

CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM GRÃOS VERDES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

ROLDÃO, G.M.¹ e PFENNING, L.H.¹

¹ UFLA, Departamento de Fitopatologia, C.P. 37, 37200-000, Lavras-MG; < ludwig@ufla.br >

RESUMO: Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. No entanto, um endofítico, de acordo com as condições do ambiente e o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente. A contaminação interna dos grãos de café por *Aspergillus* spp. é variável, havendo alternância de predominância de espécies ou grupos. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo recuperar e identificar fungos endofíticos de grãos verdes de café e verificar a infecção precoce de *Aspergillus ochraceus* e outros fungos deletérios à qualidade do grão, ainda na lavoura de café. Os grãos foram lavados superficialmente com água destilada, desinfestados em álcool 70% e hipoclorito de sódio 3%, lavados novamente em água destilada e descascados. A casca e a película foram retiradas completamente. Depois foram plaqueados em meio de cultura MEA e DG18. Verificou-se a presença de fungos mitospóricos, pertencentes à classe Hyphomycetes. O meio de cultura SNA tem se mostrado mais eficiente para recuperação de fungos endofíticos do que o meio DG18, possivelmente devido à oxidação que ocorreu entre o meio DG18 e os grãos de café. Em lavouras cultivadas a pleno sol e sombreada, a incidência de fungos endofíticos foi diferenciada. Já para o fungo *Cladosporium cladosporioides* não foi verificada diferença quanto ao tipo de tratamento. Em ambos os tratamentos realizados não foi detectada a presença de *A. ochraceus*, e os trabalhos para verificar sua presença nos grãos verdes de café ainda estão em andamento.

Palavras-chave: café, fungos endofíticos, *Aspergillus ochraceus*.

CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC FUNGI IN GREEN COFFEE BEANS (*Coffea arabica* L.)

ABSTRACT: The fungi that invade the seeds before the crop, while the plants grow in the field, differ with to its predominance in agreement with the culture, the area or geographical location and the climate. Fungi of the gender *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* are the most common components of the

microbiote fungi associated to the coffee, which *Aspergillus ochraceus* may cause opportunist infection in some point of the system of production of the coffee, under favorable environmental conditions for penetration, development and ochratoxin production. In this work, it was evaluated the infection of *A. ochraceus* and other deleterious fungi in the quality of the grain before the crop. Green grains of coffee were disinfected superficially with alcohol 70% and in order to allow the identification of the inner fungi contaminants. Of the disinfected grains, 25 were plated on media SNA and 15 on media DG18 and incubated at the laboratory temperature. Samples also served as controls, being treated only with sterilized water, and alcohol 70%. The presence of mitosporic fungi was verified, belonging to the class Hyphomycetes. Among the used culture means, SNA were more efficient for the growth of endophytic fungi than the DG18 in both treatments (Shaded and Full Sun) and for the controls, the result was similar. It was also verified a large diversity of fungi in the conduction systems. The fungi *Cladosporium cladosporioides* didn't come in a different way in both treatments, what shows that for this fungi, the way of conduction of the farming is not a decisive factor for its growth and development. Although the presence of *A. ochraceus* has not been detected in the isolated samples, it cannot end about the impossibility of its precocious infection in the grains, have seen that the methodology made in this work cannot have been valid for this case, or this fungi can be present in the samples of grains, but under latent form. The works to verify its presence in the green grains of coffee are still in progress.

Key words: coffee, endophytic fungi, *Aspergillus ochraceus*.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. Entretanto um endofítico, de acordo com as condições do ambiente e o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente (Azevedo, 1998). Em geral, microrganismos endofíticos adentram as plantas por aberturas naturais e ferimentos. Isto acontece também no grão de café, onde há a presença de fungos endofíticos, já que a casca, o pergaminho e as películas do grão funcionam como proteção e, provavelmente, a transposição da barreira ocorre durante a germinação e o desenvolvimento da radícula. A fase inicial de desenvolvimento dos frutos, chamada de chumbinho, tem duração em torno de seis semanas, e o fruto não apresenta crescimento visível. Logo após, ocorre a fase de expansão rápida do fruto, com o endurecimento do endocarpo, que irá delimitar o tamanho do grão. Nesta fase, o fungo pode

se encontrar em estado de latência no interior do fruto. A floração constitui vários eventos fisiológicos e morfológicos que vão desde a indução floral até a antese, quando ocorre a abertura da flor. No algodão, o fungo *Aspergillus flavus* tem sido encontrado infectando a cultura, em certas áreas dos EUA, na fase de campo, formando altos níveis de aflatoxina nas sementes. O fungo penetra nas plantas através dos nectários no momento ou até alguns dias depois da antese. Os esporos germinam no estigma durante o florescimento, crescendo através do estilete, e infectam o ovário (Klich et al., 1984). A contaminação interna dos grãos de café por *Aspergillus* é variável, havendo alternância de predominância de espécies ou grupos, porém não é possível detectar correlação com alguma característica da colheita ou do manejo pós-colheita do café (Freitas et al., 2000). *Aspergillus ochraceus* apresenta infecção saprofítica e oportunista, e, em algum ponto do sistema de produção do café, ocorre uma combinação ambiental favorável para penetração, desenvolvimento e produção de ocratoxina (Frank, 1999). Fatores ambientais, como estresse hídrico, são importantes na entrada de fungos em plantas, bem como a aplicação de pesticidas e fertilizantes, que podem influenciar a receptividade fisiológica da planta ou o desenvolvimento da semente (Klich et al., 1984). Como mencionado anteriormente, é difícil estabelecer um limite definido entre microrganismos endofíticos e patogênicos. Muitos endofíticos são relacionados com patógenos; pode ser, inclusive, levantada a hipótese de que todos os patógenos tenham sido derivados de endofíticos e vice-versa, e certos endofíticos, que não causam sintomas em determinado hospedeiro, podem ser patógenos para outros. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo recuperar e identificar fungos endofíticos de grãos verdes de café e verificar se há a infecção precoce de *A. ochraceus* e outros fungos deletérios à qualidade do grão, ainda na lavoura de café.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Amostras de grãos verdes de café foram coletadas de uma lavoura a pleno sol e uma sombreada, ambas localizadas em uma propriedade do município de Lavras, MG. Os grãos foram lavados em água corrente, para eliminar o excesso de sujeira, e imersos em água esterilizada por alguns segundos, para uma limpeza superficial. Depois, foram desinfestados superficialmente por imersão em álcool 70%, por dois minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 3%, por 10 minutos, sendo lavados após esses tratamentos com água esterilizada, por alguns segundos, para retirada do excesso de hipoclorito de sódio, e colocados em papel-filtro esterilizado, para secagem dos grãos. Os grãos foram descascados, tendo a casca e a película retiradas completamente,

sendo 25 grãos plaqueados em meio de cultura SNA e 15 em meio de cultura DG18, e incubados em temperatura ambiente no laboratório. Foi realizado, também, plaqueamento de amostras testemunhas que só sofreram lavagem com água esterilizada, para limpeza superficial, seguida de imersão em álcool 70% e novamente lavagem em água esterilizada, para retirada do excesso de álcool. Ao primeiro sinal de crescimento endofítico, o micélio fúngico foi transferido para meio MEA, para esporulação e identificação. A identificação dos fungos foi feita com base em suas características micromorfológicas, como massa conidial, formato, tamanho e pigmentação dos conídios, presença e tipo de conidióforos e célula conidiogênica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as observações micromorfológicas, verificou-se a presença de fungos mitospóricos. Dentre os Hyphomycetes, foram identificados os fungos do grupo Moniliales, como *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp.; grupo Dematiales, como *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Cladosporium cladosporioides*; e complexo *Helminthosporium* (tipo *Helminthosporium* sp.) (Tabela 1).

Tabela 1 - Incidência de fungos mitospóricos em grãos verdes de café provenientes de dois sistemas de condução de lavoura e plaqueados em dois meios de cultura

Fungo	Sombreado		Pleno Sol	
	SNA	DG18	SNA	DG18
<i>Aspergillus flavus</i>	3 ^a			1
<i>Cladosporium</i> sp.		2		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2		3	
<i>Penicillium</i> sp.	1			
<i>Trichoderma</i> sp.			1	
<i>Scedosporium</i> sp.			1	
<i>Alternaria</i> sp.			1	
Tipo <i>Helminthosporium</i> sp.			1	
<i>Nigrospora</i> sp.		2		

^a Número de amostras com crescimento fúngico.

Entre os meios de cultura usados, o SNA foi mais eficiente para o crescimento de fungos endofíticos que o DG18 em ambos os tratamentos (sombreado e pleno sol). Observou-se, 24 horas após o plaqueamento dos grãos em meio DG18, uma oxidação do meio próximo aos grãos, provavelmente devido ao fato de que algum componente do meio reagiu com substâncias do grão de café, o que pode ter provocado redução no crescimento de fungos neste meio de cultura. A diferença em relação ao SNA foi o

crescimento do fungo *Nigrospora*, que tem sido raramente descrito em literatura como um fungo endofítico (Domsch et al., 1980; Redlin & Carris, 1997).

Para o tratamento testemunha, o resultado foi semelhante ao anterior, sendo verificada a presença de *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.

Foi verificada também uma incidência diferente nos sistemas de condução, onde a diversidade de fungos foi grande, tendo no tratamentos Sombreado a presença de *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium*, enquanto no tratamento a pleno sol a presença foi de *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma* sp., *Scedosporium* sp., *Alternaria* sp. e Tipo *Helminthosporium* sp.

O fungo *Cladosporium cladosporioides* não se apresentou de forma diferente em ambos os tratamentos, o que mostra que, para este fungo, o modo de condução da lavoura não é fator determinante para seu crescimento e desenvolvimento.

Embora não tenha sido detectada a presença de *Aspergillus ochraceus* nas amostras plaqueadas, não se pode concluir sobre a impossibilidade de sua infecção precoce nos grãos, visto que a metodologia empregada neste trabalho pode não ter sido válida para este caso, ou este fungo pode estar presente nas amostras de frutos, mas sob forma latente. Os trabalhos para verificar sua presença nos grãos verdes de café ainda estão em andamento.

CONCLUSÕES

O meio de cultura SNA tem se mostrado mais eficiente para recuperação de fungos endofíticos que o meio DG18, possivelmente devido à oxidação que ocorreu entre o DG18 e os grãos de café. Em lavouras cultivadas a pleno sol e sombreada, a incidência de fungos endofíticos é diferenciada. Já para o fungo *Cladosporium cladosporioides* não foi verificada diferença quanto ao tipo de cultivo. Em ambos os tratamentos realizados não foi detectada a presença de *Aspergillus ochraceus*, e os trabalhos para sua verificação ainda estão em andamento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos**. In: Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 117-137. 1998.

DOMSCH K.H., GAMS W. & ANDERSON T.H. **Compendium of soil fungi**. London, Academic Press, 1: 859. 1980.

FRANK, J.M. & FRISVAD, J.C. Mycological Considerations of Coffee Production Consequential to a HACCP Plan for Mould Prevention. Proc. 18th International Scientific Colloquium on Coffee. Helsinki. 1999 .

FREITAS, R.F., PFENNING, L.H., CHALFOUN, S.M., BATISTA, L.R., MAIA, T.J.A.F. & SANTOS, A.F.C. Ocorrência e severidade da contaminação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por fungos do gênero *Aspergillus* em diversas propriedades do sul de Minas Gerais. Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil. Poços de Caldas, p. 245-248. 2000.

KLICH, M.A., THOMAS, S.H. & MELLON, J.E. Field studies on the mode of entry of *Aspergillus flavus* into cotton seeds. **Mycologia**, 76 4: 665-669. 1984.

REDLIN, S.C. & CARRIS, L. M. Endophytic fungi in grasses and woody plants. St. Paul, APS PRESS, p. 223. 1997.

Apoio: CNPq e FUNCAFÉ.