



**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO**  
*Colletotrichum gloeosporioides* PENZ X MUDAS MICROPROPAGADAS  
**DE CAFEEIRO (*COFFEA ARÁBICA*).**

**FERNANDA GONÇALVES MARTINS**

**2008**

**FERNANDA GONÇALVES MARTINS**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO  
*Colletotrichum gloeosporioides* PENZ X MUDAS MICROPROPAGADAS  
DE CAFEIEIRO (*COFFEA ARÁBICA*).**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

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

**LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
JULHO-2008**

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

Martins, Fernanda Gonçalves.

Aspectos epidemiológicos e fisiológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ x mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica*). / Fernanda Gonçalves. – Lavras : UFLA, 2008.

56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. *Colletotrichum gloeosporioides*. 3. Resposta de defesa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.473

**FERNANDA GONÇALVES MARTINS**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO  
*Colletotrichum gloeosporioides* PENZ X MUDAS MICROPROPAGADAS  
DE CAFEIEIRO (*COFFEA ARÁBICA*).**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA Em 31 DE julho de 2008

Dra.Regina Cássia Ferreira Ribeiro – UNIMONTES

Dr. Eduardo Alves – UFLA

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

**LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
JULHO-2008**

A **DEUS** pela presença e proteção em todos os momentos  
Aos meus pais, **MARIA** e **JOSÉ** (in memorian), pelo inicio de tudo  
A meu irmão **ROSIVALDO**, pela continuidade dos laços

## **DEDICO**

Ao meu noivo **JADER**, pela paciência e pelo amor incondicional.  
As minhas irmãs **ROSE**, **LUCIANA** e **MEIRE**, pelo amor e compreensão.  
A todos os meus sobrinhos **CADU**, **BÁRBARA**, **KAIQUE**, **RYAN**, **DIEGO** ,  
**MARIA EDUARDA** e **EMANUELA** , pelo amor e carinho.

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida e pelo aporte de luz ao longo destes anos.

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

Ao conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao professor Mário Sobral de Abreu, pela orientação oportuna, disponibilidade constante, confiança e exemplo de equilíbrio.

A Doutora Regina Cássia Ferreira Ribeiro, por tudo que me ensinou, e pelos puxões de orelhas dado na minha graduação e ter aceito o convite de participar da banca de avaliação.

Aos professores Mário Lúcio Vilela de Resende e Eduardo Alves, pela disponibilidade e por terem aceitado participar da avaliação do meu trabalho.

Aos demais professores do departamento pelos conhecimentos transmitidos.

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

A secretária e amiga Renata Kelly Resende, pela amizade, companheirismo, atenção e alto astral.

Aos funcionários do Departamento Ana Maria, Eliane, Heloísa, Ruth, Leia, Vladimir e Rosângela, pela atenção e ótima convivência.

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

Ao professor Evaristo Mauro filho do departamento de fisiologia vegetal, por ter me recebido em seu laboratório e pela contribuição.

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

Aos amigos Eudes, Diego, Rejane, Luciane, Daniel, Jadir, Elma e Cleilton pelo companheirismo.

Aos demais colegas do departamento pela boa convivência.

As minhas amigas Nuza, Cleuza, Duda e ao amigo Mário, que mesmo de longe estão no meu coração e sempre me dando muita força para agüentar os trancos.

A amiga Tânia pela ajuda e paciência na pior parte do trabalho (estatística).

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

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Aos meus irmãos de laboratório, Jucilayne, Rosana, Cláudio e o Bruno, por toda ajuda, carinho, amizade e companheirismo.

À minha amiga Lahyre pela companhia, amizade, cumplicidade e atenção.

Ao Pedro, pela ajuda incondicional, paciência (às vezes) carinho e amizade.

Muito obrigada!

“ó profundidade da riqueza da sabedoria e do conhecimento de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos e inescrutáveis os seus caminhos! Quem conheceu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Quem primeiro lhe deu para que ele o recompense? Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre!

“Amém.”

Rm 11.33-36  
Bíblia Sagrada, Nova Versão  
Internacional, 2000.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	3
<b>ARTIGO 1:</b> Incidência e severidade da mancha manteigosa em mudas de café micropropagadas e inoculadas artificialmente com isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Penz.....	4
<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	9
Obtenção de plantas a partir de cultura de tecido de embriões zigóticos.....	9
Obtenção de isolados e inoculação.....	10
Observações ao microscópio ótico: Germinação e formação de apressórios.....	11
Avaliação da incidência e severidade da doença.....	12
Delineamento experimental.....	12
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	14
Germinação e formação de apressórios.....	14
Avaliação da incidência e severidade da doença.....	18
<b>CONCLUSÕES</b> .....	24
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	25
<b>ARTIGO 2:</b> Quantificação de pigmentos, fenóis solúveis totais e teor de lignina solúvel em mudas de cafeeiros inoculadas com diferentes isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.....	30
<b>RESUMO</b> .....	31
<b>ABSTRACT</b> .....	32
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35

Obtenção de plantas a partir de cultura de tecido de embriões zigóticos.....	35
Obtenção de isolados e inoculação.....	36
Coleta de tecido vegetal.....	37
Determinação de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , e total .....	37
Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais.....	38
Determinação de fenóis solúveis totais.....	38
Determinação de lignina.....	39
Análise dos dados.....	40
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
Quantificação de pigmentos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , e total).....	41
Determinação de Lignina.....	44
Determinação de Fenóis totais.....	47
<b>CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	54

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**MOSPCSM** – Mudanças obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa (Plantas doentes).

**MOSPSSM** – Mudanças obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa (Plantas saudáveis).

**DAI** – Dias após inoculação

## RESUMO

MARTINS, F.G. **Aspectos epidemiológicos e fisiológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ x mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 2008. 56 p. Dissertação (Mestre em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar os aspectos da infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* - isolado da haste e seca de ponteiro de cafeeiro e folhas de mangueira; estudar o quadro sintomatológico do patossistema mancha manteigosa x cafeeiro através da avaliação da incidência e severidade da doença; observar o caráter de suscetibilidade entre MOSPCSMM (Mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa) e MOSPSSMM (Mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa); confirmar a relação entre *C. gloeosporioides* e a seca de ponteiros e observar em diferentes tempos, determinar os efeitos de isolados de *C. gloeosporioides* sobre os teores de pigmentos (clorofila a, b e total), fenóis solúveis totais e lignina solúvel em mudas de café obtidas por cultura de tecidos e inoculadas artificialmente. Os experimentos foram conduzidos em DIC e em DBC. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de  $2 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> sobre a área foliar. A porcentagem de germinação conidial e formação de apressórios foram estimadas a 6, 12, 18, 24, e 48 horas após a inoculação. As avaliações da incidência e severidade foram realizadas a cada 5 dias, iniciando-se aos 7 dias após a inoculação, com duração de 30 dias. Aos 3 e 7 dias após inoculação foram quantificados os teores de pigmentos, fenóis e lignina. O início da germinação ocorreu entre 6 e 12 horas após a inoculação quando alguns conídios emitiam um ou dois tubos germinativos. Entre os isolados estudados pôde-se verificar que houve diferença significativa a 1% de significância pelo teste de Scott-Knott, mostrando dessa forma que houve diferença no potencial germinativo entre os isolados em MOSPSSMM. Em relação às MOSPCSMM não houve diferença significativa entre os isolados estudados, os mesmos apresentaram efeitos semelhantes sobre a germinação média de conídios. A formação de apressórios se deu a partir das seis horas após a inoculação.

MOSPSSMM e MOSPCSMM mostraram-se resistentes ao isolado I, susceptíveis e moderadamente susceptíveis ao isolado II. Em relação ao isolado III, as MOSPCSMM mostraram-se susceptíveis, enquanto que MOSPSSMM mostraram-se moderadamente susceptíveis. Os primeiros sintomas de necrose nas folhas de mudas provenientes de MOSPCSMM e MOSPSSMM, só foram observados a partir do sétimo dia após inoculação. A presença do patógeno

diminuiu significativamente os teores de clorofila, em relação aos tempos estudados nos dois materiais genéticos avaliados.

Aos 7 dias após inoculação de plantas de café sadias e doentes pôde ser observado um maior teor de fenóis solúveis totais e lignina solúvel em resposta ao ataque de *C. gloeosporioides*.

Palavras chaves: *Coffea arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides* e resposta de defesa.

---

**Comitê de Orientação:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)

## ABSTRACT

MARTINS, F.G. **Epidemic and physiologic aspects of the interaction of *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ x micropropagated seedlings of coffee (*Coffea arabica*)**. 2008. 56 p. Dissertation (Master in plant pathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

This work was accomplished with the objective of studying the aspects of the infection of *Colletotrichum gloeosporioides* - isolated from stem and die back of coffee plants and leaves of mango; to study the development of symptoms of the pathosystem butterfly x coffee plants through the evaluation of the incidence and severity of the disease; to observe the character of susceptibility between MOSPCSMM and MOSPSSMM; to confirm the relationship between *C. gloeosporioides* and die back in plants obtained by tissue culture and to observe in different times, to determine the isolated effects of *C. gloeosporioides* on the of pigments' contents (chlorophyll the, b and total), total soluble phenols and soluble lignin in seedlings of coffee obtained by tissue culture and artificially inoculated. The experiments were carried out in DIC and in DBC. The plants were inoculated with a suspension of  $2 \times 10^6$  conidia.ml<sup>-1</sup> on the foliate area. The percentage of germination conidial and apressoria formation were evaluated at 6, 12, 18, 24, and 48 hours after the inoculation. The evaluations of the incidence and severity were accomplished at 5 days intervals, it of beginning 7 days after the inoculation with duration of 30 days. AT 3 and 7 days after inoculation were quantified contents of pigments of phenols and lignin. The spores' germination occurred between 6 and 12 hours after the inoculation when some conidia emitted one or two germ tubes. We verified that there was significant difference to 1% of significance for the Scott-Knott test between isolated studied in this work. Besides, it showed that there was difference in the germination between isolated of MOSPSSMM. In additional there was not significant difference between isolated of MOSPCSMM studied, they presented similar effects on the medium germination of conidia. The apressoria formation was observed 6 hours after inoculation. MOSPSSMM and MOSPCSMM showed resistant to the isolated I, susceptible and moderately susceptible to isolated II. MOSPCSMM were susceptible to isolated III, while MOSPSSMM were moderately susceptible. The first necrosis symptoms in the leaves seedlings from MOSPCSMM and MOSPSSMM were only observed at seventh day after inoculation.

The pathogens' presence reduced the contents chlorophyll significantly, in the times and in the two genetic materials studied. At 7 days after inoculation of healthy and diseased plants of coffee we observed larger contents of total soluble phenols and soluble lignin in response to the attack of *C. gloeosporioides*.

Key words: *Coffea Arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides* and response defense.

## INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do café destaca-se historicamente no desenvolvimento do país. O Brasil se destaca como o maior produtor e exportador mundial, com área cultivada de 2,30 milhões de hectares, dos quais 2,14 milhões estão em produção e 169,00 mil em formação (Conab, 2008). O estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor de *Coffea arabica* com aproximadamente 1,15 milhões de hectares e produção estimada em 15,5 milhões de sacas para a safra 2007/2008, perfazendo 45,9% da produção nacional (Conab, 2008).

Nos países produtores, a cultura do café é afetada por diversos problemas fitossanitários que causam perdas quando não tomadas medidas eficazes de controle. No continente Africano, *C. kahawae* ocasiona a “Coffee Berry Disease”, CBD, que ataca bagas verdes em desenvolvimento e é o principal fator limitante à produção, com redução na produtividade entre 50% a 80%. Orozco (2003) mencionam que esta espécie patogênica de *Colletotrichum* está restrita à África.

No Brasil, distintos problemas fitossanitários acometem a cultura do café. Dentre eles as antracnoses e a mancha manteigosa (Complexo *Colletotrichum*), a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), a mancha de phoma (*Phoma spp.*), a bacteriose (*Xylella fastidiosa*) e as viroses entre outras (Chalfoun, 1997). E dentre estas, há um interesse especial no estudo do complexo *Colletotrichum* – cafeeiro, sendo este composto por várias espécies do patógeno (Orozco *et al.* 2003). No país a espécie *gloeosporioides*, pode causar as antracnoses, a seca de ponteiros e a mancha manteigosa. A mancha manteigosa é uma doença com uma baixa progressão no tempo e espaço (Ferreira, Pereira & Abreu, dados não publicados), entretanto, altamente deletéria aos cafeeiros infectados (Ferreira *et al.*, 2005). A gravidade desta doença pode ser demonstrada pela morte de hipocótilos, mumificação e



abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos, levando a uma diminuição progressiva na produtividade, culminando inclusive, com a morte dos cafeeiros infectados.

*Colletotrichum* spp. é um importante gênero fúngico que abrange espécies saprófitas e fitopatogênicas associadas a plantas no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Bailey *et al.*, 1992). O patógeno causa perdas econômicas em várias culturas, podendo afetar as plantas em todos os estágios de desenvolvimento.

A ocorrência de *Colletotrichum* é grave nas regiões cafeeiras no Brasil, principalmente quando se trata da mancha manteigosa, determinando perdas significativas de produções pelo ataque nos frutos verdes, gerando mumificações com conseqüente queda dos mesmos. Pesquisas orientadas para o estudo de raças de *Colletotrichum*, patogenicidade e estudos epidemiológicos, grau de susceptibilidade, assim como mecanismos envolvidos na defesa do cafeeiro a esse patógeno são necessárias, pois problemas econômicos sérios podem ser ocasionados caso a doença venha a tornar-se epidêmica.

Desta forma objetivou-se, neste trabalho: a) observar os aspectos da infecção de *C. gloeosporioides* - isolado da haste e seca de ponteiro de cafeeiros e folhas de mangueira; estudar o quadro sintomatológico do patossistema mancha manteigosa x cafeeiro através da avaliação da incidência e severidade da doença, observar o caráter de suscetibilidade entre planta sadia e doente e confirmar a relação entre *C. gloeosporioides* e a seca de ponteiros em mudas de café obtidas por cultura de tecidos. b) estudar os efeitos de diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes tempos sobre os teores de pigmentos (clorofila a, b e total), fenóis solúveis totais e lignina solúvel em mudas de café obtidas por cultura de tecido inoculadas artificialmente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallington: CAB International, 1992. p. 88-120.

CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93 p.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Safra de café 2007-2008 – Terceiro Levantamento (Março 2008)**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29 n. 4 p. 880-885 jul./ago. 2005.

OROZCO MIRANDA, E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OROZCO MIRANDA, E. F.; RIBEIRO, A.; JULIATTI, F. CÉZAR; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. e *Colletotrichum kahawae* obtidos de cafeeiro por meio de marcadores RAPD e SSR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 222, 2003b. Suplemento.

## ARTIGO 1

### **Incidência e severidade da mancha manteigosa em mudas de café micropropagadas e inoculadas artificialmente com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Penz..**

(Preparado de acordo com as normas da revista “Pesquisa Agropecuária Brasileira” exceto as citações (NBR 10520) e as referencias bibliográficas (NBR 6023).

Fernanda G. Martins<sup>1</sup>, Claudio Ogoshi<sup>1</sup>, Rosana O.Pierre<sup>1</sup>, Jucilayne F. Vieira<sup>1</sup>,  
Tânia Nepomucena<sup>1</sup>, Bruno Marques da Sila<sup>1</sup>, Mario S. Abreu

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa postal 3037, Lavras, MG, Brasil, e-mail: feagrosal@yahoo.com.br;

(Aceito para publicação em / / )

Autora para correspondência: Mario Sobral de Abreu

---

Martins, F.G., Ogoshi.C., Pierre,R.O., Vieira. J.F., Nepomucena.T., Silva,M,B.,  
Abreu, M.S. **Incidência e severidade da mancha manteigosa em mudas de  
café micropropagadas e inoculadas artificialmente com isolados de  
*Colletotrichum gloeosporioides*. Penz.** Pesquisa Agropecuária Brasileira.

## RESUMO

Objetivou-se, neste trabalho, observar aspectos da infecção de *C. gloeosporioides* isolado da haste e seca de ponteiro do cafeeiro e folhas de mangueira; estudar o quadro sintomatológico do patossistema mancha manteigosa x cafeeiro por meio da avaliação da incidência e severidade da doença, observar o caráter de suscetibilidade entre MOSPCSMM e MOSPSSMM e confirmar a relação entre *C. gloeosporioides* e a seca de ponteiros em mudas de café obtidas por cultura de tecidos. O experimento foi conduzido em DIC no esquema fatorial 2 x 3 {2 materiais genéticos (Catucaí MOSPCSMM e MOSPCSMM ) e 3 isolados}, com 5 repetições. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de  $2 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> depositadas sobre discos autocolantes. A porcentagem de germinação conidial e formação de apressórios foram estimadas as 6, 12, 18, 24, e 48 horas após a inoculação. As avaliações da incidência e severidade foram realizadas a cada cinco dias, iniciando-se aos 7 dias após a inoculação com duração de 30 dias. O início da germinação ocorreu entre 6 e 12 horas após a inoculação tanto em MOSPCSMM quanto em MOSPSSMM, quando alguns conídios emitiam um ou dois tubos germinativos. Pôde-se verificar que houve diferença no potencial germinativo entre os isolados em MOSPSSMM. Quanto à formação de apressórios, esta se deu a partir das seis horas após a inoculação, sendo observado um número expressivo a partir das 18 horas após inoculação, tanto em MOSPCSMM quanto em MOSPSSMM. Com base nos critérios de susceptibilidade, os dois materiais genéticos mostraram-se resistente ao isolado I e susceptível ao isolado II. Já para o isolado III, MOSPCSMM mostraram-se susceptíveis, enquanto que em MOSPSSMM o efeito do isolado foi diferente, mostrando-se moderadamente susceptível. Em relação à incidência e severidade da doença, pôde-se verificar que o isolado II foi mais agressivo nos materiais genéticos estudados. A relação *C. gloeosporioides* e a seca de ponteiros em mudas de café não foi totalmente evidente, deixando ainda dúvidas se a mancha manteigosa está associada à seca de ponteiros ou a outros sintomas observados na planta.

Palavras chaves: *Coffea arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, mancha manteigosa.

## ABSTRACT

The objectives of this work were to observe aspects of the infection of strains of *C. gloeosporioides* isolated from stem and die back of coffee plants and from leaves of mango; to study development of symptoms of the pathosystem butterfly spot x coffee plants through of the evaluation of the incidence and severity of the disease, to observe the character of susceptibility between healthy and diseased plants and to confirm the relationship between *C. gloeosporioides* and die back in plants obtained by tissue culture. The experiment was carried out in DIC factorial arrangement 2 x 3 {2 genetic materials (MOSPCSMM and MOSPCSMM) and 3 isolated} with 5 repetitions. The plants were inoculated with  $2 \times 10^6$  conidia.ml<sup>-1</sup> spore suspension deposited on adherence disks. The percentage of conidial germination and formation of aressoria were estimated at 6, 12, 18, 24, and 48 hours after inoculation and the evaluations of the incidence and severity were accomplished at 5 days intervals. This evaluation began 7 days after inoculation with duration of 30 days. The spores' germination occurred between 6 and 12 hours after inoculation in diseased and in healthy plants, when some conidia emitted one or two germ tubes. We verified that there was no germ potencial difference between isolated in healthy plants. The aressoria formation began 6 hours after inoculation and the expressive number aressoria was observed 18 hours after inoculation in healthy plants in diseased plants. On the basis of the susceptibility's criteria, healthy and diseased plants were revealed resistant to the isolated I and susceptible to the isolated II. The plants showed susceptible to the isolated III. Whereas, the isolate effect in healthy plants was different showing considered moderately susceptible. In relation to the incidence and severity of the disease, it could be verified that isolated the II were more severe in the genetic materials studied. However, this isolated showed more aggressive when inoculated in diseased plants. The relationship between *C. gloeosporioides* and die back was not totally evident, it leaves still doubts if the butterfly spot is associated with die back or to other symptoms observed in the plants.

Key words: *Coffea Arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, butterfly spot.

## INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma das mais importantes atividades agrícolas do Brasil, especialmente pela geração de emprego e renda em municípios interioranos dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia e Rio de Janeiro entre outros. O estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor de *Coffea arabica* com aproximadamente 1,15 milhões de hectares e produção estimada em 15,5 milhões de sacas para a safra 2007/2008, perfazendo 45,9% da produção nacional (Conab, 2008).

Uma série de fatores, no entanto podem colaborar para baixas produtividades, especialmente as doenças. A cultura do café pode ser acometida por diversas doenças tais como: ferrugem (*Hemileia vastatrix*) (Chalfoun, 1997), as antracnoses, a mancha manteigosa (Complexo *Colletotrichum*) (Dorizotto e Abreu, 1993a, b), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) (Miguel et al., 1975), e a mancha de phoma (*Phoma spp.*).

Dentre estas doenças, há um interesse especial no estudo do complexo *Colletotrichum* – cafeeiro, sendo este composto por várias espécies do patógeno (Orozco et al., 2003b).

No Brasil predomina a espécie *C. gloeosporioides* Penz., que pode causar as antracnoses, a seca de ponteiros e a mancha manteigosa. A mancha manteigosa é uma doença altamente deletéria aos cafeeiros infectados (Ferreira et al., 2004), demonstrada pela morte de hipocótilos, abscisão de folhas e mumificação de frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos, levando a uma diminuição progressiva na produtividade, culminando com a morte dos cafeeiros infectados. A seca de ponteiros ou *dieback* é outra doença causada por *C. gloeosporioides* (Gutierrez, 1954; Paradela Filho et al., 2001; Voltan et al., 2002), mas é considerada por alguns pesquisadores como um

complexo de tensões da própria planta e do ambiente e, portanto, de origem abiótica (Rena e Maestri, 1985).

No complexo *Colletotrichum* x cafeeiro, poucos são os estudos no que se referem à sintomatologia e agressividade do patógeno em plantas infectadas, havendo inclusive, dúvidas em relação aos sintomas observados em folhas, frutos, hastes e hipocótilos plantas de café e a mancha manteigosa.

Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, observar aspectos da infecção de *C. gloeosporioides* isolado da haste e seca de ponteiro do cafeeiro e folhas de mangueira; estudar o quadro sintomatológico do patossistema mancha manteigosa x cafeeiro por meio da avaliação da incidência e severidade da doença, observar o caráter de suscetibilidade entre MOSPCSMM e MOSPSSMM e confirmar a relação entre *C. gloeosporioides* e a seca de ponteiros em mudas de café obtidas por cultura de tecidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas do Departamento de Fitopatologia - DFP e Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura - DAG da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

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

Frutos de café (*C. arabica*) da cultivar Catucaí Vermelho, com e sem sintomas da mancha manteigosa, em estágio verde-cana, foram colhidos, lavados e desinfestados com álcool 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2% durante 15 minutos, e em seguida lavados três vezes com água destilada e esterilizada. Posteriormente, com o auxílio de pinça, bisturi e lupa, os embriões foram excisados e depositados em tubos de ensaio com 15 ml de meio de cultura. Utilizou-se o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 1 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 300 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de giberelina com pH ajustado para 5,8 e solidificado com 6 g.L<sup>-1</sup> de agar (Ribeiro *et al.*, 2003). As culturas de embriões foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±1 ° e fotoperíodo de 16 horas. Transferência das plântulas para outros tubos com o mesmo meio de cultura ocorreu a cada dois meses, até que estas plântulas estivessem aptas para a aclimação.

A aclimação foi feita conforme trabalho publicado por Carvalho *et al.* (1999). Plântulas com aproximadamente 2 a 3 cm de comprimento foram retiradas dos tubos de ensaio e transferidas para bandeijas de polipropileno com células de 11 x 5 x 5 cm contendo vermiculita. Estas foram acondicionadas em câmara de crescimento com aproximadamente 90% de umidade relativa do ar, temperatura média próxima de 25° C, sistema de nebulização automático e



iluminação natural. O fornecimento de nutrientes foi realizado semanalmente com a aplicação de 1 ml de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) por plântula, iniciando no dia do plantio e estendendo-se até o período de inoculação.

### **Obtenção de isolados e inoculação**

Os isolados utilizados para a execução deste trabalho foram obtidos de mudas provenientes de cafeeiros com e sem sintomas da mancha manteigosa do campo experimental da UFLA e de plantas de mangueira e isolados no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Enfermidade de Plantas do Departamento de Fitopatologia. Estes isolados foram obtidos de hastes de cafeeiros com sintomas de mancha manteigosa (I3); ponteiros de cafeeiros sem sintomas de mancha manteigosa, mas com seca de ponteiro (I2) e de folhas de mangueira com sintomas de antracnose (I1). Partes do tecido infectado foram superficialmente desinfestados com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por um minuto, lavados em água e secos ao ar livre. Em seguida os mesmos foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura MEA 2% (extrato de malte agar) e cloranfenicol. As placas foram incubadas por sete dias em BOD a 22° C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias purificadas foram utilizadas para obtenção de culturas monospóricas.

Isolados de *C. gloeosporioides* foram mantidos e crescidos em meio de cultura MEA 2%. Suspensões de conídios foram preparadas pela raspagem de conídios com auxílio de uma alça de Drigalsky e água destilada esterilizada (ADE) seguida pela filtragem em gaze esterilizada. A concentração utilizada foi de  $2 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>, a qual foi calculada com o auxílio de uma lâmina de contagem (câmara de Newbauer).

A inoculação foi feita em folhas novas completamente expandidas de cafeeiros formados sob condições controladas. Três dias antes da inoculação, estas plantas foram submetidas a condições de câmara úmida, feita com o auxílio de sacos plásticos e mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 30°C. Uma suspensão de conídios de cada isolado foi inoculada com uma gota de 10 µl na parte abaxial das folhas, em locais marcados com o auxílio de discos autocolantes com orifícios de 1,4 cm de diâmetro e previamente feridas. Foram utilizados 3 discos por folha. Posteriormente, sobre a área inoculada, foi colocado um disco de papel semipermeável com 1,3 cm de diâmetro, previamente umedecida, formando-se assim uma microcâmara úmida (Abreu, 1978, 1988). Sendo que desta solução de conídios foi retirada uma pequena alíquota desta suspensão para realização do teste de germinação.

#### **Observações ao microscópio ótico: Germinação e formação de apressórios**

Porcentagem de germinação conidial e formação de apressórios em discos foram estimadas às 6, 12, 18, 24 e 48 horas após a inoculação seguindo o método descrito por Abreu (1978). Após o tempo de coleta, as microcâmaras úmidas foram removidas, as folhas foram secas ao ar e posteriormente foi aplicada uma camada de esmalte incolor diluído na proporção de 1:0,8 em acetona, cobrindo a área delimitada pelo disco autocolante. As películas de esmalte já secas, foram retiradas e estendidas em lâminas microscópicas e coloridas com azul-algodão em lactofenol. A porcentagem de conídios germinados e não germinados e apressórios formados em conídios germinados foram contados em pelo menos quatro campos da lâmina perfazendo no mínimo 100 conídios em cada lâmina.

### **Avaliação da incidência e severidade da doença**

Após as inoculações foram avaliadas durante 27 dias a incidência e a severidade da doença em cada folha seguindo-se a escala adaptada por Várzea (1995) e modificada por Martins e Abreu (Tabela 1). Foram feitas as avaliações a cada cinco dias a partir do aparecimento dos primeiros sintomas (sete dias após a inoculação)

**TABELA 1.** Escala de avaliação utilizada em testes de inoculação de *Colletotrichum* spp. em hipocótilos (escala adaptada por Várzea, 1995 e modificada por Martins e Abreu).

<b>Classe</b>	<b>Tipo de reação descrição</b>
0	Ausência de reação visível
1	Pequenas e poucas (1 a 2) lesões cloróticas ou acastanhadas.
2	Mais de 2 lesões acastanhadas ou lesões coalescentes. O diâmetro da lesão excede 0,5 mm.
3	Extensas lesões acastanhadas com numerosos pontos pretos e/ou lesões obscuras. Com mais de 50% da área do disco lesionada
4	Área total do disco lesionada (100%)

A interpretação dos resultados foi efetuada por meio do Índice de Intensidade de Doença (IID), calculado pela fórmula:

$$\text{IID} = \frac{\sum (\text{N}^\circ \text{ de discos em cada classe} \times \text{valor numérico de cada classe}) \times 100}{\text{Número de discos em todas as classes} \times 4}$$

De acordo com os valores obtidos para o IID, os materiais genéticos avaliados com os isolados testados foram classificados nas seguintes classes de

suscetibilidade: resistente (R)  $IID \leq 0,25$ ; moderadamente resistente (MR)  $0,25 < IID \leq 0,50$ ; moderadamente suscetível (MS)  $0,5 < IID \leq 0,75$  e suscetível  $> 0,75$ . Também após as avaliações, foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) e da incidência (AACPI), para cada tratamento, determinada pela equação proposta por Shaner & Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=0}^{n-1} [(x_i + x_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)]$$

Em que:

AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença

$Y_i$  = proporção da doença na  $i$ -ésima observação

$T_i$  = tempo em dias na  $i$ -ésima

$n$  = número de observações

### **Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi em DIC no esquema fatorial 2 x 3 {2 materiais genéticos (MOSPCSMM e MOSPSSMM) e 3 isolados} com cinco repetições. A parcela para a germinação consistiu de um disco com 100 conídios. Os resultados foram comparados dentro de cada tempo pelo teste de F a 5% de significância. E, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 1% e 5% de significância. No caso da incidência e severidade foi plotada a área abaixo da curva de progresso da doença.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Germinação e formação de apressórios

Não houve interação significativa ( $P>0.05$ ) dos isolados em relação ao tempo. Logo isolados e tempo agem de modo independente sobre a germinação média de conídios.

O início da germinação ocorreu entre 6 e 12 horas após, a inoculação, tanto em MOSPCSMM quanto em MOSPSSMM quando alguns conídios emitiam um ou dois tubos germinativos. 12 horas após inoculação já foi verificado um número mais expressivo de conídios germinados (Fig. 1).

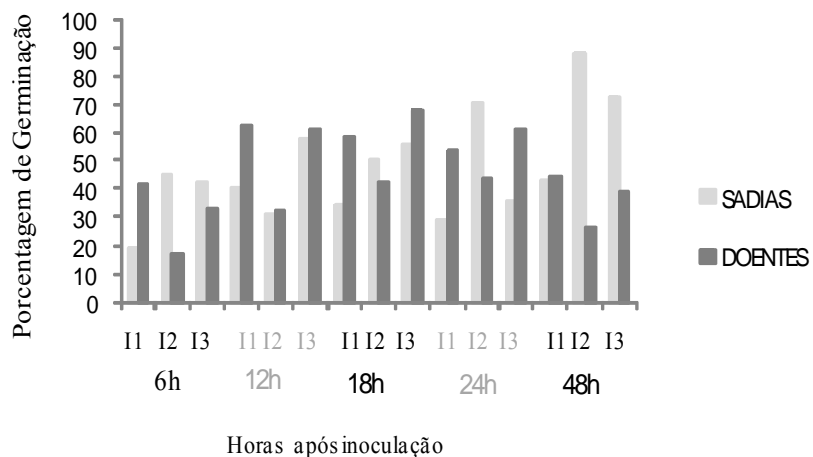


Figura 1. Percentagem média de germinação de conídios de diferentes isolados de *C. gloeosporioides*. Penz em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa em diferentes tempos.

Pereira (2005) menciona que na interação *C. gloeosporioides* x cafeeiro, a germinação dos conídios em hipocótilos ocorreu 6 horas após a inoculação, com ferimento e 12 horas em hipocótilos sem ferimentos. Vários autores afirmam que a germinação de conídios dentro deste gênero é bastante variável, iniciando-se entre 3 e 48 horas após inoculação ( Nair e Corbin, 1981; Golden Roberts e Snow, 1984; Manandhar et al., 1985; Bailey et al ., 1992; Kumar et al ., 2001; Orozco, 2003; Pereira, 2005) dependendo ainda, de fatores externos como temperatura ( Orozco, 2003), químicos e da presença de materiais exógenos ( Baley, et al., 1992; Skipp et al.,1995). Nair & Corbin (1981) observaram que na interação *C. acutatum* f.sp. *pineae* e *Pinus radiata*, a germinação dos esporos em folhas primárias esteve entre 6 a 96 horas após inoculação, com a emissão de 1 a 2 tubos germinativos da parte lateral perto do final do conídio. Mendgen & Deising (1993) mencionam que *C. lindemuthianum*, em ambiente aquoso, produz um simples tubo germinativo. Já Marks, et al. (1965) relatam que a germinação de conídios e a formação de apressórios na interação de *C. gloeosporioides* e *Populus tremuloides*, ocorreram 24 horas após a inoculação em folhas. Entretanto, nas interações de *C. fragariae* e morango, estudadas por Milholland (1982) e *C. graminicola* e em milho, por Mercure, Kunoh & Nicholson (1994), os conídios germinaram em 6 horas após a inoculação.

Entre os isolados estudados pôde-se verificar que houve diferença significativa a 1% de significância para o teste de Scott-Knott, mostrando dessa forma que houve diferença no potencial germinativo entre os isolados em plantas saudas. Em relação a plantas doentes não foi verificado diferença significativa entre os isolados estudados, os mesmos apresentaram efeitos semelhantes sobre a germinação média de conídios (Tab.1).

Tabela 1. Diferenciação no percentual germinativo de conídios de diferentes isolados de *C.gloeosporioides*. Penz sobre mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa.

Isolado	Sadias	Doentes
I	0.53 a	0.38 a
II	0.72 b	0.47 a
III	0.75 b	0.50 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si pelo testes de Skott & Knott, ( $P>0.05$ ).

Pôde-se verificar que não houve diferença estatística a 5% de significância para o teste de Scott-Knott para o número de conídios germinados em plantas sadias e plantas doentes para isolado I-1, já em relação aos isolados I-2 e I-3 verificou-se diferença significativa entre plantas sadias e plantas doentes quanto à percentagem média de germinação de conídios (Fig.2).

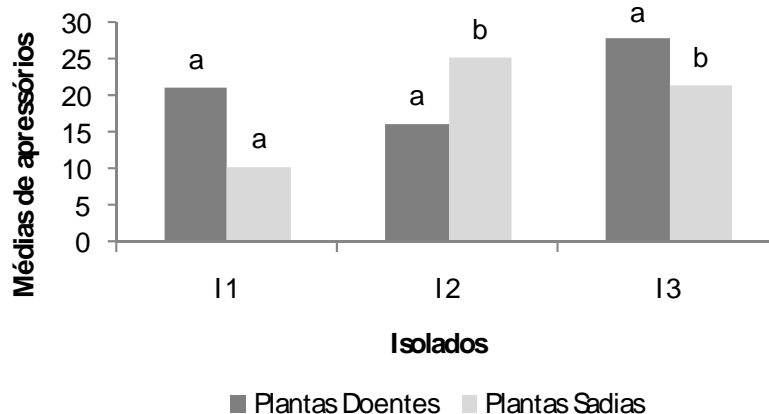


Figura 2. Efeito de isolados de *C.gloeosporioides*. Penz no percentual germinativo de conídios em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si pelo testes de Skott & Knott, ( $P>0.05$ ).

Na interação *Colletotrichum* x cafeeiro, poucos são os trabalhos que evidenciam os processos de pré-penetração e penetração. Pereira et al. (2005c) e Pereira (2005) verificaram a formação de apressórios 12 horas após inoculação, enquanto Lins (2006) observou-a somente a partir de 24 horas para *C. gloeosporioides* e 12 para *C. acutatum*. Segundo Chen (2002), apenas 6 horas após a inoculação de *C. gloeosporioides* sobre folhas e frutos verdes de café foi o necessário para a formação de apressórios. Segundo o mesmo autor, o mesmo tempo foi suficiente para a produção de apressórios de *C. kahawae* inoculados em folhas e frutos verdes de café.

No presente trabalho somente foi verificada a formação de apressórios a partir das seis horas após a inoculação, sendo observado um número expressivo a partir das 18 horas após inoculação tanto em MOSPCSMM quanto em MOSPSSMM. Com um maior pico de formação de apressórios às 48 horas, após a inoculação em MOSPSSMM e no caso de MOSPCSMM o pico máximo foi observado a partir das 18 horas após inoculação (Fig. 3). O fator de suscetibilidade de plantas oriundas de sementes com sintomas pode ser determinante na formação de apressórios, dado a maior concentração de substâncias exógenas ou exudatos que possam estar presentes 18 horas após a inoculação.



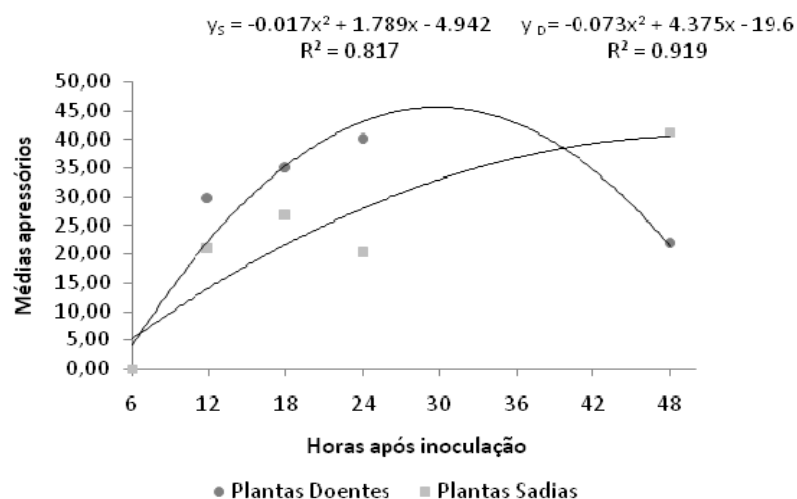


Figura 3. Percentagem media de formação de apressórios de diferentes isolados de *C.gloeosporioides*. Penz em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa.

### Avaliação da incidência e severidade da doença

Os isolados I e o III não induziram sintomas típicos da doença tanto em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa, sendo verificados sintomas apenas em plantas inoculadas com o isolado II, aos sete dias após inoculação (DAI).

Os primeiros sintomas de necrose nas folhas de mudas provenientes de plantas com sintomas (plantas doentes) e sem sintomas (plantas saudáveis) da mancha manteigosa obtidas por cultura de tecidos só foram observados a partir do sétimo dia após inoculação (Fig.4 a,b). Com 12 dias já foi possível visualizar formação de halos cloróticos ao redor das lesões (Fig. 4 c, d). No decorrer do tempo as lesões foram aumentando em tamanho e proporção chegando a atingir

30% da área inoculada sobre os discos. Tal fato foi observado aos 17 dias após inoculação (Fig. 4 e, f). Aos 22 dias foi observado um número maior de lesões sobre as folhas onde o índice de doença já ultrapassava os 80% em plantas sadias e 100% em plantas doentes (Fig.4 g, h), sendo que ao final das avaliações (30 dias após a inoculação) as folhas se encontravam totalmente necrosadas com 100% da área foliar sobre o disco lesionada em plantas sadias (Fig. 4 j). Além disso, algumas plantas doentes já estavam em fase de senescência total, e quando da desfolha, foi observado sobre a haste esporulação do patógeno (Fig.4i). Esta informação permite inferir que a partir de um ponto de entrada do patógeno, este coloniza a planta de forma invasiva. Esses dados são contrastantes com os dados obtidos por Ferreira (2006). O autor trabalhando com isolados provenientes de plantas com sintomas de mancha manteigosa verificou que o isolado da haste foi mais severo, destacando-se pela colonização dos tecidos e pela intensa produção de acérvulos e conídios. Lins (2006), em seus estudos histopatológicos, verificou também que, quando se utilizou isolado de haste de plantas doentes com mancha manteigosa, também ocorreu tal destaque, o mesmo não foi verificado no presente estudo onde o isolado que se mostrou com maior destaque e com mais severidade foi o isolado II provenientes de plantas com sintomas de seca de ponteiros, e sem sintomas foliares da mancha manteigosa. O que deixa ainda dúvidas se a mancha manteigosa está associada à seca ou a outros sintomas foliares verificados na planta.

Com base nos critérios de susceptibilidade, as mudas de café da cultivar Catucaí Vermelho, proveniente de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa obtidas por cultura de tecido, mostrou-se resistente ao isolado I, e susceptível ao isolado II. Em relação ao isolado III as plantas doentes mostraram-se susceptíveis, enquanto que em plantas sadias o efeito do isolado foi diferente mostrando-se moderadamente susceptível (Tab. 2). Tal situação nos possibilita considerar que sintomas foliares de mancha manteigosa, não sejam

realmente os mais expressivos do quadro sintomatológico do referido patossistema. Segundo Orozco, (2003) isolados de *Colletotrichum* spp., associados ao cafeeiro em Minas Gerais considerados patogênicos, não exteriorizam sintomas foliares em hipocótilos das cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo procedentes de plantas com sintomas da mancha manteigosa quando inoculados. Vargas & González (1972) acreditam que, provavelmente, exista um caráter genético que predispõe estas plantas oriundas de sementes de plantas doentes a uma maior suscetibilidade bem como, na reprodução típica dos sintomas em folhas. Orozco (2003) acredita que o sintoma da doença em folhas se expressa somente em condições especiais de suscetibilidade da planta e ou da modificação das condições ambientais.

Apesar de ainda serem incertas as condições ou metodologias de inoculações que possam levar ao surgimento dos sintomas típicos da mancha manteigosa (mancha circular clorótica com aspecto oleoso), os estudos sobre esta enfermidade em cafeeiros, certamente, em tempo relativamente curto, mostrarão resultados conclusivos.

Tabela 2. Classes de susceptibilidade de plantas de café da cultivar Catucaí Vermelho a diferentes isolados de *C. gloeosporioides*.Penz. de acordo com a escala adaptada por Várzea, (1995) e modificada por Martins e Abreu .

CULTIVAR	ISOLADOS		
	I	II	III
Catucaí Vermelho (Plantas doentes)	R	S	S
Catucaí Vermelho (Plantas sadias)	R	S	MS

**R** = resistente, **MR** = moderadamente resistente, **MS** = moderadamente susceptível, **S** = susceptível.

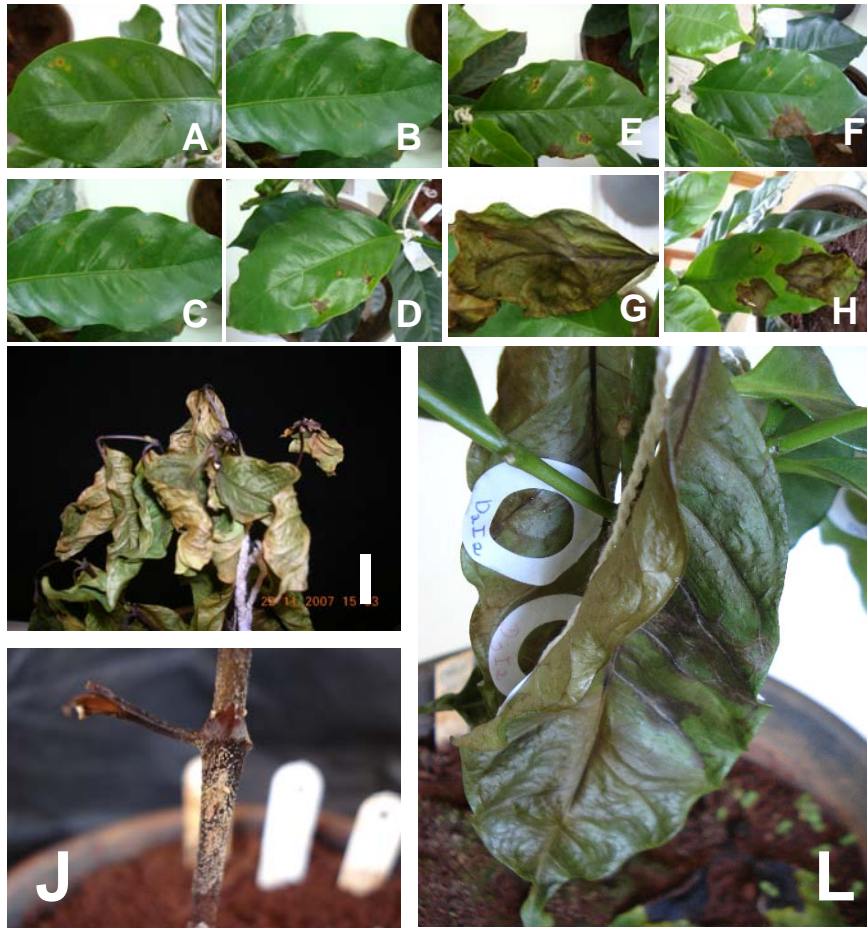


Figura4. Sintomas ocasionados pelo isolado II de *C.gloeosporioides* Penz. (A, B) 7 DAI, (C,D) 12 DAÍ, (E,F)17 DAI, (G,H) 22 DAI e (I,J) 27 DAI em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa.

A análise da área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e severidade (AACPS) da doença indica que não houve diferenças quanto ao comportamento dos isolados I e III, tanto em plantas sadias quanto em plantas

doentes, não apresentando sintomas característicos da doença no decorrer das avaliações. Ao contrario o isolado II mostrou-se totalmente agressivo a cultivar Catucaí Vermelho, apresentando um potencial crescente de doença em relação ao tempo tanto em plantas sadias quanto em plantas doentes (Fig. 5). Entretanto, comparando o comportamento do isolado II em relação MOSPCSMM e MOSPSSMM, pôde-se verificar que apesar do mesmo ter se mostrado agressivo aos dois materiais genéticos, em MOSPCSMM se mostrou muito mais agressivo (Tab. 3). Nesse caso, foi verificada uma maior intensidade de sintomas com lesões mais pronunciadas chegando até a morte de plantas aos 17 dias após inoculação o que não foi verificado em plantas sadias. Estes resultados são semelhantes aos resultados encontrados por Ferreira et al. (2004), onde estudando a incidência de *Colletotrichum* spp. em ovários de flores de cafeeiro. Os mesmos observaram em plantas com sintomas de mancha manteigosa, média de 27,91% contra 5,83% de incidência em plantas sadias. Porém, para dar mais ênfase ao fato serão necessários mais estudos envolvendo os aspectos relacionados à pré-penetração e penetração do patógeno.

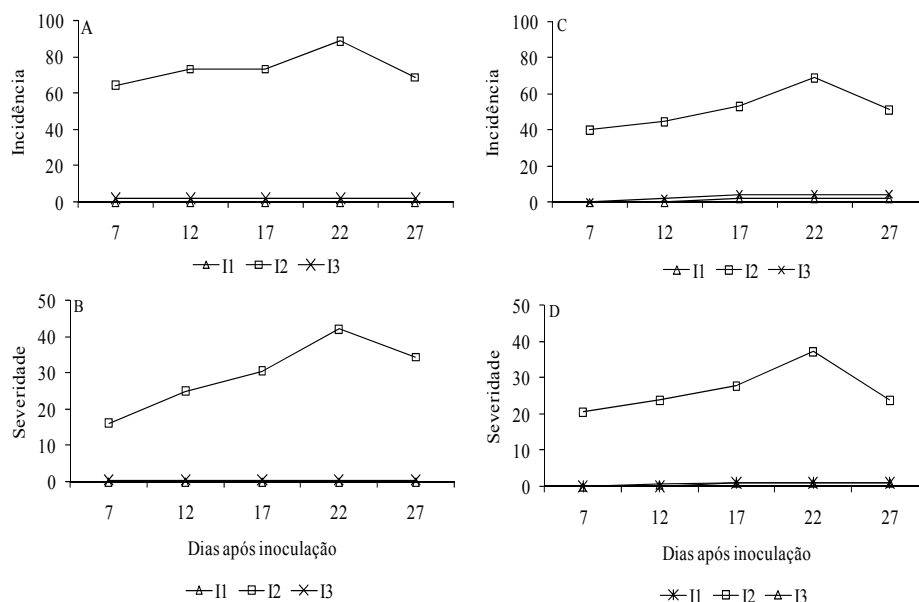


Figura 5. Efeito de diferentes isolados na incidência e severidade da mancha manteigosa em mudas de café obtidas por cultura de tecidos e inoculadas artificialmente. (A) AACPI em plantas doentes, (B) AACPI em plantas sadias, (C) AACPS em plantas doentes e, (D) AACPS em plantas sadias, em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa

Tabela 3. Médias das áreas abaixo da curva de progresso da incidência e severidade de doença em plantas de café da cultivar Catucaí Vermelho inoculadas com diferentes isolados de *C. gloeosporioides*.Penz.

Isolados	Doente		Sadia	
	AACPI	AACPS	AACPI	AACPS
I1	0 b	0 b	28 b	14 b
I2	1511 a	615 a	1061 a	556 a
I3	44 b	11 b	67 b	17 b

\*Médias com mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott Knott (P=0,05)

## CONCLUSÕES

Conídios de *C. gloeosporioides* (isolado de plantas de café com e sem sintomas da mancha manteigosa) da haste e de seca de ponteiros e de folhas de mangueira germinam em folhas a partir das 6 horas, e produzem apressórios com 12 horas, após a inoculação.

Conídios de *C. gloeosporioides* (isolado da mangueira) quando inoculados em folhas de cafeeiro, produzem quadro assintomático.

O período de incubação, a sintomatologia e a morte de plantas de café foram diferentes entre os isolados e entre mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa.

O isolado II se mostrou mais agressivo quando inoculado em plantas doentes.

A relação entre *C. gloeosporioides* e à seca de ponteiros foi parcialmente evidenciada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. S. **Identificação de parâmetros para avaliação da resistência horizontal de *Coffea* sp. à *Hemileia vastatrix* Berk & Br.** 1978. 64 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor.** 1988. 68 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.) **Colletotrichum : biology, pathology and control.** Wallingford: CAB International, 1992. p. 88-120.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J.; CARVALHO G. R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, jul./set., 1999.
- CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro** : importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93 p.
- CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries.** 2002. 163 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Primeira previsão da safra de café 2007/2008.** Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/download/safra/2ºLevantamento-Safra\\_2007-08.pdf](http://www.conab.gov.br/download/safra/2ºLevantamento-Safra_2007-08.pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2008.
- DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOACK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 392, ago. 1993. Suplemento.



FERREIRA, J. B.; PEREIRA, I. S. FERNANDES, K. D.; ABREU, M. S. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Necaf, 2004.1 CD-ROM.

FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado do em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GOLDEN ROBERTS, R.; SNOW, J. P. Histopatology of cotton rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, St. Paul, n. 74, p. 390-397, Ago. 1984.

GUTIERREZ, L. H. Muerte descendente causada por *Colletotrichum* en las plantas de café en el almácigo y su combate por medio de aspersiones en Turrialba, Costa Rica. **Turrialba**, San José, v. 4, n. 3/4, p.115-124, July 1954.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkeley, CA, USA: California Agricultural Experiment Station, University of California, 1950. 98 p.

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

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 3, p.282-285, Mar. 1986.

MARKS, G. C.; BERBEE, J. C.; RIKER A. J. Direct penetration of leaves of *Populus tremuloides* by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, n. 4, p. 408-412, Apr. 1965.

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

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, n. 6, p. 407-420, Dec. 1994.

MIGUEL, A. E.; MANSK, Z.; MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. Efeito de fungicidas no controle de *Cercospora coffeicola* em frutos de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 3., 1975, Curitiba. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1975, p. 58-61.

MILHOLLAND, R. D. Histopathology of strawberry infected with *Colletotrichum fragariae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 11, p. 1434-1439, Nov. 1982.

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

NAIR, J.; CORBIN, J. B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pineae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 8, p. 777-783, Aug. 1981.

OROZCO MIRANDA, E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae*.** 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OROZCO MIRANDA, E. F.; RIBEIRO, A.; JULIATTI, F. CÉZAR; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. e *Colletotrichum kahawae* obtidos de cafeeiro por meio de marcadores RAPD e SSR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 21, p. 222, 2003. Suplemento.

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 Agronômico de Campinas, 2001. 11 p. (IAC. Boletim Técnico, n. 191).

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005a. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, I.S.; ABREU, M.S.; FERREIRA, J.B.; ALVES, E. 2005c. Microscopia eletrônica de varredura da infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de cafeeiros com mancha manteigosa. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina, 2005.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p. 26-40, jun. 1985. RIBEIRO, L. S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Desenvolvimento in vitro de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 48, n. 4, p.1479-1483, dez. 2003. Edição Especial.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 8, p. 1183-1186, Aug. 1977.

SKIPP, R. A.; BEEVER, R. E.; SHARROCK, K. R.; RIKKERNINK, E. H. A.; TEMPLETON, M. D. *Colletotrichum*. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxford: Pergamon/Elsevier, 1995. v.2, p.119-142.

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

VARZEA, V. M. P. **Variabilidade em *Colletotrichum* spp. de cafeeiro. Pesquisa de fontes de resistência ao *C. kahawae***. 1995. 128 p. Dissertação (Investigador auxiliar) – Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, Portugal.

VOLTAN, R. B. Q.; CABRAL, L. P.; PARADELA FILHO, O. Avaliação preliminar do efeito do *Colletotrichum* spp. na estrutura de plantas de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu, MG. **Trabalhos apresentados..** Rio de Janeiro: MAPA/Procafé, 2002. p. 364-365.

## ARTIGO 2

### **Quantificação de pigmentos, fenóis solúveis totais e teor de lignina solúvel em mudas de cafeeiros inoculadas com diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.**

(Preparado de acordo com as normas da revista “Tropical Plant Pathology” exceto as citações (NBR 10520) e as referencias bibliográficas (NBR 6023)

Fernanda G. Martins<sup>1</sup>, Claudio Ogoshi <sup>1</sup>., Jucilayne F. Vieira<sup>1</sup>, Rosana O. Pierre<sup>1</sup>., Pedro M.R.Júnior<sup>1</sup>, Mario S. Abreu<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000 Caixa postal 3037, Lavras, MG, Brasil, e-mail: feagrosal@yahoo.com.br;

(Aceito para publicação em / / )

Autor para correspondência: Mario Sobral de Abreu

---

Martins, F.G., Ogoshi.C., Vieira. J.F., Pierre, R.O., Ribeiro Júnior.P.M., Abreu, M.S. **Quantificação de pigmentos, fenóis solúveis totais e teor de lignina solúvel em mudas de cafeeiros inoculadas com diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.**

## RESUMO

Objetivou-se neste trabalho estudar os efeitos de diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre os teores de pigmentos (clorofila a, b e total), fenóis solúveis totais e lignina solúvel, em dois tempos diferentes, sobre mudas de café obtidas por cultura de tecidos e inoculadas artificialmente. O experimento foi conduzido em DBC no esquema fatorial 2 x 3 x 1 (MOSPCSM e MOSPSSM) 3 isolados e 1 testemunha, com 5 repetições. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de  $2 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>. A suspensão de conídios foi pulverizada sobre folhas de cafeeiro, previamente feridas. Foram realizadas duas coletas (aos 3 e 7 dias após inoculação) de todas as folhas da muda, exceto as folhas baixas. Em seguida foi feito o preparo das amostras para avaliação de clorofila, fenóis solúveis totais e lignina solúvel. A partir dos resultados, pode-se concluir que a presença do patógeno tanto em plantas saudáveis como em plantas doentes diminuíram significativamente a quantidade de clorofila. Aos 7 dias após inoculação das plantas de café saudáveis e doentes pôde ser observado um maior teor de fenóis solúveis totais e lignina solúvel em resposta ao ataque de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, pigmentos e resposta de defesa.

## ABSTRACT

The objective of this work was to study the effects of different isolated of *Colletotrichum gloeosporioides* in two times on pigments' contents of (chlorophyll a, b and total), total soluble phenols and soluble lignin in seedlings of coffee obtained by tissue culture artificially inoculated. The experiment was carried out in DBC in the factorial scheme 2 x 3 x 1 {2 genetic materials (MOSPCSM and MOSPSSMM) 3 isolated} with 5 repetitions and control. The plants were inoculated with a suspension of  $2 \times 10^6$  conidia.ml<sup>-1</sup>. The conidia suspension was sprayed on leaves previously wounded. Two collections were accomplished (at 3 and 7 days after inoculation) of all the seedling's leaves, except the lowest third leaves. After that, we made the preparation of the samples for chlorophyll, total soluble phenols and soluble. The results showed that the presence of the pathogen in healthy and in diseased plants reduced significantly the amount of chlorophyll. At 7 days after inoculation of plants of coffee healthy and diseased we observed a larger contents of total soluble phenols and soluble lignin in response to the attack of *Colletotrichum gloeosporioides*.

Key- words: Coffee plants, pigments and response defense.

## INTRODUÇÃO

Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie vegetal. A clorofila a (Chl *a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. A Chl *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica, enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação.

Pigmentos como clorofilas e carotenóides, são de grande importância para o processo fotossintético das plantas. Eles participam dos processos de absorção de energia luminosa para posterior transformação dessa energia em ATP e poder redutor, os quais serão usados na produção de fotoassimilados (Malkin & Niyogi, 2000).

Muitos compostos produzidos através de rotas metabólicas secundárias são formados após a ocorrência da infecção, proporcionando uma maior resistência às doenças. Estes compostos são fitoalexinas, os fenóis, os flavonóides e as auxinas, ao quais se acumulam ao redor dos sítios de infecção, dependendo da disponibilidade dos vários nutrientes.

A lignina, além das funções inerentes a fisiologia das plantas, apresenta-se como uma barreira de defesa física e química, dificultando a penetração de fungos, bactérias, consumo por insetos, em fim protegendo as plantas contra os fatores bióticos e abióticos, advindo do ambiente. Tais funções justificam-se por ser encontrada principalmente na parede celular e na lamela média de células xilemáticas e de outras partes de diferentes origens citológicas, tais como: folha, caule, casca e raízes. Formada pela oxidação desidrogenativa, catalisada pela peroxidase (isoenzimas) na presença  $H_2O_2$ , destaca-se por ser o maior produto de via metabólica que garante a manutenção da vida dos vegetais superiores (DAVIN & LEWIS, 1995). O acúmulo da lignina, portanto, advém dos mecanismos bioquímicos essenciais para a sobrevivência de um vegetal.



Logo a contribuição da lignificação para a resistência pode ocorrer de diferentes maneiras. Em primeiro lugar, a incorporação de lignina junto à parede celular vegetal torna-a mais resistente à degradação por enzimas secretadas pelo patógeno invasor. Paredes celulares lignificadas poderiam também constituir uma barreira, evitando o movimento de nutrientes até o patógeno. Os próprios precursores de lignina podem exercer um efeito tóxico sobre o patógeno ou conduzir à lignificação também de estruturas do patógeno (Hammerschmidt & Kuc, 1982).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho estudar os efeitos de diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em dois tempos sobre os teores de pigmentos (clorofila a, b e total), fenóis solúveis totais e lignina solúvel em mudas de café obtidas por cultura de tecidos inoculadas artificialmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas, no laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura - DAG e no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo Departamento de Fitopatologia - DFP da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

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

Frutos de café (*C. arabica*) da cultivar Catucaí Vermelho, com e sem sintomas da mancha manteigosa, em estágio verde-cana, foram colhidos, lavados e desinfestados com álcool 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2% durante 15 minutos, e em seguida lavados três vezes com água destilada e esterilizada. Posteriormente, com o auxílio de pinça, bisturi e lupa, os embriões foram excisados e depositados em tubos de ensaio com 15 ml de meio de cultura. Utilizou-se o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 1 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 300 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de giberelina com pH ajustado para 5,8 e solidificado com 6 g.L<sup>-1</sup> de agar (Ribeiro *et al.*, 2003). As culturas de embriões foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±1 ° e fotoperíodo de 16 horas. Transferência das plântulas para outros tubos com o mesmo meio de cultura ocorreu a cada dois meses, até que estas plântulas estivessem aptas para a aclimação.

A aclimação foi feita conforme trabalho publicado por Carvalho *et al.* (1999). Plântulas com aproximadamente 2 a 3 cm de comprimento foram retiradas dos tubos de ensaio e transferidas para bandeijas de polipropileno com células de 11 x 5 x 5 cm contendo vermiculita. Estas foram acondicionadas em câmara de crescimento com aproximadamente 90% de umidade relativa do ar,

temperatura média próxima de 25° C, sistema de nebulização automático e iluminação natural. O fornecimento de nutrientes foi realizado semanalmente com a aplicação de 1 ml de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) por plântula, iniciando no dia do plantio e estendendo-se até o período de inoculação.

### **Obtenção de isolados e inoculações**

Os isolados utilizados para a execução deste trabalho foram obtidos do campo experimental da UFLA. Os mesmos foram obtidos de haste de cafeeiros com sintomas de mancha manteigosa (I3); cafeeiros sem sintomas de mancha manteigosa, mas com seca de ponteiro (I2) e de mangueira com antracnose nas folhas (I1). Partes do tecido infectado foram superficialmente desinfetados com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por um minuto, lavados em água e secos ao ar livre. Em seguida os mesmos foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura MEA 2% (extrato de malte agar) e cloranfenicol. As placas foram incubadas por sete dias em BOD a 22° C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias purificadas foram utilizadas para obtenção de culturas monospóricas.

Os isolados de *C. gloeosporioides* foram mantidos e crescidos em meio de cultura MEA 2%. Suspensões de conídios foram preparadas pela raspagem de conídios com auxílio de uma alça de Drigalsky e água destilada esterilizada (ADE) seguida pela filtragem em gaze esterilizada. A concentração utilizada foi de  $2 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>, a qual foi calculada com o auxílio de uma lâmina de contagem (câmara de Newbauer).

A inoculação foi feita em folhas novas completamente expandidas de cafeeiros formados sob condições controladas. Sendo que três dias antes da inoculação, estas plantas foram submetidas a condições de câmara úmida, feita

com o auxílio de sacos plásticos e mantidas em casa de vegetação à temperatura de 30°C. A suspensão de conídios foi pulverizada sobre folhas de mudas de cafeeiro com o auxílio de um atomizador manual de 500 ml, estas folhas foram previamente feridas. Os ferimentos foram feitos com o auxílio de agulhas entomológicas posicionadas a 0,5mm eqüidistantes totalizando uma área de 1,3 cm de diâmetro. Uma pequena alíquota dessa solução foi retirada para realização do teste de germinação. Após inoculação as mudas foram mantidas em casa de vegetação, sendo que nas primeiras 24 horas após a inoculação as mesmas foram submetidas a uma nova câmara úmida feita com o auxílio de sacos plásticos.

#### **Coleta de tecido vegetal**

Foram realizadas coletas de todas as folhas da muda, exceto as folhas baixas, aos sete e três dias após a inoculação. Durante as coletas, as folhas foram protegidas com papel alumínio e colocadas em isopor contendo nitrogênio líquido e levadas ao Laboratório de Fisiologia do Parasitismo onde foram acondicionadas em freezer a -80° até a preparação dos extratos para a realização das análises bioquímicas.

#### **Determinação de clorofila *a*, *b*, e total**

A partir do material vegetal armazenado, foram pesados 0,2g de tecidos foliares de cada tratamento, com cinco repetições. Os tecidos foliares foram macerados e extraídos em acetona 85% por 24 horas. Em seguida, o material foi centrifugado a 8000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o conteúdo de clorofila *a*, *b* e total foram determinados em espectrofotômetro pelas seguintes fórmulas de acordo com Arnon, (1949):

- Clorofila **a** (mg/g) =  $12,7 (663 \text{ nm}) - 2,69 (645 \text{ nm}) \times V(\text{ml}) / 1000 \times W (\text{g})$
- Clorofila **b** (mg/g) =  $22,9 (645 \text{ nm}) - 4,68 (663 \text{ nm}) \times V(\text{ml}) / 1000 \times W (\text{g})$
- Clorofila **total** (mg/g) =  $20,2 (645 \text{ nm}) + 8,02 (663 \text{ nm}) \times V(\text{ml}) / 1000 \times W (\text{g})$

Onde:

$W = 200$  mg folha fresca e  $V = 5$  ml de acetona 85%.

### **Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais**

Amostras de tecido vegetal, armazenadas em freezer, a  $- 80^\circ$ , foram trituradas em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino em seguida foram secas por 6 h em liofilizador (*Liofilizador condensador LI01, marca LIOBRAS*). Deste material liofilizado, 30 mg foram transferidas para tubo eppendorf de 2 mL e homogeneizadas com 1,5 mL de metanol 80% e extraídas sob agitação por 15 h em agitador rotativo, protegido da luz e em temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 12.000g por 5 min. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo eppendorf, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação lignina solúvel.

### **Determinação de fenóis solúveis totais**

Os compostos fenólicos totais foram determinados ao serem adicionados 150  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico, misturando-se 150  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N e mantido em temperatura ambiente por 5 min, adicionando-se, então, 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M, sendo homogeneizado e mantido por 10 min em temperatura ambiente. A mistura foi então homogeneizada com 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e deionizada e mantido à temperatura ambiente por uma

hora. A absorvância da reação foi lida a 725 nm. Os valores de absorvância foram calculados com base em curva de catecol e os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente  $\mu\text{g}$  de catecol  $\text{mg}^{-1}$  de tecido seco (Spanos & Wrolstad, 1990).

### **Determinação de lignina**

Foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol 80%, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65 °C por 15 h. O resíduo seco, insolúvel em álcool e contendo lignina e ácidos fenólicos esterificados da parede celular, foi utilizado para determinação de lignina. Para tanto, um volume de 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e HCl 2M (proporção de 1:10) foi adicionado ao resíduo. Os tubos eppendorf foram agitados suavemente para hidratar o resíduo e então colocados em banho-maria a 100 °C por 4 h. Após, os tubos foram colocados em gelo para resfriar rapidamente por 10 min. e então centrifugados à 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada e deionizada e novamente centrifugado a 10.000g por 10 min. Após isto, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspense em 1,5 mL de NaOH 0,5 M, sendo a mistura agitada em agitador rotativo por 15 h em temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo eppendorf, e logo após, adicionado 200  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado ao sobrenadante e mantido em câmara fria (4 °C) por 4 h para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em 2 mL de NaOH 0,5 M. A absorvância desta solução foi determinada a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina,

sendo expresso em  $\mu\text{g}$  de lignina por mg de tecido seco (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

### **Análise dos dados**

A análise estatística do experimento foi realizada pelo programa SISVAR , versão 4.6 (Build 6.1). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ajustes de modelos. Os critérios para escolha dos modelos de regressão foram aqueles que apresentaram maior coeficiente de determinação, e significância dos coeficientes de regressão até 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de significância e para as correlações utilizou-se o programa SAEG (Sistemas para análises estatísticas, versão 8.0: Fundação Arthur Bernardes-FV). O delineamento experimental foi em DBC no esquema fatorial  $2 \times 3 \times 1$  {2 materiais genéticos (mudas da cultivar Catucaí Vermelho obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa) ,3 isolados e 1 testemunha ferida} com cinco repetições.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Quantificação de pigmentos (clorofila *a*, *b*, e total)**

Observou-se que a presença dos isolados de *C. gloeosporioides* não alteraram significativamente a quantidade de clorofila nas folhas dentro de cada material genético avaliado (mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa), conforme mostram as tabelas 1 e 2, não houve diferenças entre o teor de clorofila *a*, *b* e total encontrado nas testemunhas em relação as plantas inoculadas, tanto para mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa quanto para mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa. Assim como os isolados, a interação tratamento x tempo não alterou significativamente a quantidade de clorofila nas folhas dentro de cada material genético avaliado para a quantidade de clorofila *a* e total (Tab.1). Entretanto, foi observado efeito significativo da interação tratamentos x tempo quando se tratando da quantidade de clorofila *b* mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa (Tab.1).

em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da ma



Teor de clorofila ( $\mu\text{g/g MS}$ ) MOPCSM	
A	B
0.00000166 <sup>(ns)</sup>	0.00002762 <sup>(ns)</sup>
0.00132388 **	0.00426 **
0.00000408 <sup>(ns)</sup>	0.00003496*
14,78	32,26
Teor de clorofila ( $\mu\text{g/g MS}$ ) MOPSSM	
A	B
0.00000641 <sup>(ns)</sup>	0.00008063 <sup>(ns)</sup>
0.00180903**	0.00484**
0.00000509 <sup>(ns)</sup>	0.00005838 <sup>(ns)</sup>
9,36	18,19

"\*", "\*\*", "ns" significativo à nível de 5% e 1% de probabilidade e não significativo pelo teste F, respectivamente.

Os teores de clorofila *a*, *b* e total nas folhas das mudas de café tanto para mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa quanto para mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa diminuíram de maneira significativa ao longo do tempo (Tab. 2). Com o passar do tempo e com o aparecimento das primeiras lesões nas folhas inoculadas o teor de clorofila pode diminuir drasticamente. Em alguns casos isto se deve à perda de área foliar, o que não foi observado neste estudo, pois tanto em mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa quanto em mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa, não foram verificados sintomas foliares externos significativos, como necroses e amarelecimento com perda de área fotossintética.

Tabela 2. Teores médios de pigmentos, clorofila *a*, *b* e total ( $\mu\text{g/g MS}$ ), em folhas de mudas de cafeeiro obtidas de sementes de plantas com sintomas da

mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa em duas épocas de avaliação, 3 e 7 dias após inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Doente			
Tempo (dias)	Teor de clorofila ( $\mu\text{g/g MS}$ )*		
	<i>a</i>	<i>b</i>	Total
3	0,033050 a	0,0322750 a	0,065600 a
7	0,019600 b	0,010750 b	0,030350 b

Sadia			
Tempo (dias)	Teor de clorofila ( $\mu\text{g/g MS}$ )*		
	<i>a</i>	<i>b</i>	Total
3	0,0323684 a	0,030316 a	0,062895 a
7	0,0205263 b	0,0090000 b	0,029474 b

\* significativo pelo teste F na coluna (P=0,05).

Os pigmentos como clorofilas entre outros são importantes porque participam dos processos de absorção, conversão de energia luminosa em ATP e poder redutor que podem ser usados no metabolismo de carboidrato e outros processos energéticos das células (Malkin & Niyogi,2000; Misaghi,1982). A função principal da clorofila é absorver fótons da luz emitida pelo Sol participando assim de uma cadeia de transporte de elétrons que culmina na hidrólise de moléculas de água e na produção de ATP, necessário para a fase escura da fotossíntese onde os carboidratos são sintetizados a partir do gás carbônico (Pazza,2004). Tal função pode ser impedida quando há degradação do teor de clorofila nos vegetais, fato que pode estar acontecendo nesse estudo.

Os maiores danos ocasionados nos vegetais ocorrem após a absorção da luz, com a redução da clorofila nas células e tecidos fotossintetizantes. Esta redução pode ser causada por uma variedade de fatores incluindo a síntese insuficiente de clorofila devido à degradação de cloroplastos, necrose de tecidos e células fotossintéticas, redução na superfície fotossintética de órgãos e tecidos e finalmente, a perda de folhas (Scholes, 1992). Apesar de termos observado uma degradação significativa de clorofila nos materiais genético estudados com o

passar do tempo, não podemos dizer que este fato esteja ligado a perda de superfície fotossintética, pois até então não foi verificada presença do patógeno externamente aos tecidos, talvez o mesmo possa ter somente interferido internamente com a degradação de cloroplastos. Contradizendo o observado no presente estudo (Godoy *et al.*, 2001; Pinkard e Mohamed, 2006) afirma que para a maioria dos patossistemas, há uma correlação entre a diminuição da fotossíntese e a proporção de área foliar doente. Entretanto, Lopes e Berger (2001), afirma que áreas sadias de folhas com sintomas de antracnose do feijoeiro têm sua taxa fotossintética diminuída, pois o efeito da antracnose se estende além da área da lesão visual, que segundo Bastiaans (1991) pode ser definida como lesão virtual. Para alguns patossistemas envolvendo organismos necrotróficos, a lesão virtual pode ser o resultado da produção e difusão de toxinas em volta da área sintomática do tecido, interferindo assim, na atividade fotossintética. Fato este que pode estar relacionado com os resultados obtidos no presente estudo.

### **Determinação de Lignina**

Conforme mostrado na tabela 3 não houve significância aos três dias após a inoculação (Coleta 1) quanto ao teor de lignina encontrado nas plantas inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* em comparação com a testemunha ferida. Tanto para mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa quanto para mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa, a resposta foi similar. Também não foi verificado efeito significativo quanto aos isolados utilizados. Talvez, isso possa ter ocorrido devido ao fato das amostragens (coletas) terem sido realizadas com as folhas ainda não totalmente expandidas. Segundo alguns autores como Nojosa (2003) a lignina pode estar presente com maior intensidade em folhas

mais velhas que em folhas mais novas. As tendências acumulativas, basicamente seguiram um padrão similar para mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa na coleta 1, que não diferiram e apresentaram uma quantidade de lignina igual às mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa quando inoculadas com o fungo ou mesmo quando não inoculadas como é o caso da testemunha. Segundo Amaral (2008) quanto maior o estágio de desenvolvimento das plantas, maiores são os teores de lignina, principalmente em plantas lenhosas e perenes como é o caso do café.

Tabela 3. Teor de lignina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  MS) em folhas de cafeeiro provenientes de mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa 3 dias após inoculação com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, por meio de ferimento, comparados com a testemunha apenas com ferimento.

Isolado	Plantas	
	Sadias	Doentes
1	18,0 <sup>ns</sup>	23,1 <sup>ns</sup>
2	16,0 <sup>ns</sup>	21,2 <sup>ns</sup>
3	20,1 <sup>ns</sup>	22,7 <sup>ns</sup>
Testemunha	21,7 <sup>ns</sup>	18,2 <sup>ns</sup>

\* = significativo, pelo teste de Dunnett ( $P=0,05$ ). <sup>ns</sup> = não significativo.

Diferentemente da coleta 1 na coleta 2, realizada aos 7 dias após inoculação, pôde-se verificar efeito significativo dos isolados 2 e 3. De acordo com o teste de Dunnett uma leve tendência de aumento nesses isolados, quanto os teores de lignina foram encontrados, diferindo assim dos teores encontrados no isolado 1 e na testemunha com ferimento, quando em se tratando de mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa plantas sadias (Fig.1). Em relação às mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa, quando inoculadas com os três isolados em estudo não apresentaram diferença nos teores de lignina quando comparado

plantas inoculadas com a testemunha, por tanto não se faz necessária a apresentação de resultados através de gráficos e tabelas.

A lignina geralmente é encontrada nos tecidos vegetais entre a parede celular e as células adjacentes. Desta forma, estruturas lignificadas podem interromper o desenvolvimento fúngico em tecidos vegetais, atuando como barreira, resistindo à penetração ou à colonização (Nicholson & Wood, 2001; Agrios, 1997; Pascholati & Leite, 1995; Misaghi, 1982; Hammerschmidt & Kuc, 1982).

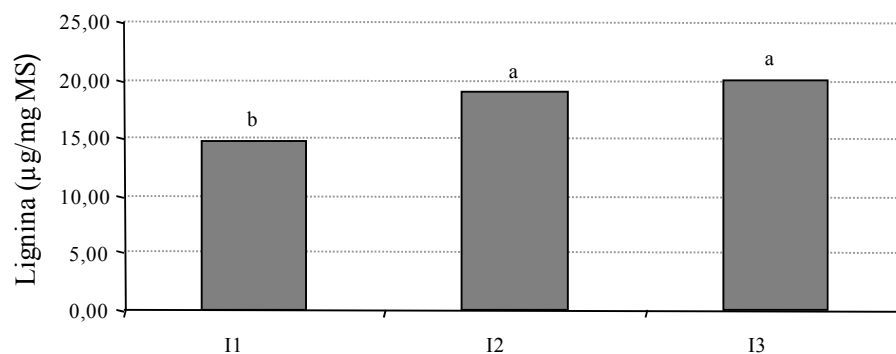


Figura 1. Teor de lignina ( $\mu\text{g}/\text{mg MS}$ ) em folhas de café, 7 dias após inoculação com isolados diferentes de *Colletotrichum gloeosporioides*, por meio de ferimento em plantas saudáveis.

### Determinação de Fenóis totais

De acordo com o teste de Dunnett, tanto os isolados quanto as mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e

mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa não diferiram quanto aos teores de fenóis solúveis totais encontrados nas folhas, na amostragem realizada aos três dias após inoculação (Fig.2). Provavelmente, não houve diferenças e correlações significativas para os teores de fenóis solúveis totais devido ao fato das amostragens (coletas) terem sido realizadas com as folhas ainda não totalmente expandidas. Salgado, (2004) afirma que as folhas novas possuem menores teores de fenóis totais quando comparadas as folhas mais velhas.

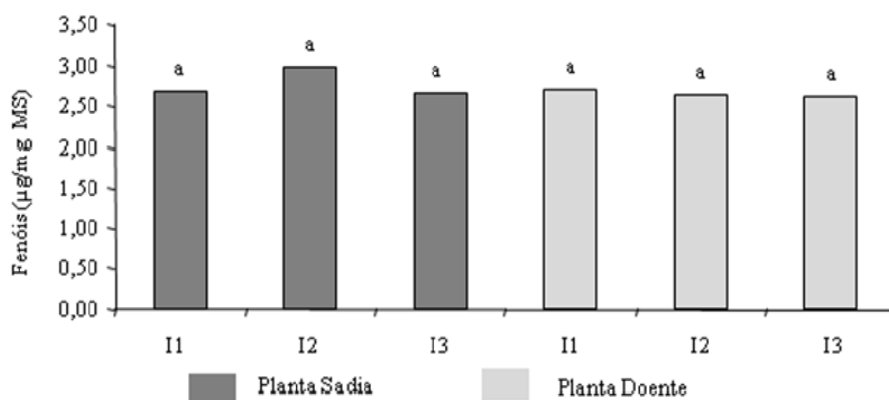


Figura 2. Teores de fenóis solúveis totais ( $\mu\text{g}/\text{mg MS}$ ) em folhas de cafeeiro, 3 dias após inoculação com diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de ferimento em plantas sadias e plantas doentes.

Em relação à coleta realizada aos 7 dias após inoculação pôde-se verificar diferença significativa pelo teste de Dunnett quanto ao teor de fenóis solúveis mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa. Em mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa foi verificada uma quantidade maior destes compostos quando comparado as mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha

manteigosa. O que provavelmente leva a considerar esteja o fator de susceptibilidade de mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa, também relacionado à menor síntese de fenóis solúveis totais (Fig.3). Não houve diferenças significativas quando em se tratando de isolados.

A síntese desses compostos é considerada parte de um mecanismo efetivo de resposta, podendo ter um papel importante na expressão ativa da resistência de plantas à patógenos. Sua distribuição e a localização nas plantas não são conhecidas claramente. De acordo com Salgado, (2004) as quantidades variam de acordo com os órgãos, a idade, o estágio de desenvolvimento das plantas e as condições climáticas.

Os compostos fenólicos servem como defesa natural contra herbívoros e patógenos, tendo sido encontrada correlação entre os teores desta substância com a resistência da planta (Misaghi, 1980; Goodman et al ., 1986). Portanto, o nível de infestação ou infecção vegetal pode ser atribuído às diferenças nas concentrações destes compostos nas plantas (Salgado,2004).

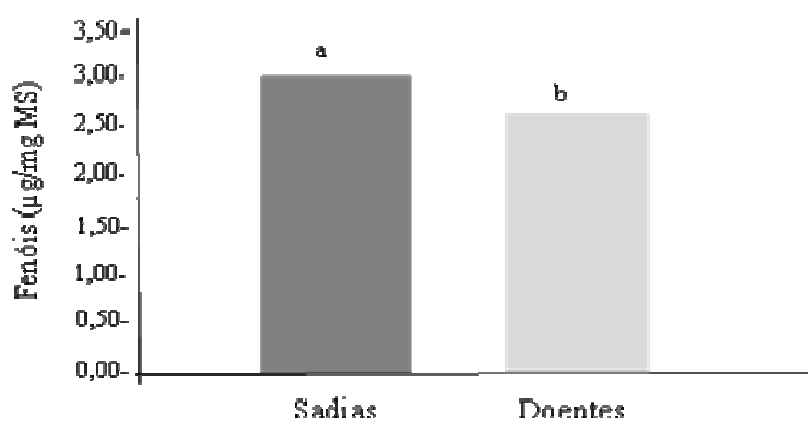


Figura 3. Teores de fenóis solúveis totais ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  MS) em folhas de cafeeiro, 7 dias após inoculação com diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de ferimento em plantas saudáveis e plantas doentes.



## CONCLUSÕES

A quantidade de clorofila diminuiu da primeira para segunda coleta em ambos os patossistemas estudados (Mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa).

Maior teor de fenóis solúveis totais e lignina solúvel foi observado aos 7 dias após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em mudas de café obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas de café obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic, 1997. 992 p.
- AMARAL, D.R. **Formulações de extratos vegetais e micronutrientes na indução de resistência em mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola***. 2008. 92 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ARNON, D.I. Copper enzymes isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 24, n. 35, p.1-15, May 1949.
- BASTIAANS, L. Relation between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 611-615, 1991.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J.; CARVALHO G. R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, jul./set. 1999.
- DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. **Phenylpropanoid metabolism** : biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. New York: Plenum, 1995. 216 p.
- DOSTER, M. A. ; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 4, p. 473-477, Abr. 1988.
- GODOY, C. V. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 209-215. 2001.
- GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbi. University of Missouri, 1986. 443 p.

HAMMERSCHMID, R. ; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, Feb. 1982.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA, USA: California Agricultural Experiment Station, University of California, 1950. p. 1-32.

LOPES, D. B. ; BERGER, R. D. . The effects of rust and anthracnose on the photosynthetic competence of diseased bean leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 2, p. 212-220, Apr. 2001.

MALKIN, R.; NIYOGI, K. Photosynthesis. In: BUCHNAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed). **Biochemistry & molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 568-628.

MISAGHI, I. J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. New York: Plenum, 1980. 205 p.

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

NICHOLSON, R. L.; WOOD, K.V. Phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 2, p. 63-69, Ago. 2001.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. E *Phoma costarricensis* Echandi**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OROZCO MIRANDA, E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASCHOLATI, S. F.;LEITE, B. Hospedeiro : mecanismos de resistencia . In: BERGAMIN FILHO, A.;KIMATI, H.;AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia** : principios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.v. 1, cap. 22 ,p. 417-454.

PAZZA, R. A clorofila e o arquiteto inteligente. **Biociência.org**. Projeto Evoluindo. 2004. Disponível em: <<http://www.evoluindo.biociencia.org/clorofila.htm>>. Acesso em: 18 maio 2008.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidde vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PINKARD, E. A.; MOHAMED, C. L. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. **New Physiologist**, v 170, p. 119-127, 2006.

RIBEIRO, L. S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Desenvolvimento in vitro de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 48, n. 4, p.1479-1483, dez. 2003 Edição Especial.

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

SCHOLES, J. D. Photosynthesis : cellular and tissue aspects in diseased leaves. In: AYRES, P. G. (Ed.) **Pests and pathogens** : plant responses to foliar attack. Oxford: BIOS Scientific, 1992. p. 85-106.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July.990

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos estudos vêm sendo realizados em relação à população de *Colletotrichum* em cafeeiros. Sabe-se que cepas patogênicas convivem com as saprofíticas, e não se manifestam de forma epidêmica em condições do Sul de Minas Gerais.

Pelos danos ocasionados, frutos verdes lesionados ou mumificados, morte de ramos e depauperamento das plantas, culminando com a perda total de produção em plantas doentes, esta doença é potencialmente um risco à cafeicultura, caso este patógeno venha a se disseminar planta a planta tendo em vista as dificuldades de controle.

Neste trabalho, os isolados de *C. gloeosporioides* (isolado de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa) da haste e de seca de ponteiros germinam em folhas a partir das 6 horas, e produzem apressórios com 12 horas, após a inoculação.

Após a inoculação do fungo, o período de incubação, sintomatologia e morte de plantas de café foram diferentes entre os isolados e entre os materiais genéticos estudados.

Em relação aos isolado, estudados, aquele obtido de ponteiros com sintomas de seca, mas sem sintomas da mancha manteigosa se mostrou mais agressivo quando em contato com as plantas, quando da invasão causou destruição do tecido e em algumas vezes até levou a sua morte. Embora tenha sido verificada uma colonização quando inoculado o isolado da haste (com sintomas da mancha manteigosa) nas plantas, isto ocorreu mais tardiamente em relação ao isolado de ponteiros e com menor intensidade. Trabalhos anteriores relatam uma situação oposta no que se refere aos mesmos isolados.

Quanto aos estudos envolvendo susceptibilidade, pôde-se observar que a partir de um ponto de entrada do patógeno na planta, o mesmo pode vir a

colonizar de forma invasiva, sem manifestação de sintomas e quando há a susceptibilidade o patógeno invade os tecidos provocando necrose e chegam até a causar sua morte.

A relação *C. gloeosporioides* e a seca de ponteiros em mudas de café não foi totalmente evidente, deixando ainda dúvidas se a mancha manteigosa está associada a seca ou a outros sintomas foliares verificados na planta.

Os teores de clorofila *a*, *b* e total nas folhas das mudas de café tanto mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa diminuíram drasticamente em resposta a presença do patógeno. Doenças foliares afetam a fotossíntese das plantas de várias formas. Entre essas formas podem ser citadas interferências na fotoassimilação, causada pela perda de área fotossintética, devido à necrose e clorose dos tecidos. Com o passar do tempo e com o aparecimento de lesões nas folhas inoculadas o teor de clorofila diminuiu drasticamente em alguns casos. Isso se deve à perda de área foliar, o que não foi observado neste estudo, pois tanto mudas obtidas de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa e mudas obtidas de sementes de plantas sem sintomas da mancha manteigosa não foram verificados sintomas foliares externos significativos, como necroses e amarelecimento com perda de área fotossintética. Provavelmente isto ocorreu devido ao tempo de exposição das plantas aos isolado ter sido pequeno, apenas 7 dias. Em trabalhos anteriores os sintomas se manifestaram a partir desse período de exposição.

A grande dificuldade encontrada neste patossistema é a reprodução típica dos sintomas em folhas (mancha circular clorótica com aspecto oleoso). Diversas metodologias foram testadas inoculando-se *C. gloeosporioides* em plântulas e mudas, porém observaram-se apenas necrose e morte de hipocótilos, lesões necróticas e queda de folhas. Especula-se que tal sintomatologia da doença na folha, seja devido às reações metabólicas do fungo, não tendo ação

direta. Nas regiões da folha com sintoma da MM, não se verificaram presença de hifas de fungos, apenas algumas modificações nos tecidos do mesófilo com deformações nas células epidérmicas, degeneração das células do parênquima paliádico e esponjoso exibindo concreções (material amorfo).

Portanto, este complexo é ainda considerado muito polêmico, e com certeza ainda há dúvidas em relação à metodologia de inoculação, local da planta que está relacionado à mancha manteigosa, exteriorização de sintomas, grau de susceptibilidade e até mesmo mecanismos envolvidos na defesa.

Como sugestões para futuras pesquisas, citam-se: verificar o efeito de extratos metabólicos de isolados de *C. gloeosporioides* (MM) aplicados em plântulas (também por cultura de tecido); estudar mais detalhadamente por meio de estudos bioquímicos e anatômicos as possíveis reações dos sintomas típicos em folhas e se há efeito de resistência ou suscetibilidade no material vegetal pela expressão dos sintomas cloróticos observados em folhas; elucidar sobre os mecanismos envolvidos na defesa por meio também de métodos bioquímicos e por meio de análise histopatológicas; monitoramento dos eventos de pós-penetração do agente pela técnica de GFP, e carbono marcado.