidade de crescimento micelial, apenas os isolados I-7 e I-9 diferiram estatisticamente dos demais isolados pelo teste Scott Knot 1%. O isolado I-7 apresentou a menor média, sendo considerado de crescimento lento e o I-4 a maior média, sendo considerado de crescimento rápido (TABELA 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Feitosa et al. (1977) e por Nechet (1999), caracterizando-os como isolados de crescimento rápido em meio de cultura.

TABELA 2. Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia), capacidade de esporulação e germinação conidial (%), correspondente a caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp, a 25°C. Médias das sete leituras. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Isolado	IVCM	Esporulação	Germinação(%)
I-1	1,99 b	6,63 a	94,66 b
I-2	2,12 b	2,85 a	98,85 b
I-3	2,13 b	13,44 b	95,38 b
I-4	2,24 b	8,83 b	96,61 b
I-6	2,14 b	10,79 b	99,14 b
I-7	1,76 a	0,13 a	70,90 a
I-8	2,06 b	11,84 b	93,38 b
I-9	1,89 a	5,59 a	93,38 b
I-10	2,03 b	11,16 b	95,23 b

Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott Knot 1%.

No que se refere à capacidade de esporulação dos isolados, foi quantificado que os isolados I-7, I-2, I-9 e I-1 não diferiram estatisticamente entre si a 1% de probabilidade diferindo dos demais isolados os quais apresentaram capacidade de esporulação superior (TABELA 2). Os isolados apresentaram variação em relação à sua capacidade de esporulação em meio de cultura MEA 2%, com fotoperíodo de 12 horas luz e temperatura de 25°C.

Quanto a porcentagem de germinação dos conídios, houve diferença significativa apenas para o isolado I-7, cuja média foi inferior aos demais isolados (TABELA 2).

5.2 Características culturais e reprodutivas dos isolados de *Colletotrichum*

De maneira geral, os isolados apresentaram alta variabilidade quanto à coloração da colônia, produção de estruturas reprodutivas e de resistência, em meio MEA 2% a 25°C. Os isolados I-1, I-2 e I-9 apresentaram coloração das colônias cinza-escura a verde-olivácea, aspecto cotonoso, diferindo na formação de estruturas (TABELA 3). O isolado I-1 produziu a forma teleomórfica *Glomerella cingulata* (FIGURA 2A), o isolado I-2 produziu conídios a partir de acérvulos (FIGURA 2B) e o I-9 produziu conídios somente a partir de hifas (FIGURA 2C).

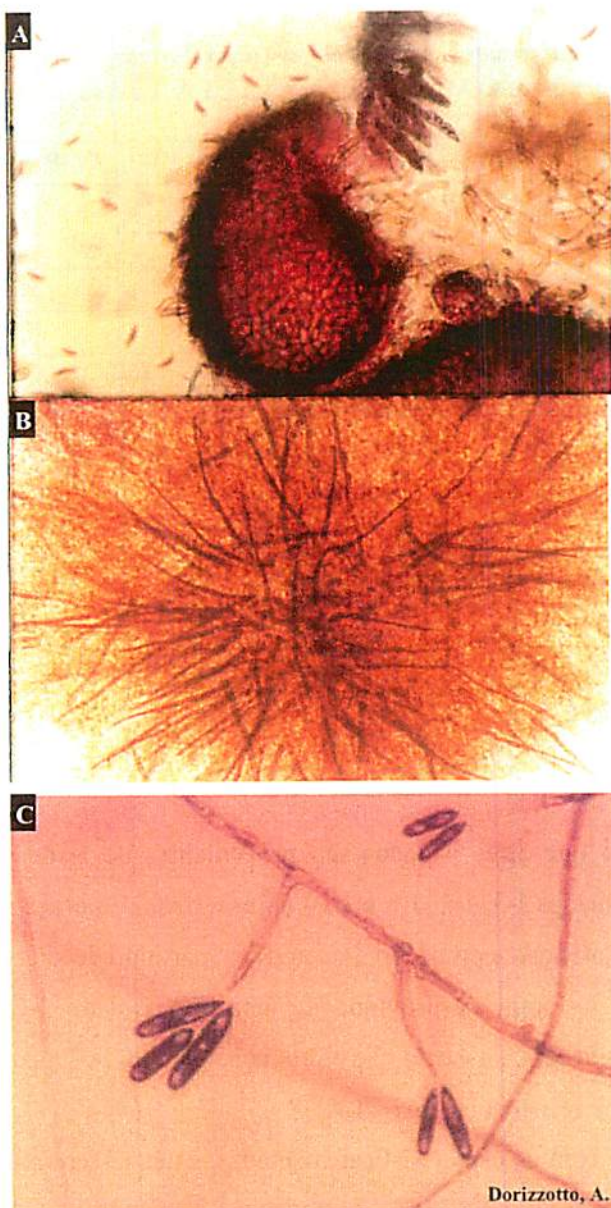


FIGURA 2. Estruturas reprodutivas produzidas por *Colletotrichum* sp. A) Peritécio; B) Acérvulo e C) Produção de conídios diretamente de hifas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

TABELA 3. Características culturais e reprodutivas de isolados de *Colletotrichum* spp. em meio MEA 2% a 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Isolado	Coloração	Aspecto	Acérvulo	Seta	Peritécio	Escleródio
I-1	Cinza escuro a verde oliváceo	Cotonoso	-	-	+	-
I-2	Cinza escuro	Cotonoso	-	-	-	-
I-3	Cinza claro	Cotonoso	+	+	-	-
I-4	Cinza claro	Cotonoso	+	-	-	-
I-6	Branca	Cotonoso	+	+	-	-
I-7	Rósea	Liso	-	-	-	+
I-8	Cinza claro com suaves tonalidades rósea	Cotonoso	+	+	-	-
I-9	Cinza escuro a verde oliváceo	Cotonoso	-	-	-	-
I-10	branca	Cotonoso	+	+	-	-

+ = presença da estrutura

- = ausência da estrutura

Ressalta-se que estes isolados são provenientes de lesões de mancha manteigosa. Os isolados I-3, I-4 I-8 e I-10 apresentaram coloração branca das colônias, aspecto cotonoso e produção de conídios, partindo de acérvulos, sendo que no isolado I-4 foram desprovidos de setas. O isolado I-7 apresentou coloração da colônia rósea, aspecto liso e produção de conídios a partir de hifas, além de estrutura de resistência (TABELA 3).

De acordo com as características avaliadas, estas sugerem que todos os isolados, com exceção do I-7, pertencem à espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, segundo a descrição de Hindorf (1970), citado por Waller et al (1993) e Sutton (1980). O isolado I-7 provavelmente pertence a espécie *Colletotrichum acutatum* Simmonds, apresentando como características: coloração da colônia rósea, crescimento lento em meio de cultura e produção de

conídios diretamente de hifas, o que se enquadra dentro do grupo ccp descrito por Gibbs (1969).

5.3 Dimensões dos conídios

Os isolados apresentam resultado variável em relação à forma dos conídios. A maior variação foi a relação comprimento/ largura, uma vez que os isolados apresentaram uma média semelhante em relação ao tamanho dos conídios, O maior comprimento conidial foi verificado no isolado I-9 (17,15 μ), e o menor no I-4 (7,3 μ), Em relação a largura dos conídios, todos os isolados apresentaram um valor máximo de 4,9 μ , A relação comprimento/largura definiu a forma do conídio, tendo os isolados de mancha manteigosa apresentado resultado variável para essa característica. Os isolados I-2 e I-9 foram caracterizados como de formato fusiforme, enquanto que o isolado I-1 foi considerado cilíndrico.(TABELA 4)

TABELA 4. Dimensões dos conídios de isolado de *Colletotrichum*, provenientes de cafeeiro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Isolado	Tamanho dos conídios			Relação comp/largura (μ)	Forma do conídio
	Taxa de variação		Média(μ)		
	Comprimento(μ)	largura (μ)			
I-1	14,7 - 9,8	4,9 - 3,6	12,25 X 4,8	2,5	C
I-2	14,7 - 12,2	4,9 - 4,5	12,25 X 4,8	3,0	f
I-3	17,15 - 13,4	4,9 - 2,4	12,2 X 4,8	3,5	f
I-4	11,02 - 7,3	4,9 - 3,6	12,25 X 4,8	2,0	C
I-6	14,7 - 9,8	4,9 - 2,4	9,8 X 4,8	2,4	C
I-8	12,25 - 9,8	4,9 - 2,4	12,25 X 4,8	2,5	C
I-9	17,15 - 12,2	4,9 - 3,6	14,7 X 4,8	3,3	f
I-10	13,47 - 9,8	4,9 - 2,4	12,25 X 4,8	2,3	C

C= cilíndrico f=fusiforme

Resultados semelhantes foram obtidos por Feitosa et al. (1977), que observaram variações no tamanho médio dos conídios de 10,53 a 20,20 μ de comprimento e de 4,08 a 7,41 μ de largura. A relação comprimento/largura variou de 1,71 a 3,88 μ . A forma do conídio, de acordo com essa relação, foi cilíndrico, cilíndrico curto, cilíndrico muito curto, fusiforme, fusiforme muito longo.

Observando-se os resultados dos isolados em questão, possivelmente trata-se da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*. Nechet (1999) obteve uma variação de 10,11 – 14,52 μ x 3,06 – 6,47 μ , que está de acordo com a variação encontrada por Vargas e Gonzalez (1972), no estudo do agente causal da mancha manteigosa, na Costa Rica, dados semelhantes ao encontrado neste trabalho.

Segundo Dorizzotto (1993), isolados de *C. coffeanum* apresentaram comprimento acima de 17 μ e para isolados de *C. gloeosporioides*, os valores variaram entre 13,62 e 14,03 micra. Estes valores estão de acordo com os de Sutton (1980), que determinou para a espécie uma variação de 12,5 - 19,0 x 4 -5 μ , para a espécie *C. coffeanum*.

5.4 Testes bioquímicos para separação de espécies de *Colletotrichum*

Quando avaliados em período de sete dias de cultivo, como sugerido por Waller (1993), os isolados apresentaram capacidade de metabolização de tartarato (TABELA 5). O isolado I-1, apresentou resultado positivo no tratamento tartarato + glicose, o qual foi negativo para os demais isolados (TABELA 5).

TABELA 5. Resultado da avaliação da metabolização de tartarato de amônio (T) e ácido cítrico (C) por isolados de *Colletotrichum*, em um período de sete dias de cultivo nos respectivos substratos. UFLA, Lavras, MG, 2002.

	I-1	I-2	I-4	I-9
CO	-	-	-	-
TO	+	+	+	+
CG	-	-	-	-
TG	+	-	-	-

CO = ácido cítrico

TO = tartarato de amônio

CG = ácido cítrico + glucose

TG = tartarato de amônio + glicose

+ = resultado positivo

- = resultado negativo

No entanto, quando os mesmo isolados foram avaliados em quinze dias de cultivo, houve diferença dos resultados. Foi obtido resultado positivo em todos os tratamentos, com exceção do isolado I-4, o qual apresentou resultado negativo, quando submetido ao tratamento ácido cítrico + glucose (CG) (Tabela 6). Resultados semelhantes foram encontrados por Waller et al. (1993), para os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de cafeeiro.

Segundo Bridge (1985), essa característica não deve ser utilizada exclusivamente no diagnóstico da espécie, pois fatores como o pH podem interferir no crescimento do controle negativo. Este fato pode ter ocorrido com o isolado I-4, quando submetido ao tratamento ácido cítrico + glicose (CG) (TABELA 6).

TABELA 6. Metabolização de tartarato de amônio (T) e ácido cítrico (C) por isolados de *Colletotrichum*, em um período de quinze dias de cultivo nos respectivos substratos. UFLA, Lavras, MG, 2002.

	I-1	I-2	I-4	I-9
CO	+	+	+	+
TO	+	+	+	+
CG	+	+	-	+
TG	+	+	+	+

CO = ácido cítrico

TO = tartarato de amônio

CG = ácido cítrico + glicose

TG = tartarato de amônio + glicose

+ = resultado positivo

- = resultado negativo

5.5 Efeito da temperatura no índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e porcentagem de germinação conidial de *Colletotrichum* sp.

Houve interação significativa entre a temperatura e os isolados para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). A temperatura ótima para o maior IVCM dos diferentes isolados variou entre 22 a 28°C. Os isolados I-1, I-2 e I-9 apresentaram máximo crescimento a uma temperatura de 24,7°C, obtida pela derivada das equações de regressão. Esses isolados foram obtidos a partir de lesões foliares com sintoma de Mancha Manteigosa. Nas condições climáticas de Minas Gerais, principalmente região sul, esses isolados encontram condição favorável, para constituir o processo doença, pois a temperatura média encontra-se próxima desse valor. Em relação aos demais isolados houve variação quanto a temperatura ótima, os isolados I-3, I-4, I-6 e I-8 apresentaram as temperaturas ótimas de crescimento: 24,4, 26,9, 22,8 e 27,5°C respectivamente, para o crescimento (FIGURA 3).

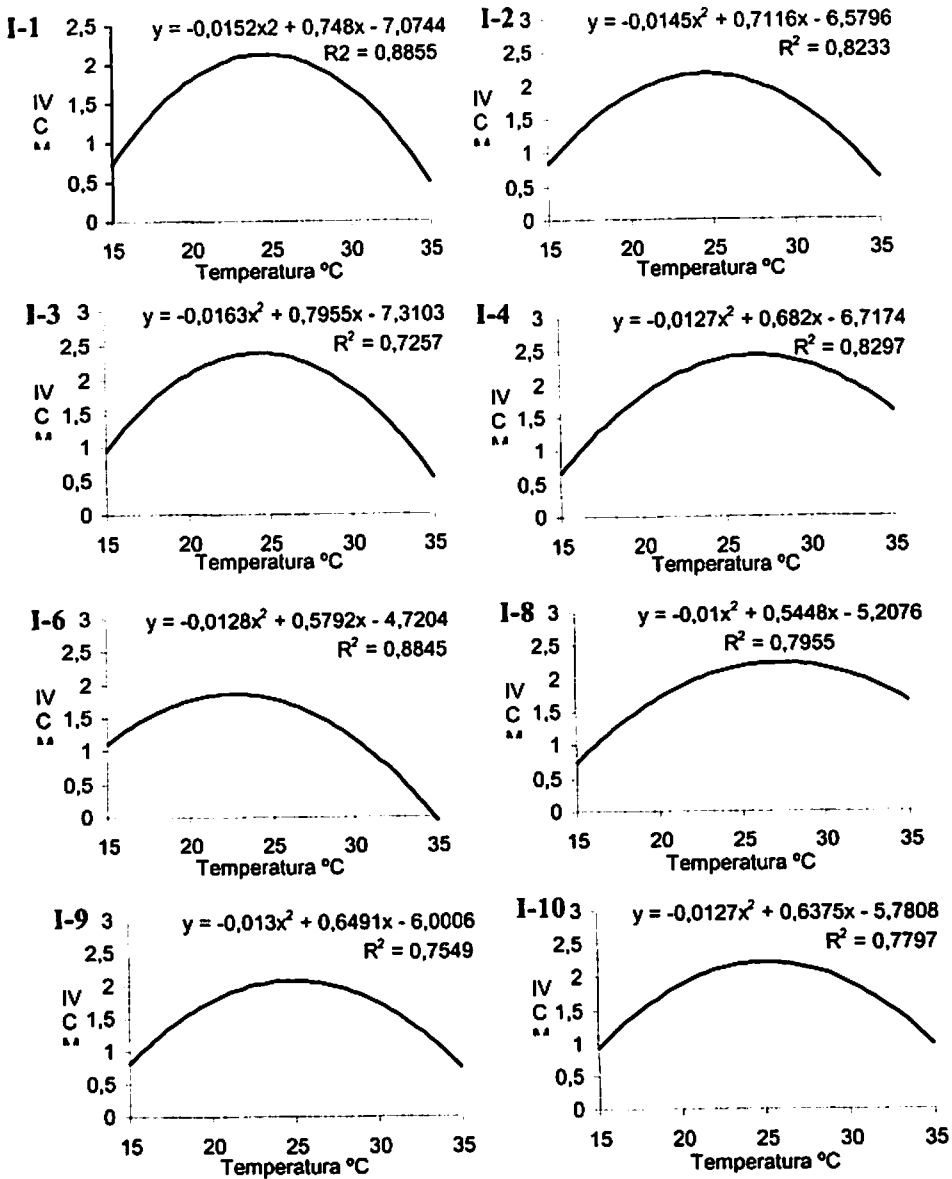


FIGURA 3. Equação de regressão para índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados de *Colletotrichum* sp.UFLA. Lavras, MG, 2002.

Feitosa (1977) , e Denoyes & Baudry (1995), determinaram, por meio de equação do segundo grau, a temperatura de 28°C como o ponto de máximo crescimento para isolados de *Colletotrichum* sp. Os dois últimos autores observaram o incremento no crescimento com a elevação da temperatura até 28°C e a temperatura ótima de crescimento também dependeu do isolado, ocorrendo entre 25°C e 30 °C. Esses autores separaram os isolados em grupos por meio da área de crescimento a 28°C, considerando de crescimento rápido os isolados com área superior a 28,8 cm² e crescimento lento com área inferior a 18,2cm². Nos isolados avaliados a temperatura ótima foi inferior a obtida pelos autores acima citados. As temperaturas de 15° e 35° encontram-se próximas a limítrofe para o crescimento dos isolados, por causar redução drástica no crescimento micelial (FIGURA 3).

Para a produção de conídios também houve interação significativa entre isolados e temperatura. A 30°C, os isolados I-1 e I-9 produziram peritécios no período de sete dias de cultivo. O I-2 apresentou alta capacidade de esporulação, produzindo acérvulos a partir do segundo dia de cultivo. Os isolados I-3 e I-4 produziram acérvulos nesta temperatura; o I-6 e I-10 produziram apenas conídios diretamente de hifas e o isolado I-8, produziu acérvulos a partir do oitavo dia de cultivo, em meio MEA 2%. Uma característica relevante a ser considerada em relação a temperatura é a ocorrência de uma maior variabilidade dentro dos isolados. Foi observado a formação de estruturas reprodutivas em uma placa e em outras não, principalmente quando foram submetidos a condições desfavoráveis, como no caso das temperaturas consideravelmente elevas ou baixas.

Em relação a temperatura ótima, houve diferença entre os isolados. Os isolados, I-1, I-3 I-4 e I-6 apresentaram a temperatura ótima de 23,5°C aproximadamente para a produção de conídios, enquanto os I-2, I-9 e I-10

apresentaram 25, 24,5 e 22,5°C, respectivamente. Não houve ajuste para os modelos de regressão testados para o isolado I-8. Os isolados, I-1, I-2 e I-9 provenientes de sintoma de Mancha Manteigosa apresentaram variação quanto a temperatura ótima para a esporulação, porém permaneceram entre 23 e 25°C. (FIGURA 4).

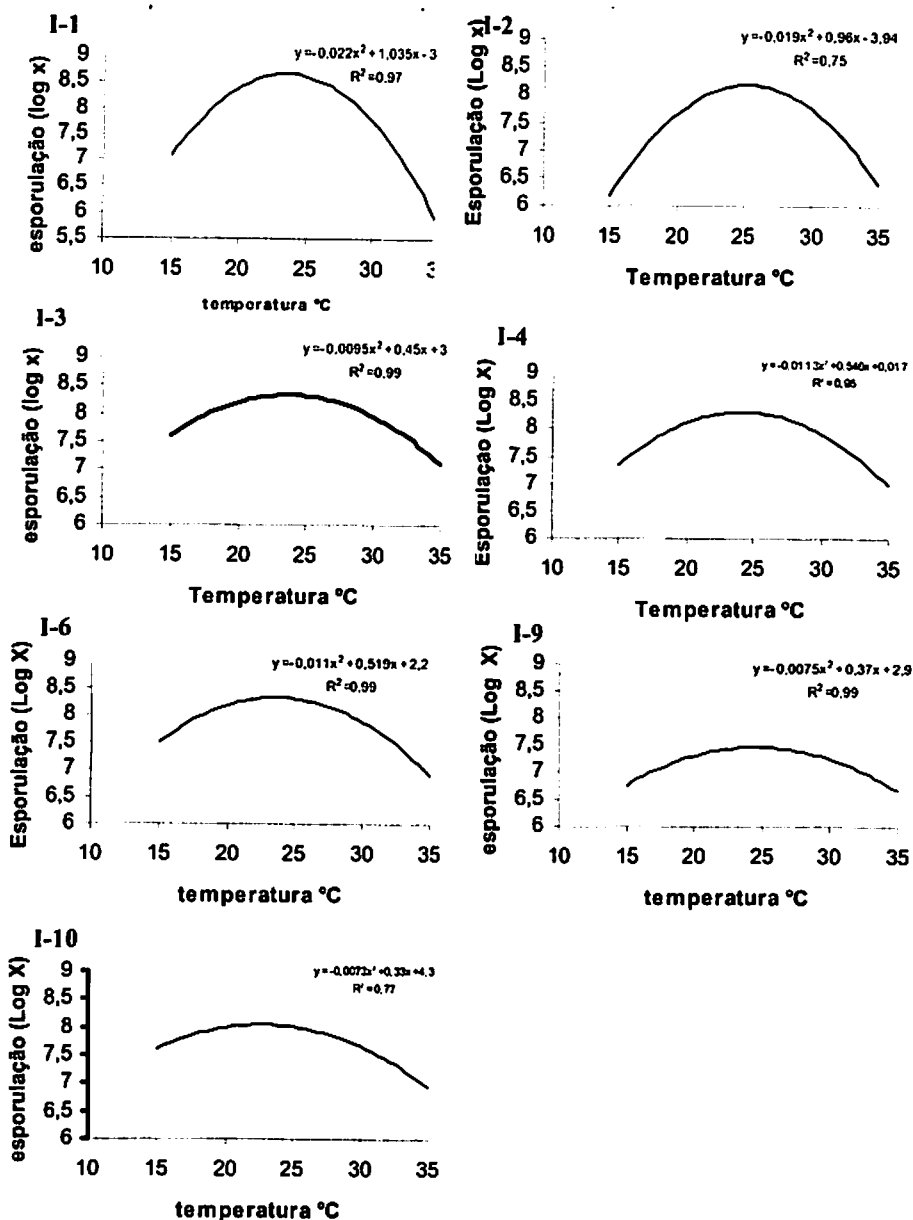


FIGURA 4. Equação de regressão para produção de conídios (esporo/mL) de isolados de *Colletotrichum* sp. submetidos a diferentes temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2002

Os resultados obtidos, por análise de regressão no estudo do efeito de diferentes temperaturas na germinação conidial demonstraram que os isolados de *Colletotrichum*, apresentam variação quanto a temperatura ótima para germinação conidial, e esta é dependente do isolado. Os isolados I-1, I-2, I-3, I-4, I-6, I-8, I-9 e I-10 apresentaram as seguintes temperaturas de ponto de máxima germinação, 22, 32.9, 29, 39, 26.4, 33.6, 29.7 e 37°C respectivamente, (valores obtidos por análise de regressão). Os isolados I-1, I-2 e I-9, são provenientes de lesões característica de Mancha Manteigosa, no entanto não houve coincidência de valores de temperatura ótima para germinação para estes isolados. FIGURA 5.

Existe uma grande variabilidade entre os isolados para as variáveis avaliadas, IVC, capacidade de esporulação e germinação conidial. Essa variabilidade pode está relacionada com uma alta capacidade de adaptação climática desses isolados, os quais apresentam condições de desenvolvimento em temperaturas variando de 15 a 35°C, sendo a temperatura ótima dependente do isolados.

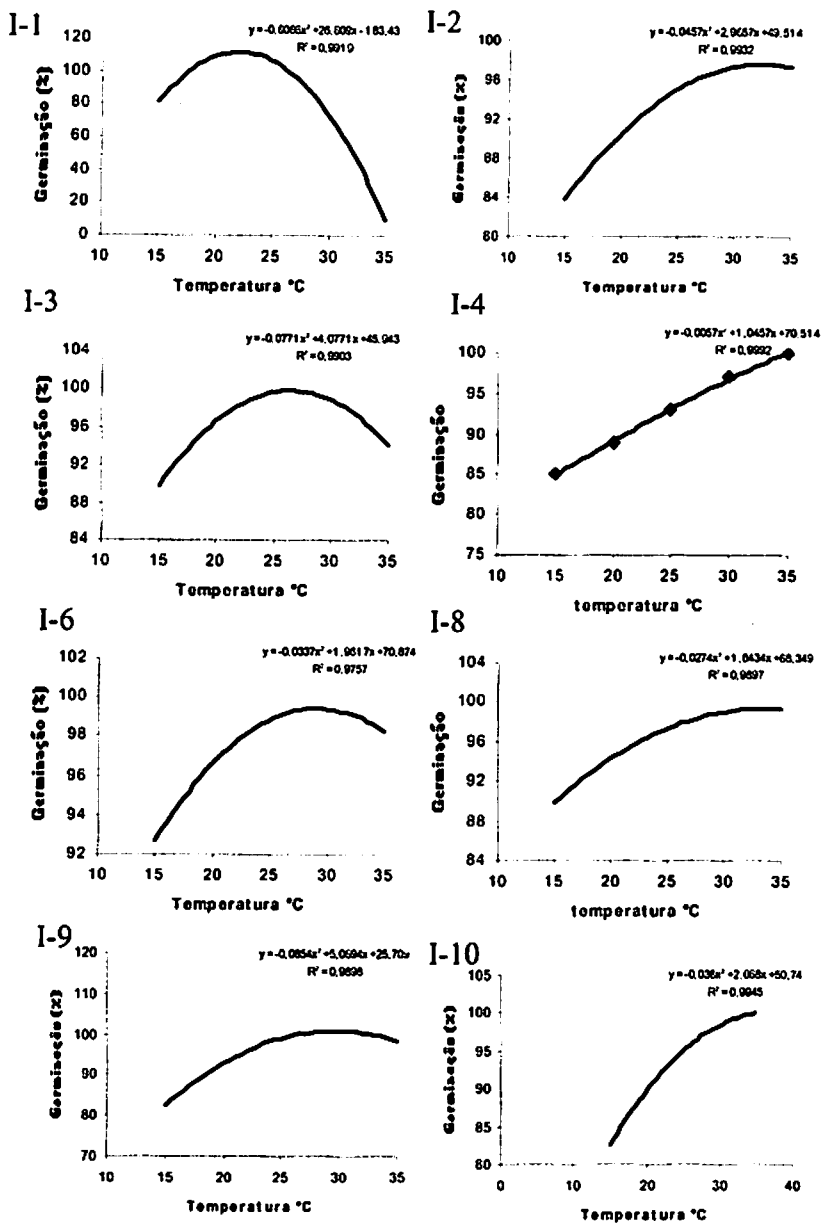


FIGURA 5. Equação de regressão para porcentagem de germinação conidial de isolados de *Colletotrichum* sp. submetidos a diferentes temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

CONCLUSÕES

- 1 As características morfológicas observadas e os resultados do teste de metabolização de tartarato de amônio sugerem ser *Colletotrichum gloeosporioides* o agente causal da mancha manteigosa.
- 2 As características morfológicas, culturais e reprodutivas dos isolados, permitiram a constatação de duas espécies de *Colletotrichum* neste trabalho. Todos os isolados foram considerados como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*, com exceção do isolado I-7, o qual foi considerado pertencente à espécie *C. acutatum* Simmonds.
- 3 O agente causal da mancha manteigosa, produziu forma perfeita em meio de cultura MEA 2%, e apresentou variação entre os isolados quanto à temperatura favorável para a produção da forma teleomórfica.
- 4 A temperatura influencia diretamente no crescimento micelial, na capacidade de esporulação, na produção de estruturas reprodutivas e no tempo de germinação conidial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRIDGE, P.D. An evaluation of some physiological and biochemical methods as aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *fasciculata*. **Journal of General Microbiology**, Colchcrtcr , v.131, p.1887-1895, 1995.

CARRILLO, M. M. ; ZANBRANO, C. Identificación y patogenicidad de cepas del genero *Colletotrichum* asociados al cultivo en la región centro occidental de Venezuela. **Agronomía Tropical**, v.44, n. 4, p. 567-577, 1994.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.24, p.270-276, 1939.

DORIZZOTTO, A. **Caracterização Morfológica e Patogenicidade de *Colletotrichum* sp, associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais.** 1992. Dissertação (Mestrado)Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

DORIZZOTTO, A; ABREU, M. S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.306, 1993. Suplemento.

FEITOSA, M.I. et al. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L, no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.44, n. 1/2, p.33-54, jan./jun. 1977.

GIBBS, J.N. Inoculum sources for coffe berry disease. **Annals of Applied Biology**, v.64, p.515-522, 1969.

LYNCH, J.M. et al. Celulotic activities of some aerobic micro-organisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, Colchester, v.127, n.2, p.231-236, Dec.1981.

MASSABA, B. ; WALLER, J.M. Coffee berry disease: The current status. In: BAYLEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, Pathology and control.** UK: British Society for Plant Pathology, 1992. p.237-249.

NECHET, K. de L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 1999. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n.1, jan. 1902.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.).** 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

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

WALLER, J. M.; BRIDGE, P.D.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, v.97, n.8, p.989-994, 1993.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum sp.* EM *Coffea arabica* L.

1 RESUMO

DIAS, M.D. Avaliação da patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. em *Coffea arabica* L. In: _____. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *coffea arabica* L.** 2002. p. 43-62. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica*), com enfoque para os obtidos a partir de lesões de mancha manteigosa. O teste de patogenicidade em plântulas obtidas por meio de pré-germinação foi conduzido em câmara de crescimento a 22°C, fotoperíodo de 12 horas. A inoculação foi efetuada utilizando-se disco micelial dos isolados, os quais foram aderidos ao hipocótilo das mesmas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados e as avaliações foram realizadas em intervalo de cinco dias, durante trinta dias, utilizando a escala de Van der Vossen; Cook e Murakuro (1976). O teste de patogenicidade em plântulas obtidas a partir da cultura de embrião, foi conduzido em BOD a 25°C, a um fotoperíodo de 12 horas. Plântulas com idade de quatro a cinco semanas foram inoculadas utilizando-se uma gota da suspensão padronizada de esporos (10^6 conídios/ mL). As avaliações foram realizadas dez dias após a inoculação, observando o surgimento de lesões necróticas no hipocótilo e nas folhas cotiledonares. Posteriormente, calculou-se a porcentagem de plântulas com sintomas. Como resultados, todos os isolados de mancha manteigosa mostraram-se patogênicos a plântulas de cafeeiro nas condições acima citadas.

Comitê Orientador: Mario Sobral de Abreu – UFPA (Orientador),
Ludwig Heinrich Pfenning - UFPA



2 ABSTRACT

DIAS, M,D. The pathogenicity valuation of isolates of *Colletotrichum* sp. in *Coffea arabica* L. In: _____. **The morphologic, biochemistry and pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. in *Coffea arabica* L.** 2002. p. 43-62. Dissertation (Master of Science in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The work objective was to characterize the pathogenicity of *Colletotrichum* sp. isolates from coffee (*Coffea arabica*), with prominence for that obtained from lesions blister spot. The pathogenicity test in seedlings obtained from pre-germination of seeds was carried out in chamber growth at 22°C, photoperiod of 12 hours. The inoculation was made with mycelial disk of the isolates, which were stuck on the hypocotil. The experimental design was randomized blocks, the evaluations were accomplished in interval of 5 days, for 30 days, using the scale of Cook and Murakuro (1976). The test pathogenicity in seedlings obtained starting from the embryo culture, was driven in BOD at 25°C, photoperiod of 12 hours. Seedlings aging 4 to 5 weeks, were inoculated with a drop of the standardized suspension of spores (10^6 conídios/mL). The evaluations were accomplished 10 days after the inoculation, observing the appearance of lesions necrotic in the hipocotil and in the cotyledonal leaves. Later the seedlings percentage with symptoms was calculated. As result, every isolated of Buttery Stain was shown pathogenic to the coffee seedlings in the conditions mentioned above.

Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Adviser),
Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA

INTRODUÇÃO

Em relação à população de *Colletotrichum* em cafezais, muitos autores referem-se à presença de estirpes não patogênicas conjuntamente com as patogênicas sobre plantas atacadas. Principalmente quando o isolamento é feito a partir de lesões velhas, utilizando a técnica de crescimento em nutriente-ágar (Waller, 1972; Massaba & Waller, 1992; Waller et al., 1993).

Diferenças em relação à patogenicidade de isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes de diferentes regiões da África foram verificados por Beynon et al. (1995), sendo estes inoculados em hipocótilos de oito semanas, na cultivar Caturra. Os isolados foram caracterizados como altamente agressivos, moderadamente agressivos e confirmou-se a não patogenicidade de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, comumente encontradas em associação com a espécie patogênica.

No Brasil, isolados de *Colletotrichum*, suspeitos de serem relacionados ao CBD, foram testados em mudas e principalmente em frutos verdes de café. Dorizzotto (1993) relata patogenicidade em plântulas de café 25 dias após inoculação, enquanto que, na Costa Rica, isolados de *Colletotrichum* obtidos de mancha manteigosa só se mostraram patogênicos a plântulas de café provenientes de sementes de plantas doentes (Vargas & Gonzalez, 1972).

Segundo o livro de entrada de amostras de cafés doentes ingressados na Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, a presença do fungo nos diagnósticos de laboratório realizados foi de 27,08% em 1997, 33,33% em 1998 e 36,54% em 1999. Assim, foi considerado como um gênero em potencial e que representa grande risco à cafeicultura brasileira.

O presente trabalho teve como objetivo comprovar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* provenientes de folhas e frutos de cafeeiros, associados com sintomas de mancha manteigosa:

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, no período de janeiro a novembro de 2001.

4.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum*

Os materiais foram provenientes de diferentes localidades de Minas Gerais e são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados no teste de patogenicidade em plântulas de cafeeiro, obtidas pela metodologia de pré-germinação. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Isolado	Parte da planta	Sintoma	Localidade
1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, MG
2	Folha	Mancha manteigosa	Acipiumhi, MG
8	Folha	Assintomática	Nepomuceno, MG
9	Folha	Mancha manteigosa	Nepomuceno, MG
10	Ramo	Mancha manteigosa	Nepomuceno, MG

O isolamento foi realizado utilizando-se pequenos fragmentos de folhas com e sem sintoma de mancha manteigosa. Primeiramente, foram lavados em água e detergente. Posteriormente, foram passados em álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 1% por trinta segundos, lavados em água destilada e esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado. Após este processo foram colocados em placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo, em média, 20 mL de

meio de cultura MEA (extrato de malte ágar) e acondicionadas em BOD a 25°C, fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

As colônias foram repicadas, para novas placas e, após sete dias, procedeu-se à obtenção das culturas monospóricas. Partindo de colônias de *Colletotrichum* cultivadas em meio de cultura MEA, preparou-se uma suspensão de esporos pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada na placa de Petri. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, espalhou-se a suspensão de conídios em placas de Petri contendo meio ágar-água 4%. Após cinco horas, em câmara de fluxo laminar, sob microscópio estereoscópio, transferiram-se individualmente os esporos germinados para placa de Petri contendo meio MEA e incubados a 25°C, fotoperíodo de 12 horas durante sete dias.

Para a realizar o teste de patogenicidade em plântulas de cafeeiro obtidas pela metodologia de pré-germinação, fez-se uma seleção de isolados de maior interesse, para este teste. Os isolados selecionados foram os obtidos de plantas com sintoma característico de mancha manteigosa. Isso está de acordo com o objetivo do trabalho, que é a comprovação de sua patogenicidade em plântulas de cafeeiro.

4.2 Obtenção de plântulas de cafeeiro pela metodologia de pré-germinação e inoculação de isolados de *Colletotrichum* sp.

Inicialmente fez-se uma pré-germinação das sementes de café da cultivar acaiaá cerrado em caixas gerbox forradas com papel de filtro e umedecido com água destilada e esterilizada para evitar contaminação. Na fase conhecida como esporão, foram transferidas para bandejas de isopor de 128 células com substrato plantimax e acondicionadas em câmara de crescimento vegetal a uma temperatura de aproximadamente 22°C com fotoperíodo de 12 horas.

O teste foi conduzido em câmara climatizada a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, seguindo o delineamento experimental de blocos casualizados com dezesseis repetições, sendo considerada cada plântula uma unidade experimental. (FIGURA 3A).

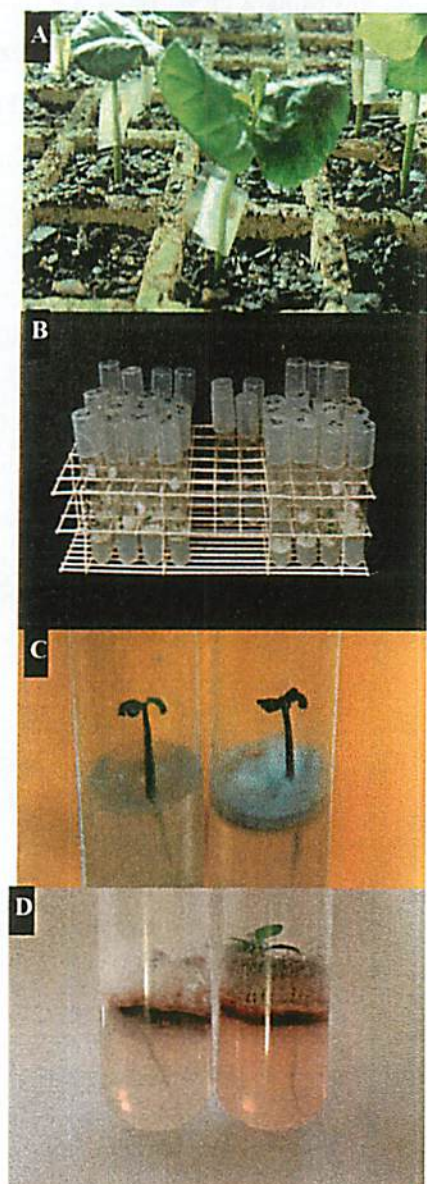


FIGURA 3. Teste de patogenicidade em plântulas de cafeeiro. A) Inoculação com disco micelial; B) Inoculação em plântulas obtidas a partir de cultura de embrião; C e D) Sintomas resultantes da inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Plântulas no estágio palito de fósforo e orelha de onça foram inoculadas, utilizando-se um disco micelial de 4mm e fixados com parafilme, localizado no hipocótilo da plântula. O disco micelial foi obtido de cultura de *Colletotrichum* com idade de sete dias de cultivo em meio MEA 2%. Vinte e quatro horas antes da inoculação, as plântulas foram incubadas em câmara úmida e mantidas sob atmosfera saturada até o surgimento dos primeiros sintomas.

As avaliações foram feitas em intervalos de cinco dias, observando-se individualmente os sintomas da doença no hipocótilo das plântulas, seguindo a escala adaptada de Van Der Vossen, Cook e Murakuro (1976). (TABELA 2).

TABELA 2. Critério de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* sp. apresentados por plântulas de cafeeiro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Notas	Severidade/Sintomas
1	Ausência de reação visível
2	Lesões superficiais castanhas
3	Lesões mais profundas e escuras
4	Lesões escuras com início de estrangulamento
5	Estrangulamento mais pronunciado
6	Plântula morta

O índice de doença foi calculado segundo a fórmula proposta por Cirulli e Alexander, citado por Lima (1981).

$$ID = \frac{\sum (F \times V)}{N \times X} \times 100$$

Sendo:

F= número de plântulas com determinado grau de infecção

V= grau de infecção

N= número total de plântulas inoculadas

X= grau máximo de infecção

4.3 Obtenção de plântulas de cafeeiro por meio de cultura de tecidos (cultura de embrião) e inoculação de isolados de *Colletotrichum* sp.

As sementes foram provenientes de plantas de cafeeiro, cultivares Catucaí e Catucaí vermelho, suscetíveis a mancha manteigosa, oriundas de duas localidades, Lavras e Poço Fundo–MG respectivamente. Foram primeiramente lavadas com água e detergente. Posteriormente, foram colocadas em água destilada por um período de 48 horas de antecedência da extração do embrião. Este foi removido com o auxílio de um estilete em câmara de fluxo laminar e depositado em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), composto por: 440 mg.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O , 170 mg.L⁻¹ KH₂PO₄, 1900 mg.L⁻¹ KNO₃, 370 mg.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 1650 mg.L⁻¹ NH₄NO₃, 0,025 mg.L⁻¹ CoCl₂.6H₂O, 0,025 mg.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O, 6,2 mg.L⁻¹ H₃BO₃, 0,83 mg.L⁻¹ KI, 22,3 mg.L⁻¹ MnSO₄.4H₂O, 0,25 mg.L⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O, 8,6 mg.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 27,8 mg.L⁻¹ Fe(SO₄).7H₂O, 37,2 mg.L⁻¹ Na₂EDTA.2H₂O, 0,5 mg.L⁻¹ ácido nicotínico, 2,0 mg.L⁻¹ glicina, 100 mg.L⁻¹ mio-inositol, 0,5 mg.L⁻¹ piridoxina, 0,5 mg.L⁻¹ tiamina, 30 g.L⁻¹ sacarose e acondicionada a uma temperatura de 26°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 35µM.m⁻².S⁻¹, suprida por lâmpadas grow-lux e branca fria, na proporção de 1:1. Permaneceu nestas condições por um período de quatro a cinco semanas.(FIGURA 3B).

Plântulas com idade de quatro a cinco semanas foram inoculadas utilizando uma suspensão de conídios a uma concentração de 10⁶/mL. Depositou-se nela uma gota da suspensão, com o auxílio de uma micropipeta automática, no ponto de inserção das folhas cotiledonares. A testemunha foi inoculada com água destilada e esterilizada. Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas luz. O

delineamento experimental foi DIC, constituído de quatro repetições, sendo cada plântula uma repetição. O modelo estatístico empregado foi o fatorial 2x3. Os isolados testados foram: I-1, I-2 e testemunha, a qual foi inoculada utilizando-se água destilada e esterilizada.

As avaliações da incidência foram realizadas dez dias após a inoculação, observando o surgimento de lesões necróticas no hipocótilo e nas folhas cotiledonares (FIGURA 3C), sendo calculada pela fórmula proposta por Campbell & Madden.

Após as avaliações procedeu-se o reisolamento para confirmação da presença dos isolados inoculados, associados com o desenvolvimento do quadro sintomatológico apresentados pelas plântulas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de patogenicidade em plântulas de cafeeiro obtidas por meio da pré-germinação

Verificou-se que quinze dias após a inoculação, os isolados I-1 e I-2 já apresentavam sintomas iniciais, apesar de não diferirem estatisticamente dos demais isolados e da testemunha. Aos 30 dias após a inoculação, os isolados I-1, I-2 e I-9 não diferiram estatisticamente entre si, no entanto, diferiram estatisticamente dos demais isolados, os quais apresentaram, estatisticamente, o mesmo comportamento da testemunha, sendo considerados não patogênicos. (TABELA 3).

TABELA 3. Índice de doença (%) em diferentes dias de avaliação, apresentado por plântulas de café cv. Acaia Cerrado quando inoculadas com *Colletotrichum* sp. UFLA, Lavras, MG, 2002.

	ÍNDICE DE DOENÇA (%) *					
	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO					
	5	10	15	20	25	30
Test.	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
I-1	0,000 a	0,000 a	2,082 a	24,875 a	37,435 b	43,747 b
I-2	0,000 a	0,000 a	8,500 a	14,582 a	29,215 ab	44,722 b
I-8	0,000 a	0,000 a	0,000 a	4,155 a	10,412 ab	10,412 a
I-9	0,000 a	0,000 a	0,000 a	12,497 a	29,122 ab	39,580 b
I-10	0,000 a	0,000 a	0,000 a	2,082 a	10,412 ab	10,412 a

*Dados não transformados

Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, $p \leq 0,05$

Test. = testemunha

CV= 48,54

Em relação à patogenicidade, os isolados I-1, I-2 e I-9 mostraram-se patogênicos a plântulas de café cultivar acaia cerrado, no estágio palito de fósforo. Foi observada a morte de plântulas após vinte dias de inoculação dos respectivos isolados. Embora o isolado I-1 tenha apresentado média do índice de doença inferior ao isolado I-2, este promoveu uma maior porcentagem de morte de plântulas (25%) em relação ao isolado I-2 (12,5 %) e ao isolado I-9 (6,25%). A porcentagem de plântulas sem sintomas apresentados pelos isolados I-1, I-2 e I-9 foram de 37,5%, 25% e 18,75%, respectivamente. É relevante ressaltar que estes isolados foram provenientes de plantas com lesões foliares de mancha manteigosa.

Os resultados de patogenicidade obtidos com a inoculação em plântulas de café (*Coffea arabica*), cultivar Acaia Cerrado com os isolados I-1, I-2 e I-9 são semelhantes àqueles encontrados por Waller et al. no trabalho de caracterização do fungo *Colletotrichum kahawae*. Considera-se apenas essa espécie como patogênica à cultura do café, sendo uma característica importante na diferenciação das espécies de *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* a qual é considerada não patogênica. Na maioria dos testes de patogenicidade com isolados de *C. kahawae* em plântulas de café, foi verificada morte dessas plântulas, em geral quinze dias após a inoculação (Waller et al., 1993). Esse fato é semelhante ao ocorrido com os isolados obtidos de lesões de mancha manteigosa, não necessariamente aos quinze dias após a inoculação. Nechet (1999), obteve resultado positivo para patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum*, em plântulas de cafeeiro cultivar mundo novo, no estágio “orelha de onça”, mas não verificou morte de plântulas.

Resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho foram obtidos por Vargas & Gonzalez (1972). Estes autores conseguiram demonstrar patogenicidade somente em mudas procedentes de plantas doentes. E por Dorizzotto (1992).

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos, no entanto, sem resultados conclusivos sobre o assunto. Segundo Waller (1972), um fator que pode estar associado à ausência de reprodução dos sintomas em condições de laboratório é a probabilidade do isolamento da estirpe patogênica de *Colletotrichum*, quando feito a partir de lesões velhas, ser muito pequena, uma vez que a população de saprófita encontra-se em maior proporção. Assim, é necessário fazer o isolamento no momento que surgem os primeiros sintomas no campo e a partir de lesões jovens, na tentativa de se obter cepas patogênicas.

Embora os isolados I-1, I-2 e I-9 tenham apresentado patogenicidade em hipocótilo de plântulas de café semelhante aos resultados obtidos por Waller et al (1993), isto não implica em considerar que estes isolados correspondem à espécie *kahawae*, agente etiológico da CBD. Isto porque existem outras características a serem consideradas tais como, quadro sintomatológico, velocidade de crescimento, tamanho de conídios, coloração das colônias e metabolismo de citrato e tartarato devem ser levadas em consideração.

Os isolados, de acordo com as características morfológicas e teste bioquímico, correspondem à espécie de *C. gloeosporioides*, no entanto, mostrou-se patogênico à cultura do cafeeiro. Julliatti et al. (2000), estudando isolados de *Colletotrichum* provenientes de lesões de antracnose no cafeeiro, comprovaram a patogenicidade dos isolados. Por meio de análise molecular, concluíram ser *Colletotrichum gloeosporioides* e sugeriram a existência de diferentes patótipos para a espécie em questão.

5.2 Teste de patogenicidade em plântulas obtidas através de cultura de tecidos (cultura de embrião)

Considera-se de modo geral, que ambos os materiais avaliados apresentaram a mesma resistência em relação ao patógeno, não diferindo

estatisticamente entre si. Estes resultados mostram uma média geral correspondente aos três tratamentos: isolado I-1, I-2 e a testemunha. Este fato promoveu uma diluição dos valores médios, devido à porcentagem de plântulas sem sintomas (TABELA 4).

TABELA 4. Resultado do teste Tukey 5% para a interação isolados dentro de cultivares e comparação das médias dos isolados em cada cultivar e a média geral da porcentagem de plântulas afetadas pela inoculação de *Colletotrichum*. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tratamento	Catuai	Catuai vermelho	Média
Test,	0,00 a	0,00 a	0,00 a
I1	75,00 b	50,00 ab	62,50 b
I2	100,00 b	100,00 b	100,00 c

Cv: 51,56

Médias seguidas pela mesma letra (minúscula) na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade.

Os isolados I-1 e I-2 não diferiram estatisticamente entre si, quando inoculados em plântulas de café arábica provenientes de “mistura de sementes” de plantas doentes e sadias do município de Lavras, MG (cultivar Catuai) . Analisando o resultado do teste de médias do cultivar (Catuai Vermelho), os isolados I-1 e I-2 diferiram entre si a 5% de probabilidade e da testemunha. Neste caso, o isolado I-2 apresentou uma maior capacidade de causar lesões necróticas, atingindo 100% das plântulas inoculadas. Já para o isolado I-1, somente 50% das plântulas apresentaram sintomas (lesões necróticas no hipocótilo e nas folhas cotiledonares). A cultivar Catuai vermelho apresentou uma maior resistência ao isolado I-1. No entanto, quando se comparam as médias apresentadas pelo isolado I-1, inoculado nas cultivares Catuai e Catuai vermelho, estas não apresentaram diferença estatística a 5% de probabilidade. O isolado I-2 apresentou o mesmo comportamento patogênico em ambas as

cultivares. (TABELA 4).

A média geral (TABELA 4) mostra a capacidade dos isolados I-1 e I-2 de causar lesões necróticas no hipocótilo e nas folhas cotiledonares quando inoculados nas cultivares Catuaí e Catuaí Vermelho. Os isolados I-1 e I-2 diferem estatisticamente entre si e ambos os isolados diferiram da testemunha.

No entanto, pode-se concluir que os dois isolados são patogênicos à cultura do café e existe variabilidade entre os isolados, quanto à capacidade de desenvolver sintomas. Resultado semelhante a este foi obtido por Beynon et al, (1995). Esses autores, observaram diferenças em relação à patogenicidade de isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes de diferentes regiões da África, quando inoculados em hipocótilos de oito semanas, de café cultivar caturra. Os isolados foram caracterizados como altamente agressivos, moderadamente agressivos, e confirmada não patogenicidade de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, comumente encontrada em associação com a espécie patogênica.

É importante ressaltar que estas plântulas foram obtidas por meio de cultura de embrião, tendo a inoculação sido efetuada em tecidos jovens os quais apresentam maior suscetibilidade ao patógeno. Provavelmente, os resultados obtidos em dez dias, em que foram observadas lesões tanto em hipocótilo quanto nas folhas cotiledonares, podem ser atribuídos a esse fator. Além disso são sementes provenientes de plantas com sintoma de mancha manteigosa, embora possa ter ocorrido mistura de sementes, uma vez que foram coletadas pelo produtor. Outro fator a ser considerado é a utilização de cultivares suscetíveis.

Vargas & Gonzalez (1972), demonstraram a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* somente em mudas procedentes de plantas com sintoma de mancha manteigosa. De acordo com os respectivos autores, mudas provenientes de plantas doentes são mais susceptíveis ao patógeno.

No entanto, plântulas provenientes de sementes obtidas de plantas sadias desenvolveram lesões necróticas no hipocótilo, quando inoculadas com disco micelial. Isso demonstra ser possível a reprodução de sintomas em plântulas procedentes de sementes de plantas sadias. No entanto, a porcentagem de plântulas que desenvolveram sintomas foi inferior ao segundo experimento, o qual utilizou sementes “em mistura” e que está de acordo com estes autores.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam à possibilidade de presença de raças de *Colletrichum gloeosporioides*. Sendo necessário testar um maior número de isolados e mais cultivares para obtenção de resultados mais consistentes na verificação desta hipótese.

6 CONCLUSÕES

- 1 Os isolados provenientes de sintomas de mancha manteigosa foram patogênicos em hipocótilos de plântulas de caféiro no estágio palito de fósforo, causando a morte das mesmas.
- 2 Os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de mancha manteigosa apresentaram variação quanto a virulência.
- 3 As cultivares Acaiá Cerrado, Catuai e Catucaí Vermelho, mostraram-se suscetíveis a mancha manteigosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEYNON, S.M. et al. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, n.6, p.457-470, 1995.

DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp, associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1992. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M.S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.306, 1993a. Suplemento.

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**, v.8, p.285, 1993b.

JULIATTI, F.C.; CRISTINA NETO, C.; GOULART FILHO, L.R. Estudo das características fisiológicas e genéticas de isolados de *Colletotrichum* spp. coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica*) de Minas Gerais. 1- Teste de patogenicidade e análise molecular. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 26., 2000, Poços de Caldas. **Anais ... Poços de Caldas**, 2000, p. 215-222.

MASSABA, D.; WALLER, J.M. Coffee berry disease: The current status. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum* – biology, pathology and control. Wallingford, UK: CBA International, 1992. p.237-249.

NECHET, K.L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

VAN DER VOSSSEN, H.M.; COOK, R.T.A.; MURAKURO, G.N.W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noak (sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. **Euphytica**, v.25, p.733-745, 1976.

VARGAS, E.; GONZALES, L.C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, v.22, n.2, 1972.

WALLER, J.M. Water-borne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.71, p.1-18, 1972.

WALLER, J.M.; BRIDGE, P.D.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, v.97, n.8, p.989-994, 1993.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados de *Colletotrichum*, apresentaram habilidade em desenvolver-se em uma ampla faixa de temperatura. A depender das condições ambientais favoráveis e do estágio fenológico e/ou fisiológico da cultura que proporcione uma maior susceptibilidade poderá ocorrer desenvolvimento de uma quadro sintomatológico de mancha manteigosa.

Existe grande variabilidade entre os isolados avaliados, quanto a características morfológicas e reprodutivas. Em determinadas condições de temperatura, os isolados de mancha manteigosa produziram a forma teleomórfica de *Glomerella cingulata*. Por esse processo de reprodução tende a aumentar a variabilidade da espécie, sugerindo que tal fato venha a favorecer a uma adaptação climática, em uma maior amplitude de temperatura.

Considerando os isolados que produziram acérvulos em condições adversas de temperatura, este processo implicaria de maneira a garantir a sobrevivência da espécie, por proporcionar uma maior produção de esporo.

Parece contraditório que isolados caracterizados, morfológica e bioquimicamente, como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*, sejam considerados como patogênicos a plântulas de cafeeiro, ocasionando, em alguns casos, a morte das mesmas. No entanto sugere-se que novos entendimentos com relação à patogenicidade, bem como estudos mais aprofundados de caracterização molecular, sejam realizados com isolados do Brasil e da África. Pois, diante dos fatos observados neste trabalho, possivelmente os isolados considerados patogênicos estejam em uma região limítrofe entre o *C. gloeosporioides* e *C. kahawae*, podendo vir a existir raças dentro da espécie *C. gloeosporioides* muito próximas ao agente da CBD.

A metodologia de obtenção de plântulas por meio da cultura de embrião possui algumas vantagens em relação à metodologia de obtenção de plântulas

pela da pré-germinação, na realização dos testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum*. Uma das principais vantagens é a redução do tempo na obtenção de plântulas. Utilizando-se cultura de tecidos, é possível obter plântulas para inoculação do patógeno em cinco semanas, enquanto que, na metodologia de pré germinação, esse período varia de doze a dezesseis semanas.

Outro fator a ser considerado é a forma de avaliação mais simplista e a resposta sintomatológica mais rápida. Em dez dias após a inoculação é possível avaliar os experimentos, enquanto que, na outra metodologia, as avaliações são periódicas e em um período de tempo maior. Após dez dias da inoculação, inicia-se um crescimento micelial intenso, dificultando a visualização dos sintomas nas plântulas, mas não impedindo de se realizar avaliações mais tardiamente.

Outra vantagem a ser citada é que, no tubo de ensaio, apenas o agente inoculado está presente e sendo avaliado, não havendo interação com outros microrganismos ou organismos (insetos) que possam lesionar a plântula, alterando os resultados da inoculação do agente em questão.

