

## CONSTATAÇÃO E PATOGENICIDADE DE *Corynespora cassiicola* EM PLANTAS DE *Coffea canephora*

Antonio Fernando de Souza<sup>1</sup>; Hécio Costa<sup>2</sup>; Laércio Zambolim<sup>3</sup>; Cristiane Mendes<sup>4</sup>; Rejane do Nascimento Freitas<sup>5</sup>; Eunize Maciel Zambolim<sup>6</sup>; Waldir Cintra de Jesus Junior<sup>7</sup>.

<sup>1</sup>Pesquisador e Bolsista PRODOC/CAPES, D.Sc., CCAUFES, Alegre-ES, [anfersouza@yahoo.com.br](mailto:anfersouza@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Pesquisador, D.Sc., INCAPER, Domingos Martins-ES, [helciocosta@incaper.es.gov.br](mailto:helciocosta@incaper.es.gov.br)

<sup>3</sup> Professor e Pesquisador, Ph.D, UFV, Viçosa-MG, [zambolim@ufv.br](mailto:zambolim@ufv.br)

<sup>4</sup> Pesquisadora, Engenheiro Agrônoma, UNESP, Registro-SP, [crismendes86@hotmail.com](mailto:crismendes86@hotmail.com)

<sup>5</sup> Pesquisadora do BIOCAFE, UFV, Viçosa, MG.

<sup>6</sup> Pesquisadora, D.Sc., UFV, Viçosa, MG, [eunize@ufv.br](mailto:eunize@ufv.br)

<sup>7</sup> Professor e Pesquisador, D.Sc., CCAUFES, Alegre-ES, [wcintra@cca.ufes.br](mailto:wcintra@cca.ufes.br)

**RESUMO:** Plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon, variedade clonal 'Vitória' - Clone CV3 foram encontradas em campo apresentando-se pequenas manchas foliares de coloração marrom claro, sem o centro claro, normalmente circundado por halo amarelado. O agente causal foi identificado como *Corynespora cassiicola* com base nos sintomas típicos da doença, morfologia das estruturas reprodutivas do fungo e por meio de PCR empregando-se primer específico para a espécie *C. cassiicola*. A patogenicidade *C. cassiicola* foi confirmada em plantas de café conilon do mesmo clone (CV3) seguindo-se todas as etapas dos postulados de Koch. Este foi o primeiro relato da ocorrência de *C. cassiicola* causado intensa desfolha em plantas de *C. canephora* em condições de campo e patogenicidade de *C. cassiicola* em condições de casa-de-vegetação.

**Palavras-chave:** *Corynespora cassiicola*, constatação, patogenicidade, *Coffea canephora*

### FIRST REPORT AND PATHOGENICITY OF *Corynespora cassiicola* in *Coffea canephora*

**ABSTRAC:** *Coffea canephora* cv. Conilon plants of the clonal variety 'Vitoria' - Clone CV3 were found in the field with leaf symptoms characterized by small leaf spots of brown color, without clear center, usually surrounded by a yellow halo. The causal agent caused intense leaf defoliation of the plants. Based on the symptoms of the disease, morphology of reproductive structures of the fungus and by PCR with specific primer for the specie *C. cassiicola* the causal agent was identified as *Corynespora cassiicola*. The pathogenicity *C. cassiicola* was confirmed in plants of the same coffee clone following all the steps of Koch's postulates. This was the first record of the occurrence of *C. cassiicola* in plants *C. canephora* plants under field conditions.

**Key words:** *Corynespora cassiicola*, patogenicidade, *Coffea canephora*

### INTRODUÇÃO

O cultivo de *Coffea canephora* no Brasil é responsável por cerca de 40% da produção nacional de café. Os principais estados produtores são Espírito Santo, Rondônia, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Rio de Janeiro. O Estado do Espírito Santo é responsável por 75% da produção nacional de *C. canephora*, o que coloca o Estado na posição de primeiro produtor nacional de café desta espécie (Ferrão et al., 2007).

Entretanto a busca pelo aumento de produtividade tem levado os cafeicultores a adotarem práticas de manejo que favorecem o aparecimento de doenças nas lavouras tais como, adensamento de plantas nas linhas de plantio; uso da irrigação por aspersão e plantio em grandes áreas dos clones mais produtivos selecionados dentro das variedades clonais melhoradas (variedade clonal corresponde a mistura de vários clones de café 'Conilon' que apresentam características agrônômicas desejáveis como alta produtividade, uniformidade de maturação, porte de planta e reação diferenciada de resistência/susceptibilidade à ferrugem).

O fungo *Corynespora cassiicola* infecta folhas, flores, frutos, raízes e caules de várias espécies de plantas de regiões tropicais e subtropicais (Farr et al., 2009). Nas espécies em que o patógeno ocorre causa manchas de coloração marron clara a escura na superfície dos órgãos infectados. Diante da hipótese que o agente causal de manchas foliares em folhas e frutos de plantas de *C. canephora* seja *C. cassiicola* o trabalho teve por objetivo identificar e testar a patogenicidade do isolado obtido em cultura pura em tecidos sadios do mesmo hospedeiro.

### MATERIAIS E MÉTODOS

**Associação do patógeno com o Hospedeiro:** Na safra de 2007/2008 plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon, variedade clonal 'Vitória' - Clone CV3 identificou-se no município de Castelo-ES plantas no campo apresentando-se pequenas manchas foliares de coloração marrom claro, sem o centro claro, normalmente circundado por halo amarelado. As folhas infectadas foram observadas ao microscópio estereoscópico onde visualizou-se a presença de estruturas reprodutivas fúngicas isoladas e externas ao tecido do hospedeiro. Logo após procedeu-se a raspagem das

estruturas fúngicas para observação ao microscópio óptico. A identificação do patógeno foi feita com base na morfologia das estruturas reprodutivas dos conídios e conidióforos.

**Teste de Patogenicidade:** Fragmentos da borda da lesão foram retirados e superficialmente esterilizados em etanol (70 %) por 3 minutos. Em seguida esses fragmentos foram transferidos para placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) e armazenados em câmara de tipo BOD regulada a temperatura de  $(26\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C})$ . Micélios que emergiram desses fragmentos foram repicados para novas placas contendo BDA e a cultura pura obtida foi utilizada na inoculação de folhas saudáveis do mesmo clone.

A patogenicidade do isolado obtido em cultura pura foi confirmada por meio da inoculação de discos de micélio em folhas saudáveis do respectivo clone sob condições de laboratório. As folhas foram colocadas sobre uma tela plástica, dentro de caixa tipo gerbox contendo três camadas de papel de filtro esterilizado e umedecido em água destilada esterilizada. Discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro foram retirados da cultura pura após 10 dias de incubação e depositados sob a superfície dorsal das folhas que receberam ou não ferimentos com auxílio de estilete de ponta fina.

Dez dias após o aparecimento dos sintomas, foi feito o reisolamento do patógeno de fragmentos das lesões de folhas com e sem ferimentos, conforme procedimento descrito anteriormente. Cultura pura crescida em BDA por oito dias foi utilizada para comparar com as características da cultura pura original e para o preparo de lâminas microscópicas visando observação das características morfológicas dos conídios.

Complementarmente ao teste de patogenicidade em folhas destacadas, realizou-se o teste molecular empregando a técnica da reação em cadeia da Polimerase (*PCR-Polimerase Chain Reaction*) comparando-se DNA do isolado obtido em cultura pura com dois 'primers' específicos (CCF e CCR), desenhados com base na sequência ITS do gene rRNA de *C. cassicola*, conforme trabalho de QI et al. (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Descrição dos sintomas:** Nas folhas a infecção inicia-se com pequena descoloração no limbo foliar de no máximo 2 mm de diâmetro, normalmente com centro necrótico (Figura 1). Estas áreas necrosadas evoluem para uma coloração marrom clara de 2 a 7 mm de diâmetro, circundada por halo amarelo. Varias manchas podem ser encontradas nas folhas. Às vezes as manchas coalescem e formam uma extensa lesão de formato irregular no limbo foliar. Quando atingem a nervura principal as lesões se tornam alongadas, medindo aproximadamente 2,6 mm de largura por 36,5 mm de comprimento e crescem acompanhando a nervura, geralmente circundada por halo amarelado. A nervura geralmente escurece e na junção com limbo foliar pode ser observado os sinais do patógeno (conidióforos isolados com conídios característicos do fungo). Quando inoculados em folhas destacadas os sintomas aparecem com sete dias à temperatura de  $(26\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C})$ .

Sintomatologia bastante semelhante foi observada em plantas de híbridos de *C. canephora* var. robusta e conilon em Ouro Preto do Oeste no Estado de Rondônia, em março de 2007 (Informação pessoal de Flavio de França Souza, EMBRAPA RONDONIA) embora, ainda não tenha ocorrido relatos escritos da doença e nem testes de patogenicidade do fungo a *C. canephora* var. Robusta no país.



**Figura 1:** Folhas de *C. canephora*, variedade clonal 'Vitória' (Clone CV3), mostrando sintomas de infecção causados por *C. cassicola*.

Todas as folhas da parte aérea da planta podem ser afetadas pela doença no campo. Uma maior concentração de folhas doentes foi observada nas brotações novas, que irão substituir as hastes mais velhas na safra seguinte. Quando o ataque é severo há queda de folhas prematuramente causando desfolha e seca do ápice dos ramos produtivos (Figura 2).



**Figura 2:** Desfolha e seca de ramos em plantas de *C. canephora*, variedade clonal ‘Vitória’ (Clone CV3), causado por *C. cassiicola*.

Nos frutos os sintomas iniciais consistem de pequenas lesões necróticas de aproximadamente 1 mm de diâmetro (Figura 3). Com o passar do tempo estas lesões evoluem de tamanho adquirindo um formato elíptico ou alongado com extensas necroses na casca do fruto, antes mesmo deles atingirem sua maturidade fisiológica. Em frutos com estágios mais avançados de desenvolvimento a casca fica aderida ao pergaminho. Queda prematura dos frutos frequentemente ocorre sob condições de alta severidade da doença.



**Figura 3:** Frutos de *C. canephora*, variedade clonal ‘Vitória’ (Clone CV3), mostrando sintomas de infecção causados por *C. cassiicola*.

Queda prematura de folhas, atraso no desenvolvimento das plantas, morte de estacas são comuns em viveiro de café do mesmo clone (Figura 4).



**Figura 4:** Mudas de *C. canephora* em viveiro, variedade clonal ‘Vitória’ (Clone CV3), mostrando sintomas de infecção causados por *Corynespora cassiicola*.

**Teste de patogenicidade:** Observações feitas ao microscópio estereoscópico evidenciaram a presença de estruturas reprodutivas isoladas e externas ao tecido do hospedeiro. Lâminas de raspagem foram preparadas e com base na morfologia dos conídios e conidióforos, observada ao microscópio óptico, o agente causal foi identificado como sendo *Corynespora cassiicola*.

Após isolamento do fungo em Agar-água (2%) e obtenção da cultura pura, conídios com a mesma morfologia foram produzidos em meio de cultura após um período de 12 dias de incubação a 26° C. Com base na morfologia dos conídios, o isolado foi identificado como *C. cassiicola*. A patogenicidade do fungo foi confirmada após inoculação dos discos de micélio em folhas saudáveis do respectivo clone. A presença de ferimentos não parece ser fator importante para a infecção. Tanto nas folhas que receberam ferimentos quanto nas folhas que não houve ferimento o fungo infectou as folhas do clone variedade clonal ‘Vitória’ (Clone CV3), (Figura 5).



**Figura 5:** Folhas de *C. canephora*, variedade clonal ‘Vitória’ (Clone CV3), com e sem ferimentos, inoculadas com discos de micélio do fungo mostrando sintomas de infecção causados por *C. cassiicola*.

Complementarmente ao teste de patogenicidade em folhas destacadas foi realizado o teste molecular. A presença de *C. cassiicola* foi evidenciada pela visualização da banda correspondente ao fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 272 bp.

## CONCLUSÕES

Este, portanto constitui o primeiro relato da ocorrência e confirmação da patogenicidade de *C. cassiicola*, causando intensa desfolha em plantas de *C. canephora* sob condições de campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ELLIS, M. B.; HOLLIDAY, P. *Corynespora cassiicola*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 303: 1–2. 1971.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. Fungal databases. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em 01 de Abril de 2009.
- FERRÃO, R.G.; FORNAZIER, M.J.; FERRÃO, M.A.G.; PREZOTTI, L.C.; FONSECA, A.F.A.; ALIXANDRE, F.T.; FERRÃO, L.F.V. Estado da arte da cafeicultura no Espírito Santo. In: TOMAZ, M.A.; AMARAL, J.F.T.; JESUS JUNIOR, W.C.; PEZZOPANE, J.R.M. (Eds.) **Seminário para a sustentabilidade da cafeicultura**. Centro de Ciências Agrárias, UFES, Alegre, ES. pp.29-47. 2008.
- QI, Y.X.; ZHANG, X.; PU, J.J.; XI, Y.X.; ZHANG, H.Q.; HUANG, S.L. & ZHANG, H.. Detection of *Corynespora cassiicola* in Hevea rubber tree from China. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 2, n. 1, p.153–155, 2007.