

PRÉ-INFEÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM HIPOCÓTILOS DE CAFEEIROS INOCULADOS ARTIFICIALMENTE.

Igor S. PEREIRA¹ (igoreloi@yahoo.com.br), Mario S. ABREU², Josimar B. FERREIRA¹, Eduardo ALVES³.

¹ Doutorando, ²Professor titular, ³Professor adjunto. (Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Lavras, CP. 37, 37200-000, Lavras, MG/Projeto financiado pelo CBP&D-Café)

Resumo:

O complexo *Colletotrichum*-cafeeiro em Minas Gerais é composto por vários patossistemas, oriundos das espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (Orozco *et al.*, 2003). Neste complexo, os processos relacionados ao desenvolvimento das doenças, assim como os fatores que atuam neste desenvolvimento ainda são muito pouco estudados. Um modo de se compreender melhor esse patossistema é através dos estudos histopatológicos, onde pode-se conhecer o processo de infecção assim como os fatores que o influenciam. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Enfermidades de Plantas e Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG com o objetivo de se observar através da microscopia eletrônica de varredura o início do processo de infecção de hipocótilos de café (*C. arabica* L.) inoculados com *C. gloeosporioides*. Neste experimento, pode-se observar a germinação dos conídios nos hipocótilos feridos 6 horas após a inoculação, com a formação de dois tubos germinativos terminais, adesão dos conídios nas junções das células e formação de apressórios globosos a sub-globosos e de contorno regular 12 horas após a inoculação. Até 72 horas não foi possível observar a formação de acérvulos. Não houve diferença no comportamento dos isolados utilizados quanto aos eventos observados. Em hipocótilos sem ferimentos este processo só teve início 12 horas após a inoculação.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., *Glomerella cingulata*, microscopia eletrônica de varredura, mancha manteigosa.

PRE-INFECTION OF *Colletotrichum gloeosporioides* IN HYPOCOTYLS OF COFFEE TREES INOCULATED ARTIFICIALLY.

Abstract:

The interaction *Colletotrichum*-coffee in Minas Gerais state, Brazil, involves several pathosystems such as *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* (Orozco *et al.*, 2003). In this complex, the processes of disease development as well as the factors involved are still poorly studied. A way for understanding this pathosystem is through the histopathological studies. This work was carried out in the Laboratory of Diagnosis and Control of Plant Diseases and Laboratory Electron Microscopy and Ultra-structural Analysis (LME) of Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. The objective of this study was to observe through scanning electron microscopy the beginning of the infection process of hypocotyls of coffee trees (*C. arabica* L.) inoculated with *C. gloeosporioides*. The conidia germination could be observed in wounded hypocotyls 6 hours after inoculation, with formation of two terminal germ tubes and conidia adhesion in junctions of the cells. Appressoria rounded to sub-rounded shape and of regular contour appeared 12 hours after inoculation. Within 72 hours, it was not possible to observe the acervuli formation. There was not difference in the reaction among the isolates used in this study. The germination process began only 12 hours after inoculation in unwounded hypocotyls.

Key words: *Coffea arabica* L., *Glomerella cingulata*, scanning electron microscopy, blister spot.

Introdução

As doenças comumente ocasionadas por *Colletotrichum* spp. em cafeeiros são a antracnose em folhas, frutos e ramos; a seca de ponteiros ou murcha descendente; a mancha manteigosa e a *coffee berry disease*. Dentre estas doenças, a *coffee berry disease* cujo agente etiológico é *C. kahawae*, encontra-se restrita às regiões produtoras de café do continente africano (Orozco *et al.*, 2003).

Os patossistemas ocorrentes no Brasil são ocasionados por populações das espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (Orozco *et al.*, 2003). *C. crassipes* é outra espécie que foi recentemente isolada de cafeeiro não sendo, entretanto, correlacionada a nenhuma doença (Salgado *et al.*, 2004).

Neste complexo, os processos relacionados ao desenvolvimento das doenças assim como os fatores que atuam neste desenvolvimento ainda são muito pouco estudados, necessitando-se, portanto maiores informações para seu entendimento.

Espécies de *Colletotrichum* empregam diversas estratégias para invasão do hospedeiro, desenvolvendo uma série de estruturas de infecção especializadas como tubos germinativos, apressórios, *pegs* de penetração, (vesículas de infecção hifas primárias e hifas secundárias), as quais aparecem numa seqüência comum às diversas espécies. Inicialmente tem-se a adesão dos conídios ou ascósporos dispersos sobre a planta, sendo este um processo passivo e inespecífico (Bailey *et al.*, 1992). Posteriormente, conídios e ascósporos germinam como tubos germinativos indiferenciados ou passando por uma diferenciação complexa a fim de se formar apressório. Apressórios são essenciais à infecção e morfológicamente

característicos do gênero, podendo ser globosos ou subglobosos e de contorno regular ou com variados graus e frequência de rugosidades (Sutton, 1992). Materiais exógenos, tais como grãos de pólen, ácidos orgânicos e sideróforos podem influenciar a germinação conidial e sua diferenciação em apressórios. Na presença de nutrientes, o índice de germinação de esporos é acentuado, porém, baixas concentrações frequentemente inibem a formação de apressórios (Bailey *et al.*, 1992).

A topografia da superfície do hospedeiro é relatada também afetando a formação de apressórios (Lapp & Skoropad, 1978).

Quanto à penetração, vários modos são possíveis: por aberturas naturais tais como estômatos, por ferimentos e diretamente pela cutícula. O modo mais comum de penetração é diretamente pela cutícula da planta, havendo, entretanto casos onde estes ferimentos são essenciais tais como podridão da coroa e do pedicelo em banana (*Musa* sp.) causados por *C. musae* e podridão em mandioca causada por *C. gloeosporioides*. Para a maioria das espécies de *Colletotrichum*, especialmente aquelas que atacam tecidos jovens, sua habilidade para penetrar a cutícula diretamente é de extrema importância. A força mecânica, degradação enzimática por cutinases ou a combinação de ambos os processos são os mecanismos de penetração da cutina propostos (Mercer *et al.*, 1971).

Até o presente trabalho, estudos histopatológicos do processo de infecção de hipocótilos de cafeeiro por *C. gloeosporioides* envolvendo a microscopia eletrônica de varredura não haviam sido feitos, desse modo, o conhecimento aqui gerado abre portas para trabalhos futuros para que se possa conseguir um bom entendimento sobre este patossistema. Portanto, com base nestas informações procurou-se observar através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) o início do processo de infecção de hipocótilos de café (*C. arabica* L.) inoculados por *C. gloeosporioides*.

Material e Métodos

Realizaram-se isolamentos a partir de fragmentos de folhas e ramos com sintomas de mancha manteigosa da cultivar Catucaí Vermelho em seleção conforme metodologia utilizada por Orozco (2003). As colônias que apresentavam crescimento micelial característicos de *C. gloeosporioides* foram purificadas e posteriormente, com auxílio de preparações microscópicas classificadas ao nível de espécie. Neste trabalho utilizaram-se dois isolados de *C. gloeosporioides*, um proveniente de ramos e outro proveniente de folhas.

Utilizaram-se hipocótilos da cultivar Acaiaí Cerrado (MG-1474) provenientes de lavoura sadia. Para produção dos hipocótilos, sementes sem pergaminho foram lavadas, desinfetadas com álcool e hipoclorito de sódio 1% e novamente lavadas com água destilada esterilizada. Essas sementes foram colocadas para germinar a 25°C em bandejas de plástico com areia esterilizada onde permaneceram até a fase de palito de fósforo.

Assim que os hipocótilos atingiram a fase palito de fósforo, foram lavados e selecionados, descartando-se todos aqueles que apresentavam algum sintoma de origem biótica ou abiótica e imediatamente acomodadas em placas de Petri. A fim de se ter um ambiente saturado por umidade, papel de filtro umedecido foi colocado no fundo destas placas as quais recebiam 5 hipocótilos.

A inoculação foi realizada com uma gota de 50µl de suspensão de 2×10^6 conídios/mL dos dois isolados de *C. gloeosporioides* em 3 áreas delimitadas nos hipocótilos. Após a inoculação as placas foram fechadas e acondicionadas em BOD a 23°C $\pm 0,5$ no escuro.

Após 4 horas foram coletadas as primeiras amostras as quais foram imersas em fixador karnovsky's modificado até seu completo processamento para visualização em MEV. As demais coletas foram realizadas com 5, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

O preparo e observação das amostras em MEV foram realizados no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Posteriormente à imersão em solução fixativa por um período de no mínimo 24 h, cinco ou mais fragmentos de cada tratamento foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato (0,05M) e lavados neste três vezes durante 10 minutos. As seções foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 2 horas, posteriormente lavadas em água destilada e subsequentemente desidratadas em uma série de acetona. Após essa desidratação as amostras foram imediatamente submetidas ao aparelho de Ponto Crítico Balzers CPD 030 e montadas sobre *stubs* para serem cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 e examinados com o microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40.

Resultados e Discussão

No período entre 4 e 5 horas após a inoculação não se observou a germinação de conídios em hipocótilos, tanto com ferimento quanto sem ferimento, independente da origem dos isolados (Figura 1-A). Orozco (2003) observou que conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de cafeeiro iniciavam a sua germinação entre 5 a 8 horas em água destilada esterilizada a 25°C. A germinação de conídios dentro do gênero é bastante variável, iniciando-se entre 4 e 48 horas (Roberts & Snow, 1984; Bailey *et al.*, 1992) sendo ainda dependente de fatores externos tais como temperatura (Orozco, 2003) e a presença de materiais exógenos (Bailey *et al.*, 1992).

A aderência dos conídios foi maior na região do hipocótilo onde as depressões eram mais evidentes, mostrando, portanto certa correlação com a topografia do hospedeiro (Figura 2-B). Observação semelhante foi relatada por Porto *et al.* (1988) quando inocularam *C. trifolii* sobre alfafa. A adesão do esporo na superfície do hospedeiro é reconhecida por vários autores como evento essencial para o sucesso da infecção (Mercure *et al.*, 1994), influenciando inclusive no desenvolvimento da doença, pois uma rápida adesão dos conídios aumenta a chance de sucesso no estabelecimento do patógeno (Mercure *et al.*, 1994).

O início da germinação ocorreu 6 horas após a inoculação quando alguns conídios emitiram 1 ou 2 tubos germinativos (Figura 1-C). Este início de germinação ocorreu independente da origem dos isolados, entretanto, não houve germinação nos hipocótilos sem ferimentos. Somente com 12 horas ocorreu o início da germinação sobre hipocótilos sem ferimentos e até o final das observações, ainda havia muitos conídios sem germinar.

Esta não germinação em hipocótilos sem ferimentos deve-se provavelmente à ausência de substâncias exudadas pelo material vegetal. Segundo Bailey *et al.* (1992) materiais exógenos, tais como grãos de pólen, ácidos orgânicos e sideróforos, na gota do inóculo podem influenciar a germinação. Na presença de nutrientes, o índice de germinação de esporos é acentuado. Em *C. acutatum* f.sp. *pineae* a germinação sobre plântulas de *Pinus radiata* tem início 6 horas após inoculação ocorrendo máxima germinação 96 horas após inoculação (Nair & Corbin, 1981), *C. capsici* sobre maçãs do algodoeiro, têm a sua germinação máxima concentrada em torno de 4 horas após a inoculação (Roberts & Snow, 1984), *C. trifolii* inoculado sobre alfafa, tem germinação máxima ocorrendo em torno de 24 horas após a inoculação (Porto *et al.*, 1988), o mesmo ocorrendo para *C. gloeosporioides* inoculado sobre frutos de mamão (Chau & Alvarez, 1983) portanto, há grande variação no tempo de germinação entre as diferentes espécies de *Colletotrichum*.

O tubo germinativo foi emitido das extremidades do conídio havendo, entretanto alguns que surgiram lateralmente (Figura 1-D). Em *C. capsici* é comum o surgimento de 1 a 3 tubos germinativos, em função dos septos presentes no conídio desta espécie (Roberts & Snow, 1984), em *C. acutatum* f.sp. *pineae* um ou dois tubos germinativos surgem lateralmente ou mais frequentemente próximo à parte terminal do conídio (Nair & Corbin, 1981).

Com 12 horas após a inoculação conídios emitiram apressórios a partir de tubos germinativos. O crescimento do tubo germinativo foi variável antes da emissão do apressório. Estes eram globosos a subglobosos e de contorno regular (Figura 1-E, F).

Até o final do período de avaliação não pode-se observar a formação de acérvulos sobre o material. Sintomas de *C. gloeosporioides* sobre hipocótilos de cafeeiro susceptíveis só são observados cinco dias após a inoculação e aos dez dias após a inoculação ocorreu a morte de plântulas. Através de cortes histopatológicos de hipocótilos de café da cultivar Catucaí Vermelho inoculado pode-se observar acérvulos nove dias após a inoculação (Orozco, 2003).

É importante salientar que apesar de utilizar-se uma concentração de 2×10^6 conídios/mL a qual é considerada ideal em testes de patogenicidade (Dorizzotto, 1993), muitas amostras não tinham conídios aderidos. Este fato deve-se provavelmente à metodologia utilizada para o preparo das amostras onde estes conídios foram lavados. Necessário torna-se então que outra forma de processamento ou ainda a utilização de microscópios eletrônicos que trabalhem a baixa pressão em que não há necessidade de se processar as amostras conforme descrito na metodologia utilizada.

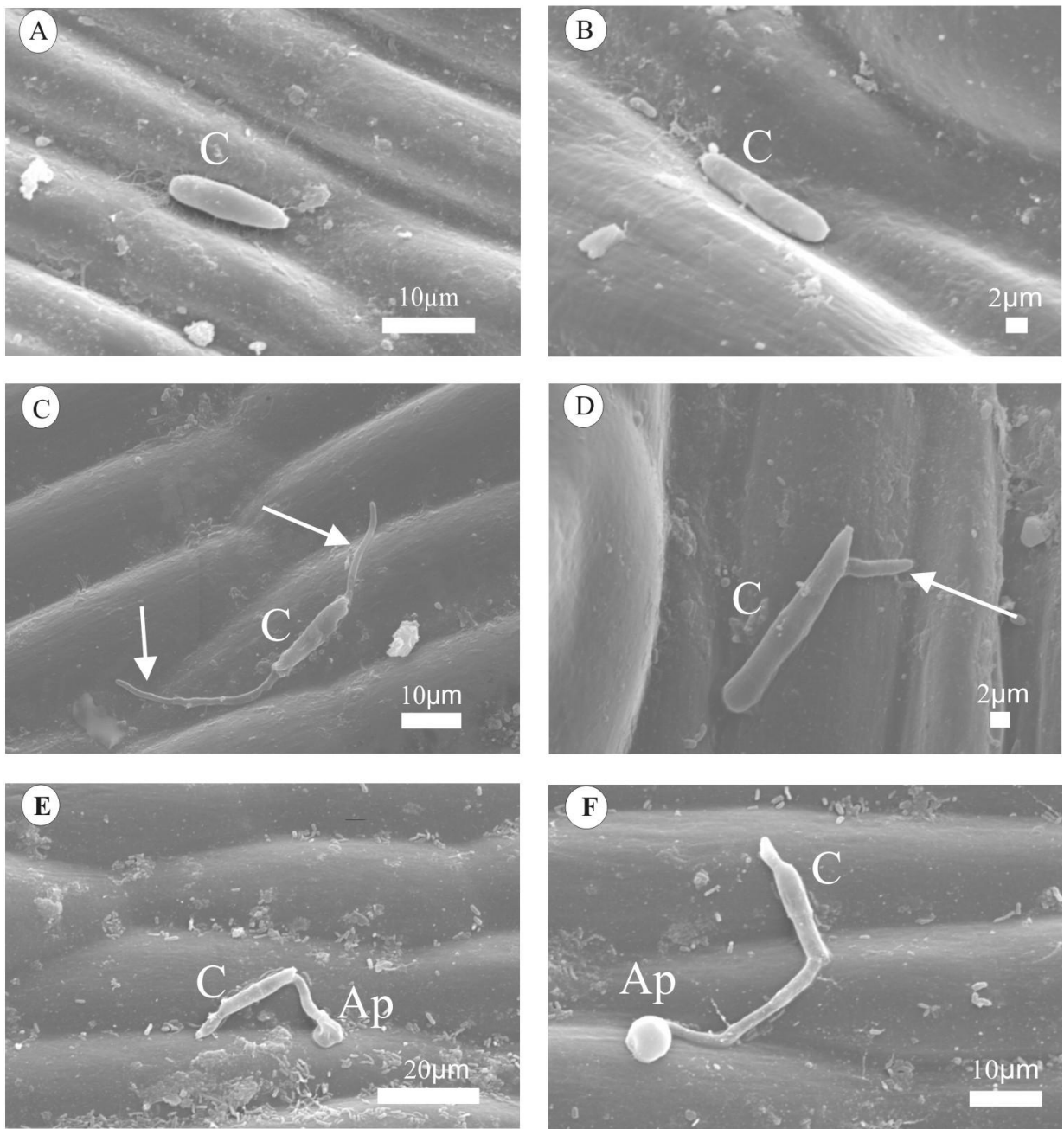


FIGURA 1 – Eletromicrografia de varredura mostrando hipocótilos de cafeeiro inoculados com *C. gloeosporioides*. A - Conídio (C) não germinado 5 horas após inoculação. B - Adesão nas cavidades do hipocótilo. C - Germinação de conídios com emissão de dois tubos germinativos apicais (seta). D - Tubo germinativo lateral ao conídio (seta). E e F - Apressórios (Ap) ao final do tubo germinativo.

Referências Bibliográficas

BAILEY, J.A.; O'CONNEL, R.J.; PRING, R.J.; NASCH, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) *Colletotrichum* biology, pathology and control. England, CAB International Wallingford, p.88-120.

CHAU, K.F. & ALVAREZ, A.M. 1983. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*, *Phytopathology*, 73:1113-1116. n.8.

DORIZZOTTO, A. Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais. 1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

- LAPP, M.S.; SKOROPAD, W.P. 1978. Location of appressoria of *Colletotrichum graminicola* on natural and artificial barley leaf surfaces. Transactions of the British Mycological Society, 70:225-228.
- MERCER, P.C.; WOOD, R.K.S.; GREENWOOD, A.D. 1971. Initial infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Preece, T.F. & Dickinson, C.H. (eds.), Ecology of Leaf Surface Micro-organisms, Academic Press, London, p.381-389.
- MERCURE, E.W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R.L. 1994. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. Physiological and Molecular Plant Pathology, 45:407-412, n.6.
- NAIR, J. & CORBIN, J.B. 1981. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f.sp. *pinæ*. Phytopathology, 71:777-783. n.8.
- 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. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- OROZCO MIRANDA, E.F.; JULIATTI, F.C.; DORIZZOTTO, A.; ABREU, M.S. 2003. Determinação da resistência de cultivares de café e evidenciação de raças fisiológicas no patossistema café x *Colletotrichum* spp. no estado de Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira, 28:222-222 Suplemento...
- PORTO, M.D.M.; GRAU, C.R.; ZOETEN, G. A.; GAARD, G. 1988. Histopathology of *Colletotrichum trifolii* on alfafa. Phytopathology 78:345-349 n.3.
- ROBERTS, R.G & SNOW, J.P. 1984. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. Phytopathology 74:390-397.
- SUTTON, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (eds.). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. England, CAB International Wallingford, p.1-26.
- SALGADO, M.; ALMEIDA, A.R.; LIMA, C.S.; ABREU, L.M.; PFENNING, L.H. 2004. Diversidade de *Colletotrichum* spp. em cafeeiros sadios: patógenos ou endófitos? Fitopatologia Brasileira, 29:214-214, Suplemento...