

HISTOPATOLOGIA DA INFECÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FOLHAS E FRUTOS DESTACADOS DE CAFEIEIRO¹

Daiana Alves da Silva², Michele Regina Lopes da Silva³, Viviani Vieira Marques⁴, Andrey Barboza Cordeiro⁵, Osvaldo Capello⁶, Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade⁷; Rui Pereira Leite Júnior⁸

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

²Pesquisador, M.Sc., bolsista Embrapa Café/ Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR daiagrouel2002@hotmail.com

³ Pesquisador, D.Sc., bolsista Embrapa Café/ Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, michele@iapar.br

⁴Pesquisador, D.Sc., bolsista Embrapa Café/ Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, viviani@iapar.br

⁵ Bolsista CIEE, Centro Universitário Filadelfia, Londrina, PR, abccordeiro@hotmail.com

⁶Técnico em microscopia eletrônica, Universidade Estadual de Londrina, ocape@uel.br

⁷Professor, D. Sc. Dpto de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, cgtardeli@uel.br

⁸Pesquisador, D.Sc., Instituto Agronômico do Paraná, Londrina - PR, ruileite@iapar.br

RESUMO: *Colletotrichum gloeosporioides* tem sido associado aos sintomas da antracnose nas folhas e frutos e mancha manteigosa em cafeeiro. Até o presente momento, estudos do patossistema *Colletotrichum* spp. e cafeeiro no Brasil estão sendo amplamente dirigidos à etiologia e patogenicidade do fungo bem como à caracterização de isolados. Entretanto, uma melhor compreensão dos eventos de pré-penetração, infecção e colonização do hospedeiro é fundamental para o estabelecimento de medidas de controle da doença. Este trabalho teve como objetivo estudar o processo de infecção do isolado I-12 de *C. gloeosporioides* em folhas e frutos de cafeeiro, pelo exame de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Folhas jovens e frutos verdes em estágio de expansão dos cultivares IPR-59 e IPR-103 foram inoculados com o isolado I-12 de *C. gloeosporioides* (10^6 conídios/ml). As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, às 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a inoculação, desidratadas por série alcoólica, secas ao ponto crítico, recobertas com ouro e observadas em MEV (FEI Quanta 200). A análise das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura possibilitou observar os processos de infecção do Isolado I-12 de *C. gloeosporioides* em folhas e frutos de cafeeiro destacados dos cultivares IPR 103 e IPR 59, sendo possível acompanhar durante os intervalos de tempo os eventos de pré-penetração, penetração e colonização dos tecidos. Foi possível também verificar que, nas amostras provenientes de frutos, o patógeno se desenvolveu de maneira diferenciada, sendo a emissão dos tubos germinativos mais rápida no cultivar mais susceptível, IPR 103, do que no mais resistente, IPR 59. Isso sugere que os mecanismos de resistência da planta podem se manifestar já na fase de pré-penetração, desacelerando o crescimento do patógeno.

Palavras chave: *Coffea arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, MEV.

HISTOPATHOLOGY OF *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* INFECTION ON COFFEE LEAVES AND FRUITS

ABSTRACT: *Colletotrichum gloeosporioides* have been associated with symptoms of anthracnose of leaf and fruits. Nowadays, the studies of *Colletotrichum* spp. pathosystem and coffee plantations in Brazil have been widely addressed to the etiology and pathogenicity of the fungus as well as to the characterization of isolates. The better understanding of the events of pre-penetration, infection and colonization is crucial for the establishment of disease control. This work was carried out with the objective to evaluate the infection process of the isolate I-12 of *C. gloeosporioides* on leaves and fruits of coffee by scanning electron microscopy (SEM) examination. Young leaves and green fruits of the cultivars IPR-59 and IPR-103 were inoculated with the I-12 isolate of *C. gloeosporioides* (10^6 conidia/ml). The samples were fixed in 2% glutaraldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide at 0, 3, 6, 12 and 24 hours after inoculation; dehydrated by alcohol series; dried at the critical point; coated with gold and observed by SEM (FEI Quanta 200). The analysis of images obtained by SEM enabled to observe the process of infection of the I-12 isolated of *C. gloeosporioides* on leaves and fruits of coffee in both cultivars, during several intervals of time after inoculation, covering the events of pre-penetration, penetration and colonization of tissues. It was also possible to verify that, in the samples from fruits, the pathogen developed differentially, being faster in the emission of the germ tubes in the cultivar more susceptible IPR 103 than the more resistant IPR 59. This suggests that the plant has some mechanisms of resistance already in the pre-penetration phase, decelerating the growth of the pathogen.

Key words: *Coffea arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, SEM

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Colletotrichum* ocorrem em cafeeiros em todas as regiões produtoras do mundo (MASABA; WALLER, 1992; SILVA et al., 2006). Os sintomas caracterizam-se principalmente pela formação de lesões deprimidas em frutos verdes, com a presença de esporos de coloração laranja, sendo que estas lesões se expandem rapidamente, e podem atingir as sementes. Também são observadas seca de ramos e ponteiros e mancha manteigosa nas folhas (HINDORF, 1975; MASABA; WALLER, 1992; PARADELA-FILHO, 2001).

Nos últimos anos, estudos da interação *Colletotrichum* spp. x cafeeiro realizados tem sido amplamente dirigidos à etiologia e patogenicidade do fungo e à caracterização de isolados. No entanto, ainda existem dúvidas quanto à confirmação do patossistema, devido à dificuldade no estabelecimento e reprodução *in vivo* dos sintomas associados ao fungo nos diferentes tecidos de cafeeiro (NECHET; ABREU, 2002; DORIZZOTO, 1993; OROZCO-MIRANDA, 2003; ZAMBOLIM et al., 2003).

Neste contexto, se faz necessário elucidar a relação do fungo *Colletotrichum* com a cultura do café no Brasil. Sendo imprescindível esclarecer se os sintomas em questão são realmente causados pela espécie fúngica. Pereira (2005) por meio de estudos histopatológicos constatou que frutos de cafeeiro com mancha manteigosa apresentam alta colonização por *C. gloeosporioides*, bem como ramos com secas descendentes apresentam o xilema, floema e o tecido corticoso colonizados por esta espécie, inferindo, portanto, que *C. gloeosporioides* é o agente causal da seca de ponteiros. Lins et al. (2007) realizaram estudo detalhado de microscopia eletrônica, acompanhando os processos de pré e pós-penetração de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas de cafeeiro obtidas por cultura de embrião e reportaram a capacidade de infecção de *C. gloeosporioides* em tecidos de cafeeiro.

Com isso a melhor compreensão dos eventos de pré-penetração, infecção e colonização do hospedeiro é fundamental para o estabelecimento de medidas de controle da doença. Este trabalho teve como objetivo estudar o processo de infecção do isolado I-12 de *C. gloeosporioides* em folhas e frutos de cafeeiro destacados, pelo exame de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas jovens e frutos verdes em estágio de expansão dos cultivares IPR-59 e IPR-103 foram desinfestados superficialmente por tratamento sequencial em soluções de etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 1% por um minuto e água destilada autoclavada por um minuto.

As amostras foram feridas com agulha esterilizada e inoculadas por deposição de uma alíquota de 10 µl de suspensão de conídios do isolado I-12 de *C. gloeosporioides* (10⁶ conídios/ml). As amostras foram mantidas em câmara úmida a 25°C e fragmentos da região inoculada foram extraídos nos intervalos de tempo pré-fixados a 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a inoculação.

O processamento e análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2%, tampão fosfato de sódio 0,1 M) por um período de 24 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas por série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e 100%), sendo realizadas 3 lavagens por 15 minutos cada. Foram secas ao ponto crítico no aparelho Critical Point Dryer (Baltec-Balzers CPD 030); recobertas com 25 nm de ouro no equipamento Sputter Coater (Baltec-Balzers SCD 050) e observadas em MEV (FEI Quanta 200).

RESULTADO E DISCUSSÕES

Foi possível verificar a aderência dos conídios dos dois cultivares avaliados imediatamente após a inoculação apenas nas amostras dos frutos e preferencialmente próximos aos estômatos e nas cavidades epiteliais. Também foi observada a presença de mucilagem na superfície conidial (Figura 1A).

Após 3 horas de inoculação foi observada a presença de conídios septados e início da emissão de tubos germinativos em ambos os tratamentos (Figura 1B). Isso explica o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno que depois de reconhecer os sinais da superfície da planta como a presença de açúcares fenóis e vários outros compostos voláteis começa a induzir a diferenciação celular e expressar seus genes de patogenicidade, assim como, direcionar seus tubos germinativos nas superfícies foliares reconhecendo arranjos de paredes anticlinais e aberturas estomáticas.

Às 6 horas após a inoculação foi verificado início de colonização do tecido foliar por hifas mais longas, assim como o seu desenvolvimento em direção aos estômatos. Pelas observações das amostras de frutos pôde-se verificar que o patógeno se desenvolveu de maneira diferenciada nos dois cultivares, sendo que no cultivar mais susceptível, IPR 103, houve maior rapidez na emissão dos tubos germinativos, sugerindo que os mecanismos de resistência da planta podem se manifestar já na fase de pré-penetração, desacelerando o crescimento (Figura 1C e 1D).

Com 12 horas após a inoculação foi possível observar a presença de apressório apenas nas amostras de frutos (Figura 1E). E às 24 horas após a inoculação da folha foi possível observar a formação de apressório, colonização superficial e penetração do fungo (Figura 1 F).

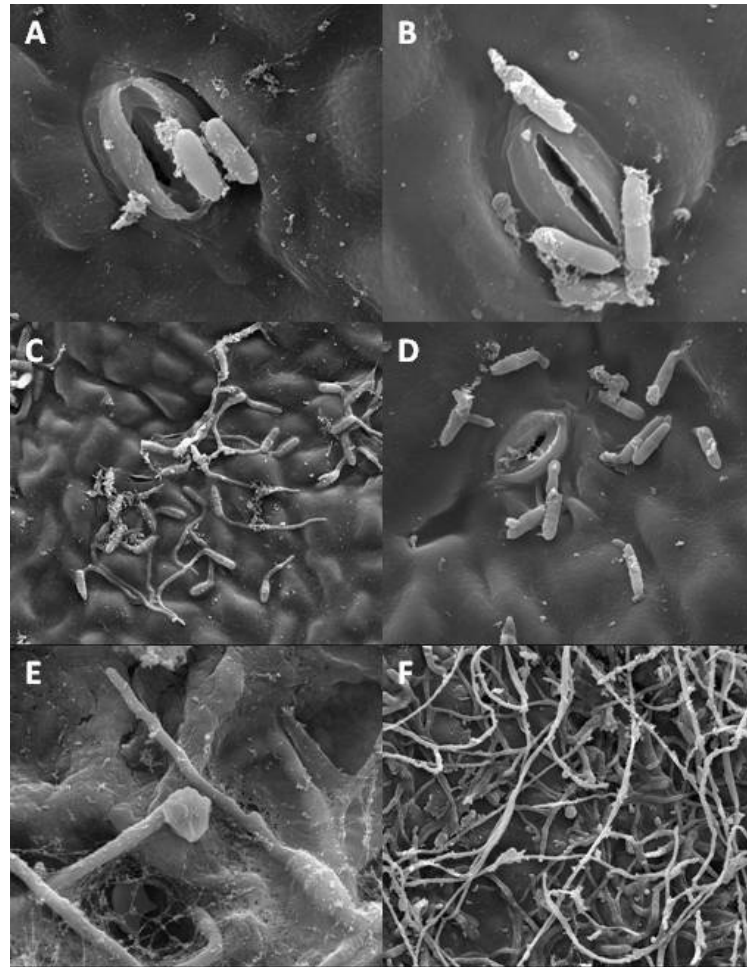


Figura 1. Eletromicrografia de varredura de folhas e frutos destacados de cafeeiro inoculados com *C. gloeosporioides*. **A.** Segmento superficial do fruto logo após inoculação; aumento de 6000x. **B.** Segmento superficial do fruto às 3 horas após inoculação; aumento de 6000x. **C.** Segmento superficial de fruto do cultivar IPR 103 às 6 horas após inoculação; aumento de 1600x. **D.** Segmento superficial de fruto do cultivar IPR 59 às 6 horas após inoculação; aumento de 3000x. **E.** Presença de apressório às 12 horas após a inoculação; aumento de 6000x. **F.** Colonização do tecido às 24 horas após a inoculação; aumento de 1600x.

CONCLUSÕES

A análise das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura possibilitou observar os processos de infecção do Isolado I-12 de *C. gloeosporioides* em folhas e frutos de cafeeiro destacados dos cultivares IPR 103 e IPR 59, sendo possível acompanhar durante os intervalos de tempo os eventos de pré-penetração, penetração e colonização dos tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORIZZOTO, 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) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- HINDORF, H. *Colletotrichum* Occurring on *Coffea arabica* a Review. **Journal of Coffea Research**, v.5, p.43-56, 1975.
- LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.488-495, 2007.
- MASABA, D.; WALLER, J. M. Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control.*** England, CAB International, p.237-249, 1992.
- NECHET, K. L.; ABREU, M. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, p.1135-1142, 2002.
- OROZCO-MIRANDA, E. F. O. **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.

PARADELA FILHO, O.; PARADELA, A. L.; THOMAZIELLO, R. A.; RIBEIRO, I. J. A.; SUGIMORI, M. H.; FAZUOLI, L. C. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: Instituto Agrônomo, Boletim Técnico IAC, n.191, 2001.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, M. C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; AZINHEIRA, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, p.119-147, 2006.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Produção integrada do cafeeiro: manejo de doenças. In: ZAMBOLIM, L. **Produção integrada do café**. Viçosa: UFV, 2003