

# EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL, PRODUÇÃO E GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp. ISOLADOS DE *Coffea arabica* L<sup>1</sup>

Effect of temperature on micelial growth, production and conidial germination of *Colletotrichum* spp. from *Coffea arabica* L

Moab Diany Dias<sup>2</sup>, Edson Ampélio Pozza<sup>3</sup>, Mario Sobral de Abreu<sup>3</sup>, Edin Orosco Miranda<sup>3</sup>

## RESUMO

Espécies do gênero *Colletotrichum* são agentes etiológicos de importantes doenças do cafeeiro, porém, ainda pouco estudadas no Brasil. Diante desse fato, objetivou-se com este trabalho foi estudar o efeito da temperatura no crescimento, produção e germinação de conídios de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. Foram avaliados 8 isolados, obtidos de folhas com sintoma de mancha manteigosa, seca de ponteiros e assintomático. Os isolados apresentaram comportamento diferenciado na velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação e na formação de estruturas reprodutivas, com alta capacidade adaptativa em diferentes temperaturas.

**Termos para indexação:** mancha manteigosa, café, temperatura.

## ABSTRACT

The objective of this study was to assess the effect of temperature on micelial growth, production and conidial germination of *Colletotrichum* spp. isolates from branches, leaves and fruits of coffee with symptoms of blister spot and tip blight. The isolates presented differentiated behavior regarding the speed of mycelial growth, sporulation capacity and the formation of reproductive structures, showing high capacity of adaptation to different temperatures.

**Index terms:** blister spot, coffee, temperature.

(Recebido para publicação em 16 de abril de 2003 e aprovado em 21 de julho de 2004)

## INTRODUÇÃO

De acordo com o Anuário... (2000), o Brasil é o primeiro produtor de café verde do mundo. O café é a principal 'commodity' de exportação do Brasil. Além de movimentar, direta e indiretamente, cerca de 15 bilhões de dólares por ano, tem grande importância no aspecto social, por gerar milhares de empregos diretos e indiretos (AGRIANUAL, 2001). Vários fatores podem contribuir para reduzir essa produção e ameaçar a entrada de divisas no País (JULIATTI & SILVA, 2001). Uma das principais causas da redução na produtividade são as doenças. Podem ocorrer diversas doenças nessa cultura, desde o viveiro até o campo de produção. Entre as doenças do cafeeiro, a antracnose dos frutos, a seca de ponteiros e a mancha manteigosa têm assumido importância nos últimos anos (DIAS, 2002). O agente etiológico dessas doenças é o fungo *Colletotrichum* spp.

A descrição original de *Colletotrichum* spp. em café foi feita por Noack em 1901, referente a um isolado proveniente do Brasil, o qual denominou de

*Colletotrichum coffeanum* (NOACK, 1902). Em 1922, no Quênia, o micologista Mc Donald relata a variante "virulans" de *Colletotrichum* em café, associada a CBD (RAYNER, 1950, citado por DORIZZOTTO, 1992). Posteriormente, a variante "virulans" foi denominada de *Colletotrichum kahawae* por Waller et al. (1993).

Espécies de *Colletotrichum* spp. ocorrem como saprófitas e parasitas em todas as regiões do mundo onde se cultiva café. Elas estão associadas à antracnose, seca de ponteiros, queima de frutos, mancha manteigosa e doença da baga do café (CBD). Entre essas doenças, a CBD é o mais grave problema. Em países da África onde o café é cultivado, é a doença mais grave do cafeeiro, afetando principalmente os frutos verdes e alcançando perdas entre 20% a 80% (CARRILLO & ZAMBRANO, 1994).

Espécies de *Colletotrichum* no Brasil são considerada de importância secundária, por alguns pesquisadores. No entanto, segundo informações do livro de amostras de café doente ingressadas na Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, a presença de

1. Parte da dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras/UFLA, pelo primeiro autor, para obter o grau de mestre em Fitopatologia.

2. Fundação Universidade do Tocantins/UNITINS – Caixa Postal 66 – 77.400-000 – Gurupi, TO – moabdiany@hotmail.com

3. Departamento de Fitopatologia/ UFLA – Caixa Postal 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG.

*Colletotrichum* spp. nos diagnósticos de laboratório realizados foi de 27,08% em 1997, 33,33% em 1998 e 36,54% em 1999, sendo assim, considerado como um gênero de risco à cafeicultura brasileira. Além do mais, foram detectadas em vários isolados diferenças tanto morfológicas quanto isoenzimáticas, podendo influenciar na agressividade do patógeno no campo (NECHET, 1999). Dessa forma, torna-se necessário estudar melhor o patógeno, a interação patógeno-hospedeiro e as condições que predispoem a planta ao patógeno. As variáveis climáticas, entre elas a temperatura, exercem importância crucial tanto na infecção quanto na colonização do patógeno, constituindo a variável climática mais correlacionada com respostas biológicas (AGRIOS, 1997; SUTTON, 1988).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas e no de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos de materiais doentes, provenientes de diferentes cidades de Minas Gerais (TABELA 1).

Para isolar o fungo, fragmentos dos materiais enfermos foram lavados com água, passados no álcool 50% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos e em água esterilizada, sendo, colocados em placas de Petri, com 9 cm de diâmetro, contendo, em

média 20 mL de meio de cultura MEA 2% (extrato de malte ágar). Posteriormente, foram acondicionadas em BOD a 25°C por fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. A partir desses isolamentos, foram obtidas culturas monospóricas de *Colletotrichum* spp.

Discos de micélio com 4 mm de diâmetro das culturas monospóricas foram transferidos para placas contendo 20 mL de meio MEA 2% e submetidos às temperaturas de 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, em BOD. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por isolado. Cada repetição foi composta de 5 placas de Petri. Dessa forma, por isolado, foram utilizadas 25 placas. O esquema da análise de variância foi o fatorial, constituído por oito isolados e 5 temperaturas.

Na avaliação do crescimento micelial, fez-se a medição, a cada 24 horas, do diâmetro das colônias, em posição ortogonal, durante sete dias, a partir do momento em que foi colocado o disco de micélio com os isolados no meio de cultura, obtendo-se sete leituras. Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991):

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

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

**TABELA 1** – Identificação, procedência, sintomas e parte da planta onde foram encontrados os sintomas associados a *Colletotrichum* spp.

Identificação	Parte da planta onde foi isolado	Sintoma	Procedência
I-1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, MG
I-2	Folha	Mancha manteigosa	Piumhi, MG
I-3	Folha	Seca de ponteiros	Santo Antônio, MG
I-4	Fruto	Seca de ponteiros	Santo Antônio, MG
I-6	Ramo	Mancha manteigosa	Lavras, MG
I-8	Folha	Assintomático	Nepomuceno, Mg
I-9	Folha	Mancha manteigosa	Nepomuceno, MG
I-10	ramo	Mancha manteigosa	Nepomuceno, MG

Aos 7 dias, após a avaliação do crescimento dos isolados, foram avaliadas a produção e a germinação dos conídios. Para determinar a produção de conídios, fez-se uma suspensão, com a mesma quantidade de água por placa (2 mL), constituindo 25 lâminas por isolado. Posteriormente, procedeu-se à contagem do número de conídios em câmara de 'Newbauer'.

Em relação à porcentagem de germinação conidial, uma alíquota de 50 µL, foi colocada em lâmina escavada para microscopia e mantida em BOD a 25°C. Após 24 horas, procedeu-se à leitura, contando-se 100 conídios por lâmina por repetição. Foram realizadas diluições, de maneira a possibilitar a germinação dos conídios. Foi considerado germinado o conídio cujo tubo germinativo apresentava 50% do seu tamanho.

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

As análises estatísticas foram realizadas no programa SISVAR. As variáveis significativas no teste F da análise de variância foram submetidas à análise de regressão. O ajuste do modelo de regressão foi realizado utilizando-se as repetições das variáveis estudadas. Avaliou-se o ajuste dos modelos linear, quadrático, exponencial, logístico e beta-binomial. O modelo escolhido, utilizado para plotar o gráfico, foi aquele com maior R<sup>2</sup>, menor Quadrado Médio dos Desvios e melhor gráfico de distribuição de resíduos. Para determinar a temperatura ótima ou o ponto de máximo crescimento, produção e germinação de conídios, foi realizada a derivada de primeira ordem da equação de regressão com melhor ajuste.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

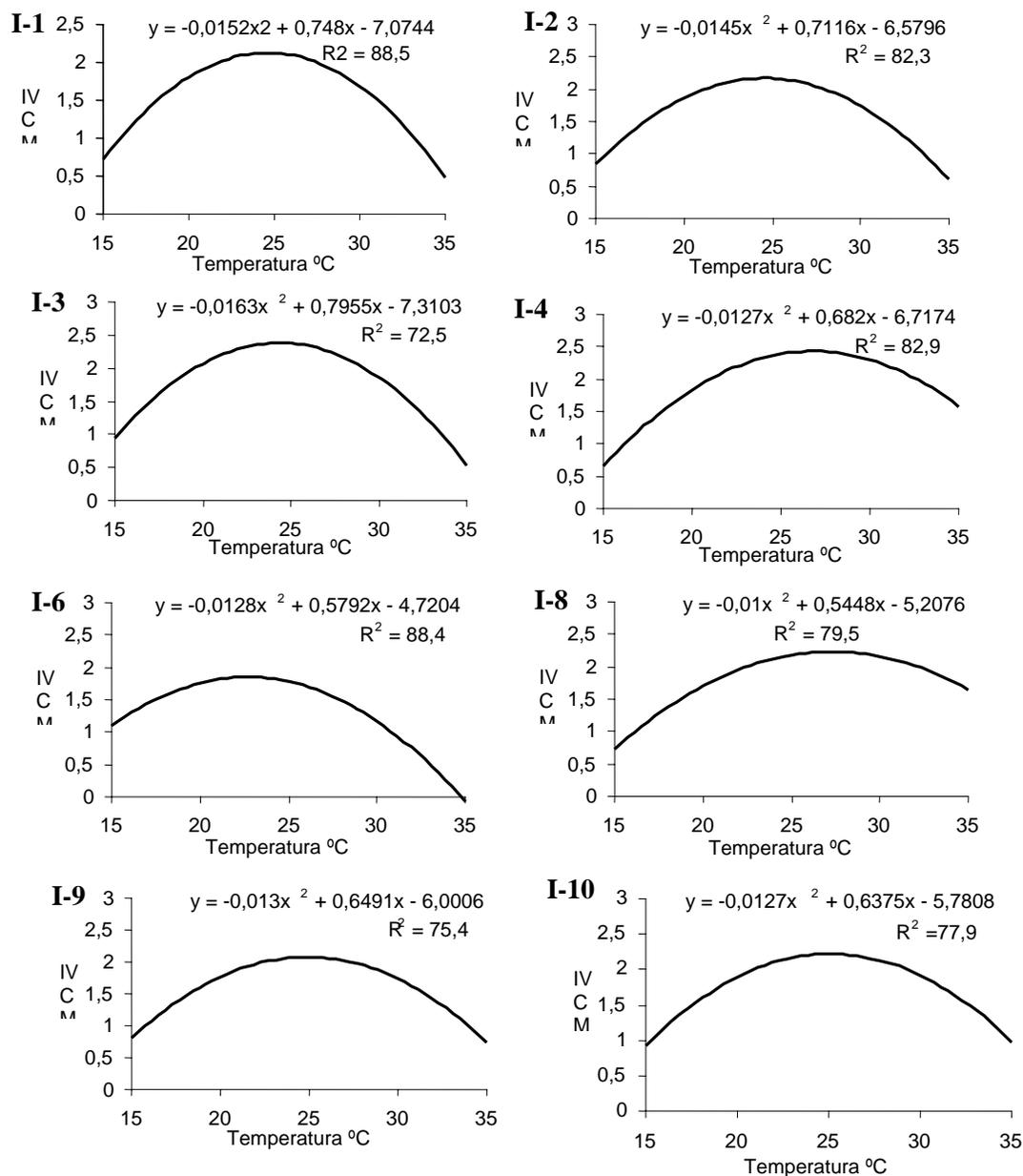
Houve interação significativa entre a temperatura e os isolados para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). A temperatura ótima para o maior IVCM dos diferentes isolados variou entre 22°C e 28°C. Os isolados I-1, I-2 e I-9 apresentaram máximo crescimento a uma temperatura de 24,7°C, obtida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

I-4, I-6 e I-8 apresentaram as temperaturas ótimas de crescimento: 24,4, 26,9, 22,8 e 27,5°C, respectivamente, para o crescimento (FIGURA 1).

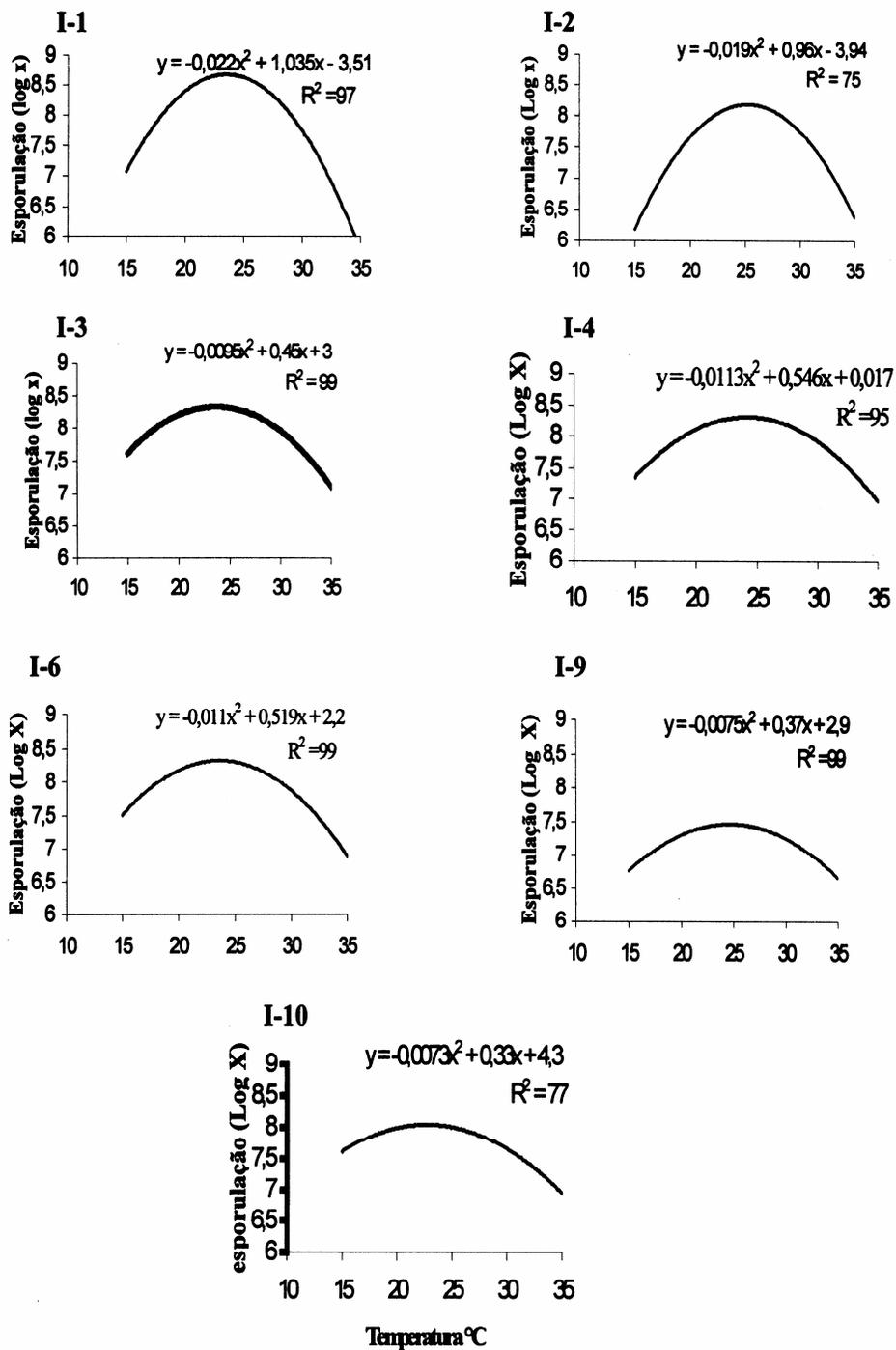
Feitosa et al. (1977) determinaram, por meio de equação do segundo grau, a temperatura de 28°C como o ponto de máximo crescimento para isolados de *Colletotrichum* sp provenientes do cafeeiro. Os dois últimos autores observaram o incremento no crescimento com a elevação da temperatura até 28°C, e a temperatura ótima de crescimento também dependeu do isolado, ocorrendo entre 25°C e 30 °C. Nos isolados avaliados, a temperatura ótima foi inferior à obtida pelos autores acima citados. As temperaturas de 15 e 35°C encontram-se próximas à limítrofe para o crescimento dos isolados, por causar redução drástica no crescimento micelial (FIGURA 1); no entanto, essas temperaturas não foram responsáveis por matar o patógeno. Temperaturas extremas ou limítrofes são responsáveis por aumentar o tempo para iniciar uma epidemia ou ainda atuam de maneira direta nos seus componentes, como por exemplo, aumentando o período latente e de incubação (ROTEM, 1978). A temperatura ótima para colonização de *Colletotrichum coccodes* também está entre 25 a 30°C (BYRNE et al, 1998; DILLARD, 1989). *C. coccodes*, inoculado em fruto do tomate, foi associado a maior número de lesões por fruto e diâmetro médio de lesões quando a temperatura estava entre 25°C e 31 °C (DILLARD, 1989). Quando inoculado em discos de folha na temperatura de 25 °C, ocorreu maior número de lesões, já que o molhamento foliar foi superior a 12 horas (BYRNE et al., 1998).

Para a produção de conídios, também houve interação significativa entre isolados e temperatura. Em relação à temperatura ótima, houve diferença entre os isolados. Os isolados, I-1, I-3, I-4 e I-6 apresentaram a temperatura ótima de 23,5°C, aproximadamente, para a produção de conídios, enquanto os I-2, I-9 e I-10 apresentaram 25, 24,5 e 22,5°C, respectivamente. Não houve ajuste para os modelos de regressão testados para o isolado I-8. Os isolados, I-1, I-2 e I-9 provenientes de sintoma de Mancha Manteigosa apresentaram variação quanto à temperatura ótima para a esporulação; porém, permaneceram entre 23°C e 25°C (FIGURA 2).

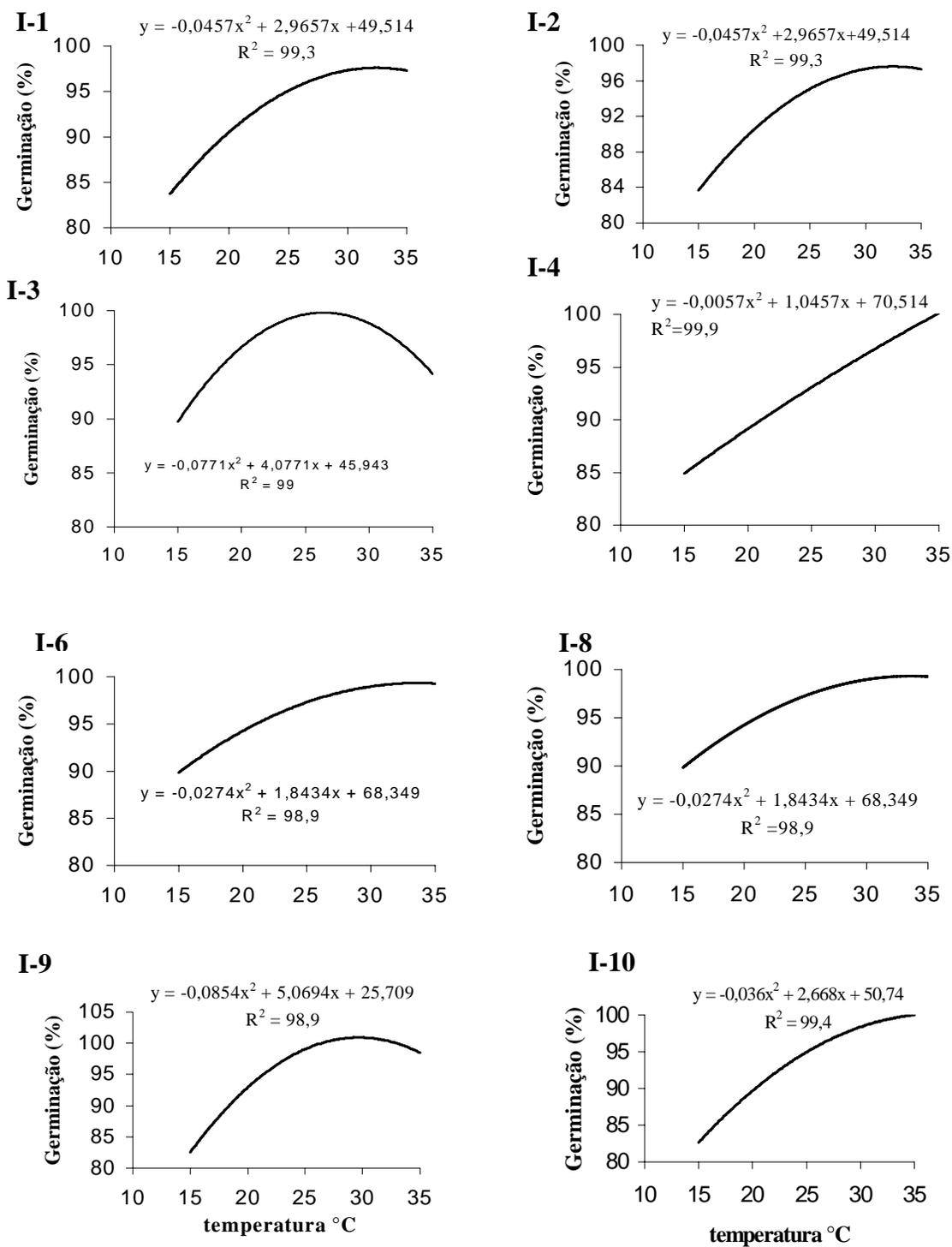
A 30°C, os isolados I-1 e I-9 produziram peritécios no período de sete dias de cultivo. O I-2 apresentou alta capacidade de esporulação, produzindo acérvulos a partir do segundo dia de cultivo. Os isolados I-3, I-4 e I-8 produziram acérvulos nessa temperatura.



**FIGURA 1** – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), ao longo de 7 dias, de isolados de *Colletotrichum* spp em relação à temperatura. UFLA, Lavras, MG, 2002.



**FIGURA 2** – Produção de conídios (esporos/mL) de isolados de *Colletotrichum* sp. submetidos a diferentes temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2002.



**FIGURA 3** – Porcentagem de germinação de conídios de oito isolados de *Colletotrichum* spp. submetidos a diferentes temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Para *C. gloeosporioides*, agente etiológico da mancha da folha de *Myriophyllum spicatum*, nas temperaturas de 28 e 32°C após 2 dias de incubação em meio V8 houve maior produção de conídios (SLADE et al., 1987). Segundo esses autores, altas temperaturas não estimularam a produção de conídios. Fato também observado para *Colletotrichum* spp isolados do cafeeiro e também por outros autores (ISHIDA & AKAI, 1969; MATHER et al., 1949).

Houve interação significativa entre os isolados e a temperatura para a germinação dos conídios. Os isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram variação quanto à temperatura ótima para germinação conidial. Os isolados I-1, I-2, I-3, I-4, I-6, I-8, I-9 e I-10 apresentaram as seguintes temperaturas de ponto de máxima germinação: 22, 33, 29, 35, 27, 34, 30 e 35°C, respectivamente (FIGURA 3). A diferença entre a porcentagem de germinação de conídios, sobre papel celofane, também foi observada para dois isolados de *C. gloeosporioides* da manga. Um dos isolados formou o apressório mais rapidamente a 25°C e o outro a 20°C (ESTRADA et al., 2000).

Existiu grande variabilidade entre os isolados para as variáveis avaliadas, IVCN, capacidade de esporulação e germinação conidial. Os isolados não se comportaram da mesma maneira em relação às três variáveis estudadas, existindo temperaturas ótimas diferentes para crescimento, germinação e produção de conídios para os isolados, sendo a temperatura uma das principais variáveis climáticas responsáveis pela infecção e posterior colonização do patógeno (CAMPBELL & MADDEN, 1990; ROTEM, 1978). Essa variabilidade pode estar relacionada com a alta capacidade de adaptação climática desses isolados. Estrada et al. (2000) sugeriram a presença de ecotipos de *C. gloeosporioides*, agente etiológico da podridão da manga, proveniente das Filipinas, embora tenha ocorrido semelhança genética. Essa diferença, na taxa de germinação, também foi observada para isolados associados a *Stylosanthes guianensis* no Peru (LENNÉ & BROWN, 1991) e na África (MUNAUT & MARAITE, 1998).

## CONCLUSÕES

Houve variabilidade entre os isolados de *Colletotrichum* spp para o IVCN, produção e germinação de conídios em relação à temperatura.

A temperatura ideal para obter o maior IVCN, produção e germinação de conídios não foi semelhante para um mesmo isolado.

Em relação à produção de acérvulos e peritécios, também houve variabilidade entre os isolados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Agros Comunicação, 2001. 545 p.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic, 1997. 635 p.

ANUÁRIO estatístico do café 2000/2001. Rio de Janeiro: Coffee Business, 2000.

BYRNE, J. M.; HAUSBECK, M. K.; MELOCHE, C.; JAROSZ, A. M. Influence of dew period and temperature on foliar infection of greenhouse-grown tomato by *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, Quebec, v. 82, n. 6, p. 639-641, 1998.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Academic, 1990. 532 p.

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

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

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

DILLARD, H. R. Effect of temperature, wetness duration, and inoculation density on infection and lesion development of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 10, p. 1063-1066, 1989.

ESTRADA, A. B.; DODD, J. C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant pathology**, Honolulu, v. 49, p. 608-618, 2000.

- FEITOSA, M. I.; FEICHTENBERGER, M.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V.; LEITE, R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L, no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33-54, jan./jun. 1977.
- ISHIDA, N.; AKAI, S. Relation of temperature to germination of conidia and appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. **Mycologia**, New York, v. 61, p. 382-386, 1969.
- JULIATTI, F. C.; SILVA, S. A. **Manejo integrado de doenças na cafeicultura do cerrado**. Uberlândia: Composer, 2001.
- LENNÉ, J. M.; BROWN, A. E. Factors influencing the germination of pathogenic and weakly pathogenic isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaf surfaces of *Stylosanthes guianensis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 227-232, 1991.
- MATHER, R. S.; BARNETT; LILLY, V. G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, n. 1, p. 104-114, 1949.
- MUNAUT, F.; MARAITE, H. Conidium germination and appressorium penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes guianensis*. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 146, p. 19-26, 1998.
- NECHET, K. de L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n. 1, jan. 1902.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1999.
- ROTEM, J. Climate and weather influence on epidemics. In: HORSFALL, J. G.; DIMOND, A. E. **Plant disease: how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. p. 317-436.
- SLADE, S. J.; HARRIS, R. F.; SMITH, C. S.; ANDREWS, J. H. Microcycle conidiation and spore-carrying capacity of *Colletotrichum gloeosporioides* on solid media. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 9, p. 2106-2110, 1987.
- SUTTON, J. C. Predictive value of weather variables in the epidemiology and management of foliar diseases. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 305-311, 1988.
- WALLER, J. M.; BRIDGE, P. D.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 8, p. 989-994, 1993.