



MARCELO LORAN DE OLIVEIRA FREITAS

**ETIOLOGIA, INOCULAÇÃO E ESCALA
DIAGRAMÁTICA NO PATOSSISTEMA
(*Colletotrichum* spp.) x CAFEIEIRO**

LAVRAS – MG

2014

MARCELO LORAN DE OLIVEIRA FREITAS

**ETIOLOGIA, INOCULAÇÃO E ESCALA DIAGRAMÁTICA NO
PATOSSISTEMA (*Colletotrichum* spp.) x CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Mario Sobral de Abreu

Coorientador

Dr. Edson Ampélio Pozza

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Freitas, Marcelo Loran de Oliveira.

Etiologia, inoculação e escala diagramática no patossistema
Colletrichum spp. x cafeeiro / Marcelo Loran de Oliveira Freitas. –
Lavras : UFLA, 2014.
121 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Mário Sobral de Abreu.
Bibliografia.

1. *Colletotrichum gloeosporioides*. 2. Composição química. 3.
Localização. 4. Metodologia. 5. Severidade. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

MARCELO LORAN DE OLIVEIRA FREITAS

**ETIOLOGIA, INOCULAÇÃO E ESCALA DIAGRAMÁTICA NO
PATOSSISTEMA (*Colletotrichum* spp.) x CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Dr. Virgílio Anastácio da Silva UFLA

Dr. Mario Sobral de Abreu
Orientador

LAVRAS – MG

2014

A Deus, meu melhor amigo, que sempre me acompanha em meus estudos e
minhas viagens, iluminando sempre os meus passos.

A meus avós, (*in memoriam*), dos fins de semanas passados juntamente com
eles.

A Anísio, meu pai; a Elizabeth, minha mãe e a Renan, meu irmão, pelos
momentos vividos juntos em família.

Aos meus amigos de Lavras e da minha cidade natal.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para a realização dos trabalhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudos

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da (UFLA), pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Mario Sobral de Abreu, pela orientação, paciência e amizade

Ao professor Dr. Edson Ampélio Pozza, pelos ensinamentos que foram de grande importância para a realização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Cleilson do Nascimento Uchôa, pelo incentivo de se trabalhar na área de Fitopatologia.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia: Willian, Samuel, Pedro, Aurivan, Humberson, Leônidas e Jhonata.

Aos amigos do laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades; Cecília, Claudio, Helon, Bruno, Felipe, Cristóvão e Gilvane, que colaboraram na realização dos trabalhos.

Aos amigos do Jovens Sarados, que me auxiliam na minha caminhada terrena.

RESUMO GERAL

Conduziu-se este trabalho, com os objetivos de verificar a localização do *C. gloeosporioides* patogênico no caule; verificar a melhor metodologia de inoculação do *C. gloeosporioides* em folha e em ramo; construir e validar uma escala diagramática para avaliação da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro e verificar quais nutrientes minerais e seus níveis nas lesões de mancha manteigosa. Os isolados foram obtidos da folha, do pecíolo e do ramo plagiotrópico que foi fragmentado em 10 pedaços. Após o isolamento, foi verificada a porcentagem de isolados de *Colletotrichum* spp. Para avaliar o melhor método de inoculação em folha, mudas foram inoculadas com cinco concentrações e seis tratamentos. Para avaliar o melhor método de inoculação em caule, o internódio terminal foi inoculado com 6 tratamentos. Para a construção e validação da escala, foram coletadas folhas, determinadas a severidade real, definidos os limites, construída a escala e validada por sete avaliadores. Para avaliar a constituição química das lesões fragmentos de folhas de cafeeiro contendo tecido sintomático e assintomático, foram desidratados, recobertos com carbono e submetidos à microanálise de raios-X. O *C. gloeosporioides* causador da mancha manteigosa coloniza o ramo do cafeeiro desde o pecíolo até a inserção do ramo plagiotrópico com o ortotrópico. O melhor método de inoculação em folha foi o que utilizou o ferimento por bombril. A melhor concentração de suspensão foi a de 4×10^6 conídios/mL. O melhor método de inoculação em caule foi o de inserção de palito colonizado pelo fungo. Utilizando a escala proposta, os avaliadores apresentaram melhores níveis de acurácia, precisão, reprodutibilidade e repetibilidade. Quanto à constituição química, maior teor de K foi encontrado no tecido assintomático em torno da lesão, decrescendo em direção ao tecido sintomático.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*. Composição química. Localização. Metodologia. Severidade.

GENERAL ABSTRACT

The objectives of this work were to: verify the location of the pathogenic *C. gloeosporioides* on the stem; verify the best methodology for *C. gloeosporioides* inoculation on leaf and branch; construct and validate a diagrammatic scale to evaluate the severity of the blister spot on coffee leaves; and verify which mineral nutrients and their levels are present on the blister spot. The isolates were obtained from the leaves, petiole and plagiotropic branch, which was fragmented into 10 pieces. After isolation, the percentage of *Colletotrichum* spp. isolates was verified. To evaluate the best inoculation method in seedling leaves, the same were inoculated with five concentrations and six treatments. To evaluate the best inoculation method in the stem, the terminal internode was inoculated with six treatments. To construct and validate the scale, leaves were collected, and seven evaluators determined the real severity, defined the limits and constructed and validated the scale. To evaluate the chemical constitution of the lesions of coffee leaves containing symptomatic and asymptomatic tissue, the leaves were dehydrated, covered with carbon and submitted to X-ray microanalysis. The *C. gloeosporioides* causer of the blister spot colonizes the coffee branch from the petiole to the insertion of the plagiotropic branch with the orthotropic branch. The best inoculation method on leaves was that which used the lesion from steel sponge. The best suspension concentration was of 4×10^6 conidia/mL. The best inoculation method on stem was that of insertion of a stick colonized by the fungus. Using the proposed scale, the evaluators presented better accuracy, precision, reproducibility and repeatability levels. Regarding the chemical constitution, a higher K content was found in the asymptomatic tissue surrounding the lesion, decreasing towards the symptomatic tissue.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*. Chemical composition. Location. Methodology. Severity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Ramo plagiotrópico de cafeeiro subdividido em pedaços iguais de onde foram feitos os isolamentos. T1 ao T12 – isolados de planta sadia e T13 ao T24 – isolados de planta doente. T1 e T13 – isolamento de folha, T2 e T14 – isolamento de pecíolo, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T15, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22, T23 e T24 – isolamento das diferentes partes do ramo plagiotrópico40

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Média da porcentagem de área da folha lesionada em cada tratamento. Tratamento (1-6) 1 - ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes 2 - ferimento na página abaxial da folha com carbeto de silício em pó 3 - ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço 4 - ferimento causado pelo vento do ventilador a 5,8 km/h 1, 2, 3 e 4 deposição da suspensão 6 – deposição da suspensão sem ferimento e 5 – injeção da suspensão de inculo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente a 5% no teste Scott-Knot.....61

- Figura 2 Folhas de mudas de café inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* com diferentes métodos de inoculação. T1 - ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes T2 - ferimento na página abaxial da folha com carbeto de silício T3 - ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço T4 - ferimento causado por ventilação forçada. Nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 foi depositada a suspensão de inóculo. T6 – deposição da suspensão sem ferimento e T5 – injeção da suspensão de inóculo.....62
- Figura 3 Curvas de regressão da porcentagem de área lesionada de acordo com a metodologia e a concentração de suspensão utilizada. 1 = tratamento 1 - ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes, 2 = tratamento 2 - ferimento na página abaxial da folha com carbeto de silício em pó, 3 = tratamento 3 - ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço. 1,2 e 3 deposição da suspensão de inóculo63
- Figura 4 Sintoma de necrose no caule inoculado com *Colletotrichum gloeosporioides*. A – Inserção de palito de dente no caule sem a presença do micélio do fungo, B – Inserção de palito de dente no caule recobertos com o micélio do fungo, C – Ferimento do caule com esponja de aço e deposição de água destilada e esterilizada, B – Ferimento do caule com esponja de aço e deposição da suspensão de inóculo na concentração de 4×10^6 conídios/mL65

Figura 5	Eletromicrografia de varredura de ramos e folhas de cafeeiro inoculadas com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . A: Ramo ortotrópico de mudas de cafeeiro com colonização de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> B: Caule de mudas de cafeeiro sadia C: Mesofilo da folha de cafeeiro colonizada com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> D: Mesofilo de folhas de cafeeiro sadia	67
----------	---	----

CAPÍTULO 4

Figura 1	Escala diagramática de folhas de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa	80
Figura 2	Distribuição dos resíduos (severidade estimada – severidade real) das estimativas da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro estimada sem e com o auxílio da escala diagramática em duas avaliações.....	83

CAPÍTULO 5

Figura 1	Elementos químicos detectados nas folhas de cafeeiro com a técnica de microanálise de raios x	97
Figura 2	Foto na lupa da transição de um tecido doente para sadio, de uma lesão de mancha manteigosa em folha de cafeeiro e a representação gráfica da proporção da média dos elementos químicos Potássio e Cálcio presentes em dez amostras.....	99
Figura 3	Foto na lupa da transição de um tecido doente para sadio, de uma lesão de cercosporiose em folha de cafeeiro e a representação gráfica da proporção da média dos elementos químicos Potássio e Cálcio presentes em dez amostras.....	100

Figura 4 Foto na lupa de um tecido foliar sadio e a representação gráfica da proporção da média dos elementos químico Potássio e Cálcio presentes em dez amostras..... 101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Porcentagem de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de plantas doentes e sadias nas diferentes localizações dos ramos plagiotrópicos da planta e teste de patogenicidade desses isolados . 44
- Tabela 2 Coloração dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de plantas doentes e sadias nas diferentes localizações da planta..... 45

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Descrição dos métodos de inoculação de *C. gloeosporioides* em folhas de mudas de cafeeiro 55
- Tabela 2 Descrição dos métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em ramos de mudas de cafeeiro 56
- Tabela 3 Área foliar lesionada em cada concentração de suspensão dentro de cada tratamento..... 64

CAPÍTULO 4

- Tabela 1 Distribuição de frequência, a intervalos unitários, dos valores de severidade (%) da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro 78
- Tabela 2 Intercepto (β_0), coeficiente angular da reta (β_1) e coeficiente de determinação (R^2) de equações de regressão linear relacionando estimativas visuais da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro, efetuadas por avaliadores sem e com o auxílio da escala diagramática, à severidade real determinada eletronicamente 82

Tabela 3	Intercepto (β_0), coeficiente angular da reta (β_1) e coeficiente de determinação (R^2) de equações de regressão linear relacionando a segunda à primeira estimativa da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro, efetuada por um mesmo avaliador com o auxílio da escala diagramática.....	84
Tabela 4	Coeficiente de determinação (R^2) de equações de regressão linear relacionando as estimativas visuais da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro entre avaliadores combinados aos pares, sem e com auxílio da escala diagramática na primeira e segunda avaliação.....	86

CAPÍTULO 5

Tabela 1	Média da proporção dos elementos químicos cálcio e potássio no tecido sadio e doente de folhas de cafeeiro com mancha manteigosa, com cercosporiose e sadias.....	98
----------	---	----

SUMÁRIO

	CAPITULO 1	Introdução geral	16
1	INTRODUÇÃO		16
1.1	Complexo <i>Colletotrichum</i> - cafeeiro		18
1.2	Coffee Berry Disease (CBD)		18
1.3	Mancha Manteigosa		19
1.4	Estudos de patogenicidade		20
1.5	Método de inoculação		21
1.6	Isolamento de patógeno		22
1.7	Fatores ambientais no estabelecimento das doenças		23
1.8	Funções do K na planta		23
1.9	Microscopia eletrônica		25
1.10	Microanálise de raios x		25
1.11	Escalas diagramáticas para severidade de doenças		26
	REFERÊNCIAS		28
	CAPITULO 2	Solamento de (<i>Colletotrichum</i> spp.) de diferentes partes do ramo plagiotrópico de cafeeiros saudáveis e com mancha manteigosa	35
1	INTRODUÇÃO		37
2	MATERIAL E MÉTODOS		39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO		43
4	CONCLUSÃO		47
	REFERÊNCIAS		48
	CAPÍTULO 3	Metodologia de inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em folha e em ramo ortotrópico de mudas de cafeeiro	50
1	INTRODUÇÃO		52
2	MATERIAL E METODOS		54
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO		59
4	CONCLUSÃO		68
	REFERÊNCIAS		69
	CAPITULO 4	Escala diagramática para mancha manteigosa em folhas de cafeeiro	71
1	INTRODUÇÃO		73
2	MATERIAL E MÉTODOS		75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO		78
4	CONCLUSÃO		87
	REFERÊNCIAS		88

	CAPITULO 5 Distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos de folhas de cafeeiro em torno da lesão de mancha manteigosa e cercosporiose utilizando-se a microanálise de raios-x	91
1	INTRODUÇÃO	93
2	MATERIAL E MÉTODOS	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXOS	105

CAPITULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma das atividades mais importantes do país, visto que o Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, totalizando uma área de 2.282,0 mil hectares, destinada ao cultivo do cafeeiro. Dentre os estados produtores de café, Minas Gerais destaca-se como o maior produtor, participando com 54,25% da produção nacional cerca de 25,24 milhões dentre as 46,53 milhões de sacas, previstas para o ano de 2014, no Brasil (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014), enfatizando a grande importância da cafeicultura para o estado de Minas Gerais e para o Brasil.

A deficiência nutricional, o manejo inadequado da lavoura, pragas e doenças são os principais responsáveis pela redução da qualidade e da produtividade do cafeeiro. A cultura do cafeeiro é acometida por diversos patógenos de origem fúngica bacteriana e virótica que causam doenças na planta e são capazes de reduzir a qualidade e a produtividade do cafeeiro (GARCIA JÚNIOR et al., 2003). As principais doenças que afetam o cafeeiro são: a ferrugem alaranjada, a cercosporiose, a mancha de phoma, a mancha aureolada, a mancha anelar e as doenças do complexo *Colletotrichum* (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

O complexo *Colletotrichum* – cafeeiro é composto por diversos patossistemas como: a antracnose de folhas e frutos, a seca ou morte de ponteiros, a queima castanha, a mancha manteigosa e a antracnose-dos-frutos-verdes ou CBD (*Coffee Berry Disease*) (MOUEN et al., 2007; OROZCO, 2003).

Dentre as doenças desse complexo, a mancha manteigosa do cafeeiro é uma enfermidade cujo agente etiológico *Colletotrichum gloeosporioides* coloniza os vasos do xilema e do floema (FERREIRA et al., 2009c; PEREIRA et

al., 2009) levando a planta a manifestar os sintomas reflexos nas folhas, conhecidos por mancha manteigosa.

A transmissão dessa doença é via semente proveniente de planta infectada (FERREIRA et al., 2009b, 2010) não sendo conhecido outro método de disseminação da doença no campo (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009). Baseado nesse conhecimento, diversas metodologias têm sido utilizadas para inoculação do *C. gloeosporioides* em plantas de cafeeiro (NECHET; ABREU, 2002), porém, não se tem uma uniformidade na manifestação dos sintomas.

As plantas de cafeeiro quando inoculadas com *C. gloeosporioides* apresentam sintomas de antracnose e não de mancha manteigosa. Essa manifestação do sintoma de mancha manteigosa pode estar relacionada à fatores ambientais como os nutrientes minerais. Em alguns patossistemas do cafeeiro, já foi observada a influência do desequilíbrio nutricional de nutrientes no progresso dessas doenças (LIMA et al., 2010; POZZA et al., 2001; SANTOS et al., 2008).

O controle químico das plantas com mancha manteigosa em campo, mostrou-se ineficiente no combate à doença (FERREIRA et al., 2009b). Porém, o autor utilizou a contagem do número de lesões na folha para avaliar o progresso da doença, o que não é muito preciso, visto que duas lesões pequenas podem ocupar menor área na folha que uma lesão grande.

Em decorrência do exposto, objetivou-se, neste trabalho: verificar a localização do *C. gloeosporioides* patogênico no caule; verificar a melhor metodologia de inoculação do *C. gloeosporioides* em folha e em ramo; Propor, avaliar e validar uma escala diagramática, para a avaliação da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro e verificar quais nutrientes minerais e seus níveis nas lesões de mancha manteigosa.

1.1 Complexo *Colletotrichum* - cafeeiro

Atualmente muitas espécies de fungo do gênero *Colletotrichum* são conhecidas por estarem associadas a um hospedeiro vegetal, ocasionando doença, sendo estas, muitas vezes, economicamente importantes (JEFFRIES et al., 1990).

O primeiro relato da associação *Colletotrichum*/cafeeiro, realizado no Brasil, foi feito por Noack (1901), onde o autor classificou o patógeno como sendo *C. coffeanum*. No entanto, atualmente, é conhecido um complexo de espécies associado ao cafeeiro, sendo que as duas doenças que mais se destacam são a Coffee Berry Disease CBD e a mancha manteigosa.

1.2 Coffee Berry Disease (CBD)

Em 1926, no Kenya, foi relatada uma variante virulenta dentro do gênero *Colletotrichum* atacando os frutos (MCDONALD, 1926). Posteriormente, por meio de análises morfológicas, bioquímicas e patogênicas Waller et al. (1993), conseguiram uma discriminação relevante dos isolados que causavam a CBD, dos demais isolados de *Colletotrichum* encontrados na África, propondo assim uma nova espécie conhecida como *Colletotrichum kahawae* para aqueles isolados associados a CBD.

A CBD infecta folhas e grãos em qualquer estágio de desenvolvimento e induz perdas que alcançam 70 – 80% de perdas no campo (GRIFFITHS; GIBBS; WALLER, 1971). Os sintomas de CBD são manchas necróticas escuras, com contornos claros, que são formadas sobre o pericarpo de frutos imaturos, as manchas podem coalescer e cobrir todo o fruto, logo após infecção os frutos caem rapidamente (MOUEN et al., 2007).

A disseminação do patógeno é auxiliada pela chuva que, ao impactar sobre os acérvulos, respingam e carregam os conídios (MOUEN et al., 2010; WALLER, 1972), a umidade perto do ponto de saturação e a temperatura entre 20°C e 22°C são as condições ambientais favoráveis ao estabelecimento da doença (GIBBS, 1969; MASABA; WALLER, 1992).

Diversos levantamentos foram realizados, tentando verificar a ocorrência da CBD nos cafezais brasileiros o que não foi observado (BRIDGE et al., 2008; OROZCO, 2003).

1.3 Mancha Manteigosa

A mancha manteigosa foi primeiramente relatada na Costa Rica por Wellman (1957), quando o autor acreditou ser uma doença de natureza virótica. Posteriormente, em 1972, o agente etiológico foi identificado como um agente fúngico do gênero *Colletotrichum* (VARGAS; GONZALES, 1972). Baseado em estudos morfológicos e bioquímicos de *Colletotrichum* isolados de folhas, ramos e frutos com sintoma de mancha manteigosa, o fungo foi classificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (DIAS, 2002) e, utilizando as técnicas de RAPD e SSRs, foi visto que os isolados provenientes de plantas com sintomas da mancha manteigosa referem-se à *C. gloeosporioides* (OROZCO, 2003).

Os sintomas de mancha manteigosa aparecem inicialmente nas folhas novas, sendo estas manchas de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro, em estádios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares, que chegam a coalescer, determinando queda prematura das folhas (BITANCOURT, 1958; MANSK; MATIELLO, 1977), nos ramos observa-se um forte definhamento com grande número de ramos mortos, provocando declínio vegetativo e produtivo (FERREIRA; PEREIRA; ABREU,

2005). Estudos histopatológicos desses ramos e das nervuras das folhas com sintoma de mancha manteigosa apresentaram os vasos do xilema, floema e células do córtex colonizados por *C. gloeosporioides* (PEREIRA et al., 2009), enquanto os frutos com sintoma da mancha manteigosa apresentaram colonização nos tecidos do exocarpo, mesocarpo, endocarpo e endosperma (FERREIRA et al., 2009a).

O progresso da doença no campo é mais acentuado entre os meses de outubro a janeiro, com um elevado progresso de mortes de ramos influenciado pelas altas precipitações pluviais (FERREIRA et al., 2009c). Esse progresso da doença só ocorre dentro da planta, pois ainda não foi relatada a contaminação planta a planta, sendo observados apenas focos unitários no campo o que indica que a principal via de transmissão é a semente (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009; FERREIRA et al., 2009c, 2010).

Como medida de controle, foi recomendada a erradicação de todas as plantas doentes (VARGAS; GONZÁLES, 1972), pois o controle químico e a poda se mostraram ineficientes no controle dessa doença (FERREIRA et al., 2009c).

1.4 Estudos de patogenicidade

Estudos de patogenicidade em hipocótilo revelaram que a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 foi vista como uma cultivar suscetível ao patógeno *C. gloeosporioides* (OROZCO, 2003; SANTOS NETO, 2012). Mesmo esta cultivar suscetível quando inoculada com os isolados mais agressivos, os sintomas observados foram manchas irregulares de coloração castanha a castanho-acinzentado, não apresentando o sintoma de mancha manteigosa. Porém, Nechet e Abreu (2002), observaram uma muda das 10 inoculadas com o sintoma de mancha nos folíolos, causado por *C. gloeosporioides*.

1.5 Método de inoculação

Entende – se por método de inoculação, a maneira pela qual se utiliza para enxertar, inserir um patógeno dentro de um organismo (FERREIRA, 1999). Estes devem ser práticos, seguros e estáveis e correlacionar com as infecções naturais no campo (SIVIERO; FURTADO; MACHADO, 2002). No ato da inoculação, outro fator importante a ser observado é a concentração de inoculo na suspensão que, em muitas vezes, determina o sucesso da inoculação (MORAES et al., 2006).

A capacidade do patógeno, ao atravessar as barreiras das plantas e colonizá-las, na maioria das vezes está ligada à produção de enzimas que auxiliam nesse processo (AGRIOS, 2005). Segundo Loureiro et al. (2011), a quantidade da enzima fosfatase alcalina produzida pelo *C. gloeosporioides* é inferior à quantidade produzida pelo *C. kahawae*, o que determina a capacidade do *C. kahawae* conseguir penetrar nos tecidos do fruto da planta sem a necessidade de um ferimento.

A inoculação de folhas de cafeeiro com *C. gloeosporioides*, via pulverização sem ferimento, não é eficaz para ocorrência da doença (NECHET; ABREU, 2002). Para a associação do patógeno com o cafeeiro foi desenvolvida uma metodologia por Abreu (1988), que utiliza ferimentos feitos com um conjunto de alfinetes entomológicos, com deposição de 10 µL da suspensão na concentração de 2×10^6 conídios/mL e cobertura com um disco de papel. No entanto, não há estudos que relatem a eficiência de outros métodos de inoculação em folha e tampouco um método de inoculação em caule.

No patossistema mancha manteigosa, o patógeno *C. gloeosporioides* coloniza os vasos do xilema e do floema da planta de cafeeiro (PEREIRA et al., 2009). Para a inserção artificial do patógeno nos vasos condutores da planta, existem metodologias que utilizam insetos vetores e ferimentos

(CAVALCANTE; COÊLHO; PEREZ, 2002; MARUCCI, 2003). Como não há relato da transmissão do *C. gloeosporioides* por insetos vetores, a inoculação do caule via ferimento seria a mais adequada.

Em patossistemas como *Ceratocystis frimbriata* em mangueira e *Colletotrichum graminicola* em milho, já foram comprovados eficientes métodos que utilizam ferimentos com estilete, colocando-se uma porção de estruturas do fungo no local, injeção da suspensão utilizando-se seringas descartáveis, ferimento com agulha imersa em suspensão de inoculo, inserção de palitos recobertos por micélio do fungo (BORGES; REZENDE; PINHO, 2001; MUNKVOLD; MCGEE; CARLTON, 1997; RIBEIRO et al., 1984).

1.6 Isolamento de patógeno

O isolamento consiste na separação do patógeno dos tecidos da planta e dos demais microorganismos presentes no local da interação planta patógeno. A interação planta patógeno pode ocorrer em diversos órgãos e tecidos da planta (AGRIOS, 2005). As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (SOUZA et al., 2004). No patossistema, mancha manteigosa do cafeeiro, o patógeno endofítico *C. gloeosporioides* coloniza os vasos condutores do caule da planta (PEREIRA et al., 2009). Embora conhecido a presença do patógeno de modo endofítico no tecido do hospedeiro, seu isolamento envolve cuidados especiais para que sejam excluídos os microorganismos que vivem na superfície do hospedeiro os epifíticos. Um dos processos mais comuns para isolar patógenos no interior dos tecidos do caule faz a fragmentação, desinfestação em etanol a 70%, hipoclorito de sódio a 3% e lavagem em água esterilizada e adição em um meio de cultura que possibilite o crescimento do patógeno (AZEVEDO, 1998).

1.7 Fatores ambientais no estabelecimento das doenças

Para a infecção do patógeno e progresso das doenças é necessária uma série de fatores ambientais que conjuntamente cooperam para tal. A alta temperatura e a umidade elevada são os fatores ambientais que mais influenciam no início e no desenvolvimento de doenças infecciosas em plantas (VIDA et al., 2004). A temperatura age como catalisador do processo de estabelecimento da doença, atuando no número de gerações do patógeno, enquanto a água livre ou próxima ao ponto de saturação é condição essencial para que ocorram a liberação e germinação de esporos e a inserção da hifa de penetração no tecido do hospedeiro (AGRIOS, 2005).

Outro fator ambiental relacionado ao estabelecimento das doenças é a nutrição mineral, que tem sido relatada como fator importante, em razão das descobertas recentes, que mostram sua íntima relação com o progresso das doenças (BALARDIN et al., 2006; POZZA; POZZA, 2012; SANTOS et al., 2008; SOUZA et al., 2007; TOMAZELA et al., 2006).

1.8 Funções do K na planta

O potássio é um nutriente classificado como segundo elemento extraído em maior quantidade pelas plantas (MARSCHNER, 1995), sendo exigido pelo cafeeiro em quantidades equivalentes ao nitrogênio que é o elemento mais requerido pela planta (SILVA et al., 1999). No decorrer do crescimento e desenvolvimento da planta, o cafeeiro passa a requerer uma maior quantidade de K, sendo particularmente intensa quando a planta atinge a maturidade, em virtude das quantidades extraídas pelos frutos na colheita (MANCUSO, 2012).

O potássio é particularmente absorvido pela planta na forma K^+ e o principal mecanismo de absorção pela planta é a difusão (MELAMED; GASPAR; MIEKELEY, 2009).

O potássio na forma de íons K^+ é necessário na síntese de proteínas em plantas superiores. Íons K^+ também estão envolvidos em várias etapas do processo de tradução, incluindo a ligação do tRNA com os ribossomos (EVANS; WILDES, 1971; WYN JONES; BRADY; SPEIRS, 1979). O íon potássio também participa da regulação da abertura dos estômatos no ciclo diurno da planta (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, o K tem efeito na formação de amido nas folhas; quando baixa o seu teor nas folhas, a produção de amido diminui e, como consequência, a formação de novos ramos e novas folhas reduz-se, o número de grãos chochos aumenta, e a colheita diminui (POZZA et al., 2001).

A deficiência de K em plantas de café pode ser detectada pelo aspecto visual das folhas que de um modo geral ficam cloróticas e necróticas nas margens e pontas das folhas, começando das mais velhas e terminando nas mais jovens. As folhas amarelecem e, em seguida, tornam-se marrons e, por fim, secam e morrem (MALAVOLTA, 2006).

O potássio quando em níveis excessivos interferem na absorção de outros nutrientes como Ca e Mg. Quando disponibilizado para a planta em níveis adequados não compete com os demais nutrientes presentes nos tecidos foliares, muitos dos quais são essenciais para o processo de fotossíntese (MARSCHNER, 1995).

A resistência das plantas às doenças é influenciada por uma adubação potássica adequada (POZZA et al., 2001).

Os níveis de potássio no tecido sintomático podem cair quando este é infectado com algum patógeno. Esse fato ocorre, em decorrência de toxinas

fúngicas que induzem o aumento do efluxo de íons K^+ do local de infecção (RICHARDSON; CROUGHAN, 1989).

1.9 Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica é definida como tal por utilizar um feixe de elétrons como fonte de iluminação da amostra, possibilitando ganhos em termos de aumento e resolução do espécime em questão (ALVES, 2005).

A microscopia eletrônica de varredura tem a capacidade de revelar informações sobre a formação de barreiras físicas à penetração e colonização dos patógenos (POZZA et al., 2004). Uma dificuldade encontrada na visualização do tecido no MEV é a obtenção de cortes do tecido que apresente uma superfície sem danos. A metodologia que se tem utilizado para resolver esse problema é o corte do material vegetal em nitrogênio líquido (ALVES, 2004; LINS et al., 2008). Em relação ao patossistema *C. gloeosporioides* – cafeeiro a técnica de microscopia eletrônica, têm permitido realizar importantes descrições (FERREIRA et al., 2009c; PEREIRA et al., 2009).

1.10 Microanálise de raios x

A microanálise de raios x permite descobrir e quantificar os elementos químicos presentes na amostra (MORAES et al., 2006; POZZA et al., 2004). Essa metodologia consiste em uma técnica não destrutiva, podendo determinar quantidades de até 1-2% dos elementos presentes em volumes micrométricos da amostra (ALVES, 2005).

O princípio de funcionamento do detector de sinais de raios x é baseado no fato de que cada raio x que chega, ao detector produz uma voltagem que é

proporcional, em valores de energia, ao raio x característico de cada átomo excitado (MOSELEY, 1913).

Outra característica importante da microanálise é a possibilidade de se obter o mapa composicional da região em observação, permitindo que se correlacione o padrão cristalográfico ou granulométrico particular à morfologia do espécime, com informações sobre a composição minimamente detalhada (ALVES, 2005).

1.11 Escalas diagramáticas para severidade de doenças

A utilização de escalas diagramáticas é um importante método para mensurar com precisão e de forma confiável a severidade da doença de plantas (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996; MARTINS et al., 2004). As escalas diagramáticas podem ser definidas por um conjunto de ilustrações de plantas ou órgãos de plantas com sintomas de doença que representem a severidade da doença no campo (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

Na elaboração de escalas diagramáticas, devem ser considerados importantes aspectos como conferir se o limite superior da escala corresponde à intensidade máxima de doença observada, conferir se a quantidade real de doença no campo e a sua representação na escala tem uma alta precisão e se as subdivisões da escala respeitam as limitações da acuidade visual humana, definidas pela lei de estímulo-resposta de Weber-Fechner. Conforme essa lei, a acuidade visual é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo (HORSFALL; BARRAT, 1945; HORSFALL; COWLING, 1978). Outro ponto a ser ressaltado é o fato de que a visão humana lê tecidos doentes para níveis de severidade abaixo de 50% e tecidos sadios para níveis de severidade superiores a 50% (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Por fim, é necessário verificar a qualidade das estimativas propiciadas pela escala diagramática, os níveis de

acurácia, precisão e reprodutibilidade (CAMPBELL; MADDEN, 1990; KRANZ, 1988; NUTTER JUNIOR; SCHULTZ, 1995; NUTTER JUNIOR; WORAWITLIKIT, 1989).

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. **Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk e Br. em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor**. 1988. 68 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 263 p.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 43 p.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 117-137.
- BALARDIN, R. S. et al. Influência do fósforo e do potássio na severidade da ferrugem da soja *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 462-467, out. 2006.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299 p.
- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.
- BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V.; PINHO, R. G. von. Inoculação artificial de colmos de milho em diferentes idades e concentrações de inóculo e sua relação com a expressão da resistência a *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 715-720, dez. 2001.
- BRIDGE, P. D. et al. Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 156, n. 5, p. 274-280, May 2008.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.

CAVALCANTI, L. S.; COELHO, R. S. B.; PEREZ, J. O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 1-5, jan./fev. 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_17_09_29_46_boletim_cafe_-_original_normalizado.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2014.

DIAS, M. D. **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.

EVANS, H. J.; WILDES, R. A. Potassium and its role in enzyme activation. In: INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE COLLOQUIA, 8., 1971, Bernia. **Proceedings...** Bernia: Potash Institute, 1971. p. 13-39.

FERREIRA, A. B. H. **Aurélio século XXI: o dicionário da Língua Portuguesa**. 3. ed. rev. e ampl. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999. 2128 p.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. A. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros e com sintomas da mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, jul./ago. 2009a.

FERREIRA, J. B. et al. Efeito de fungicidas e influência de fatores climáticos sobre a mancha manteigosa no cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 417-424, mar./abr. 2009b.

FERREIRA, J. B. et al. Events of the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of *Coffea arabica* L. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 4, p. 273-281, 2009c.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

FERREIRA, J. B.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *C. 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.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, jun. 2003.

GIBBS, J. N. Inoculum sources for coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 64, p. 515-522, 1969.

GRIFFITHS, E.; GIBBS, L. N.; WALLER, L. M. Control of coffee berry disease. **Annual of Applied Biology**, Warwick, v. 67, p. 45-74, 1971.

HORSFALL, J. C.; BARRAT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 35, p. 665-667, 1945.

HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. Pathometry: the measurement of plant disease. In: _____. **Plant disease: an advanced treatise: how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. v. 2, p. 119-136.

JEFFRIES, P. et al. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruits crops. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 39, n. 3, p. 343-366, Sept. 1990.

KRANZ, J. Measuring plant disease. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Ed.). **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer Verlag, 1988. p. 35-50.

LIMA, L. M. et al. Relação nitrogênio /potássio com mancha de Phoma e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 223-228, ago. 2010.

LINS, S. R. O. et al. Constatação de *Xylella fastidiosa* em pecíolos e hipocótilos de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 42-47, jan./fev. 2008.

LOUREIRO, A. et al. Isoenzymatic characterization of *Colletotrichum kahawae* isolates with different levels of aggressiveness. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 287-293, Oct. 2011.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006. 631 p.

MANCUSO, M. A. C. **Fontes e doses de potássio na cultura do café (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 60 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “Conilon” (*Coffeacanephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 1995. 889 p.

MARTINS, M. C. et al. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 179-184, abr. 2004.

MARUCCI, R. C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* L.** 2003. 139 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

MASABA, D.; WALLER, J. M. Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 237-245.

MCDONALD, J. A preliminary account of disease of green coffee berries in Kenya colony. **Transactions of the British mycological Society**, Manchester, v. 11, n. 1, p. 141-154, Aug. 1926.

MELAMED, R.; GASPAR, J. C.; MIEKELEY, N. Pó-de-rocha como fertilizante alternativo para sistemas de produção sustentáveis em solos tropicais. In: LAPIDOLOUREIRO, F. E. V.; MELAMED, R.; FIGUEIREDO NETO, J. (Ed.). **Fertilizantes: agroindústria e sustentabilidade**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2009. p. 385-395.

MORAES, S. R. et al. Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2006.

MOSELEY, H. G. J. The high-frequency spectra of the elements. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, London, v. 26, n. 156, p. 1024-1034, 1913.

MOUEN, B. J. A. et al. Role of rainfall in the development of coffee berry disease in *Coffea arabica* caused by *Colletotrichum kahawae*, in Cameroon. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 59, n. 2, p. 324-329, Apr. 2010.

MOUEN, B. J. A. et al. Spatio-temporal dynamics of arabica coffee berry disease due to *Colletotrichum kahawae* on a plot scale. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 10, p. 1229-1236, Oct. 2007.

MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 2, p. 209-217, Oct. 1997.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

NOACK, D. Die Krankheiten des Kaffebaunes in Brasilien III, *Colletotrichum coffeanum* sp. **Pflanzenzüchtg**, Berlin, v. 2, p. 202, 1901.

NUTTER JUNIOR, F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 17, n. 1, p. 174-184, 1995.

NUTTER JUNIOR, F. W.; WORAWITLIKIT, O. Disease. Pro: a computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 1135, 1989.

OROZCO, E. F. M. **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, 2003.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*: cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, 2009.

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, 2004.

- POZZA, A. A. A. et al. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 53-60, jan. 2001.
- POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. **Semiologia do cafeeiro**: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, 2010. 215 p.
- POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: _____. **Avanços da otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário**. Lavras: UFLA, 2012. p. 259-281.
- RIBEIRO, I. J. A. et al. Seca da mangueira: VII., resistência de cultivares de mangueira ao fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Bragantia**, Campinas, v. 43, p. 237-243, 1984.
- RICHARDSON, M. D.; CROUGHAN, S. S. Potassium influence on susceptibility of bermudagrass to *Helminthosporium cynodontis* toxin. **Crop Science**, Madison, v. 29, p. 1280-1282, 1989.
- SANTOS, F. S. et al. Adubação orgânica, nutrição e progresso de cercosporiose e ferrugem-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 783-791, jul. 2008.
- SANTOS NETO, H. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados da mancha manteigosa**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- SILVA, E. B. et al. Fontes e doses de potássio na produção e qualidade do grão de café beneficiado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 335-345, mar. 1999.
- SIVIERO, A.; FURTADO, E. L.; MACHADO, M. A. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causada por *Phytophthora* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 203-219, 2002.
- SOUZA, A. Q. L. et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich and *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, S. R. de et al. Doenças foliares, cancro e número de frutos relacionados com a adubação nitrogenada em pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 260-264, ago. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TOMAZELA, A. L. et al. Doses de nitrogênio e fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da ferrugem e atributos morfológicos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 2, p. 192-201, 2006.

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, 1972.

VIDA, J. B. et al. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 355-372, ago. 2004.

WALLER, J. M. Water-borne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 71, p. 1-18, 1972.

WALLER, J. W. et al. Characterization of the coffee berry disease pathogens, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 8, p. 989-994, Aug. 1993.

WELLMAN, F. L. Blister spot of arabica coffee from virus in Costa Rica. **Turrialba**, San José, v. 7, n. 4, p. 116-115, 1957.

WYN JONES, R. G.; BRADY, C. J.; SPEIRS, J. Ionic and osmotic relations in plant cells. In: LAIDMAN, D. L.; WYN JONES, R. G. (Ed.). **Recent advances in the biochemistry of cereals**. London: Academic, 1979. p. 63-103.

CAPITULO 2 Isolamento de (*Colletotrichum* spp.) de diferentes partes do ramo plagiotrópico de cafeeiros sadios e com mancha manteigosa

RESUMO

A mancha manteigosa é uma doença cujo agente etiológico é *Colletotrichum gloeosporioides* que coloniza sistemicamente os vasos condutores da planta de cafeeiro. Neste estudo, objetivou-se avaliar a presença, localização e patogenicidade do *C. gloeosporioides* no ramo plagiotrópico de cafeeiros com mancha manteigosa. Ramos de plantas doentes e sadias que foram seccionados, desinfestados e adicionados em meio de cultura para o isolamento. Os isolados foram obtidos da folha, do pecíolo e do ramo plagiotrópico que foi fragmentado em 10 pedaços. Após o isolamento, foi verificada a porcentagem de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos, a coloração desses isolados e a patogenicidade, inoculando-os em mudas de cafeeiro. Foi obtida uma maior quantidade de isolados de *Colletotrichum* spp. dos ramos doentes; esses isolados apresentaram uma coloração cinza- escura e, exceto os isolados da folha, todos foram positivos no teste de patogenicidade. Os isolados de plantas sadias não foram capazes de causar doença nas plantas inoculadas e apresentaram uma coloração variada da colônia. Esses resultados revelam que o *Colletotrichum gloeosporioides* causador da mancha manteigosa coloniza sistemicamente todo o ramo do cafeeiro, desde o pecíolo até a inserção do ramo plagiotrópico com o ortotrópico.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*. Isolamento. Teste de patogenicidade.

ABSTRACT

The blister spot is a disease of which the etiological agent is *Colletotrichum gloeosporioides*, which systemically colonizes the conducting vessels of the coffee plant. The objective of this study was to assess the presence, location and pathogenicity of the *C. gloeosporioides* on the plagiotropic branch of coffee plants with blister spot. Branches of sick and healthy plants were severed, disinfected and placed in culture medium for isolation. The isolates were obtained from the leaf, petiole and plagiotropic branch, which was fragmented into 10 pieces. After isolation, the percentage of *Colletotrichum* spp. isolates, the coloration of those isolates and the pathogenicity were verified by inoculating these in coffee seedlings. A larger quantity of *Colletotrichum* spp. isolates was obtained from the sick branches. These isolates showed dark gray coloring and, excluding the leaf isolates, all were positive in the pathogenicity test. The isolates from healthy plants were not capable of causing disease in the inoculated plants, and showed varied colony coloration. These results reveal that the *Colletotrichum gloeosporioides* responsible for the blister spot systemically colonizes the entire branch of the coffee plant, from the petiole to the insertion of the plagiotropic branch with the orthotropic branch.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*. Isolation. Pathogenicity test.

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro é afetado por diversas doenças como a ferrugem alaranjada, a cercosporiose, a mancha de phoma, a mancha aureolada, a mancha anelar e as doenças do complexo *Colletotrichum* – cafeeiro que diminuem a produção e a qualidade dos grãos (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

A mancha manteigosa do cafeeiro é causada pelo agente etiológico *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) (FERREIRA et al., 2009b; LINS; ALVES; ABREU, 2007). Os sintomas de mancha manteigosa aparecem inicialmente nas folhas novas, sendo essas manchas de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro, em estádios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares, que chegam a coalescer, determinando queda prematura das folhas (BITANCOURT, 1958; FERREIRA et al., 2009b), nos ramos observa-se um forte definhamento com grande número de ramos mortos, provocando declínio vegetativo e produtivo, nos frutos a doença os afeta ainda verdes, levando - os à queda prematura (FERREIRA et al., 2005).

Estudos histopatológicos desses ramos e das nervuras das folhas com sintoma de mancha manteigosa apresentaram os vasos do xilema, floema e células do córtex colonizados por *C. gloeosporioides* (PEREIRA et al., 2009) levando a planta a manifestar os sintomas reflexo nas folhas, conhecidos por mancha manteigosa.

No entanto, não se sabe em que ponto dos ramos de uma planta doente está presente o *C. gloeosporioides*, conhecimentos estes necessários para a adoção de medidas de manejo como a poda.

Objetivou-se, neste estudo avaliar a presença, localização e patogenicidade do *C. gloeosporioides* no ramo plagiotrópico de cafeeiros com mancha manteigosa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu no isolamento, identificação, quantificação e classificação quanto à cor de isolados do *Colletotrichum* spp. obtidos de diferentes partes de ramos plagiotrópicos de plantas doentes e saudas. A segunda etapa consistiu no teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. anteriormente obtidos.

Para realizar o experimento, foram coletados 3 ramos plagiotrópicos inteiros, cortados na inserção com o ramo plagiotrópico, obtidos de plantas com mancha manteigosa e 3 de plantas saudas. Ambos retirados de plantas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, com 6 anos de idade, localizada no departamento de agricultura setor de cafeicultura.

Para o isolamento os ramos foram seccionados em 10 pedaços de tamanhos iguais (desde a inserção do ramo plagiotrópico com o ortotrópico até o primeiro par de folhas). Também foi feito o isolamento de fragmentos do pecíolo e da folha do primeiro par de folhas constituindo assim 12 tratamentos (T), sendo enumerados do T1 ao T12 fragmentos do ramo plagiotrópico obtidos de plantas saudas e T13 ao T24 fragmentos do ramo plagiotrópico obtidos de plantas doentes, (Figura 1).

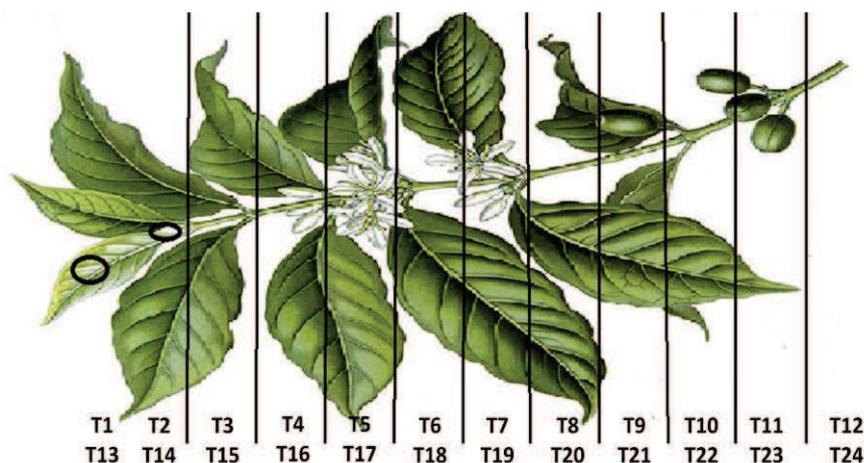


Figura 1 Ramo plagiotrópico de cafeeiro subdividido em pedaços iguais de onde foram feitos os isolamentos. T1 ao T12 – isolados de planta sadia e T13 ao T24 – isolados de planta doente. T1 e T13 – isolamento de folha, T2 e T14 – isolamento de pecíolo, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T15, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22, T23 e T24 – isolamento das diferentes partes do ramo plagiotrópico

Cada tratamento foi composto por quinze fragmentos de tecido, obtidos a partir da junção de cinco fragmentos coletados em cada um dos três ramos, na posição equivalente ao tratamento. Os fragmentos obtidos foram desinfestados em álcool a 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos e lavados em água destilada e esterilizada duas vezes. Posteriormente os 15 fragmentos de cada tratamento foram depositados em 5 placas de petri de 9 cm, ou seja 3/placa, contendo MEA (Extrato de Malte – Ágar) a 2% e incubadas em BOD a 25° C e fotoperíodo 12 horas por 7 dias. a ser isolado. O delineamento foi inteiramente casualizado com 24 tratamentos e 5 repetições na qual uma placa de petri constituía uma repetição com 3 fragmentos.

A avaliação da presença do patógeno no tecido isolado foi feito de dois em dois dias, observando o crescimento e o desenvolvimento de suas colônias..

Os fungos foram identificados como *C. gloeosporioides* de acordo com a chave de classificação proposta por Sutton, (1980). Ao oitavo dia foi avaliada a porcentagem de colônias de *C. gloeosporioides* obtidas em relação aos 15 fragmentos depositados em meio de cultura. . As colônias de todos isolados de *C. gloeosporioides* foram classificadas quanto à coloração e foi feita a cultura monospórica dos mesmos. Após a tomada da placa e a esporulação, foi feita a suspensão e a inoculação de cada isolado obtido para confirmar a patogenicidade.

Mudas de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 foram obtidas a partir da sementeira em sacos de polietileno contendo substrato constituído de solo, areia e esterco bovino decomposto na proporção de 3:1:1 e acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas até a obtenção de plantas com dez pares de folha. O delineamento foi em blocos casualizados com 26 tratamentos, 4 repetições e duas plantas por unidade experimental, sendo inoculados os dois pares de folhas mais novos. Os tratamentos consistiram na inoculação do isolado predominante de *Colletotrichum* spp. obtidos de cada um dos 24 tratamentos, um tratamento com o isolado de *C. gloeosporioides* reconhecidamente patogênico e outro com água destilada esterilizada. Para inocular os tratamentos, primeiramente foi obtida suspensão de conídios das colônias crescidas por oito dias, adicionando água destilada e esterilizada às placas de petri com o fungo, raspando-as com estilete para então calibrar a suspensão de inóculo de 4×10^6 conídios/ml em câmara de Neubauer. As suspensões obtidas foram imediatamente inoculadas na página abaxial das 4 folhas dos dois pares de folhas mais novos em uma área circular com 2 cm de diâmetro feridas com esponja de aço e depositados 50 µl do tratamento. Após inocular as mudas, estas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas, na temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

A incidência de doença foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação, sempre comparando os sintomas dos isolados obtidos nos diferentes fragmentos com o do patogênico padrão.

Os dados obtidos da porcentagem de isolados de *C. gloeosporioides* foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade. Como os dados obtidos não tiveram um comportamento normal eles foram transformados pela fórmula raiz de X+1, submetidos ao teste F da análise de variância a 5% e quando significativos foram submetidos ao teste de Scott Knott a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas doentes e sadias retrataram no isolamento *Colletotrichum* spp. .O isolamento de *Colletotrichum* spp. de plantas com mancha manteigosa já foi relatado anteriormente, visto que o fungo que causa a doença é o *Colletotrichum gloeosporioides* (CARVALHO et al., 2012) Esse fato pode ser explicado pelo fato de que algumas espécies de *Colletotrichum* spp. se associam endofítica e epifítica no tecido das plantas. Duran et al. (2005) e Silva et al. (2006) encontraram fungos do gênero *Colletotrichum* spp. associados a plantas de citrus, graviola e pinha de forma endofítica e Ferreira, Abreu e Pereira (2005) encontraram o mesmo fungo associado a sementes e frutos do cafeeiro de forma endofítica. Link e Onofre (2010), encontraram fungo do gênero *Colletotrichum* spp. em *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) de forma epifítica.

O número médio de isolados do gênero *Colletotrichum* spp. foi maior em plantas doentes comparado com o numero de isolados obtidos de plantas sadia diferindo estatisticamente entre si, quando analisados com o teste Scott knot a 5 % de probabilidade. (Tabela 1). Esse fato pode ser explicado pela associação patogênica sistêmica do *C. gloeosporioides* nos ramos das plantas doentes (PEREIRA et al., 2009) e ainda pela presença de *Colletotrichum* spp. epifíticos, ocorrendo assim uma maior probabilidade de se isolar um fungo do gênero *Colletotrichum* spp. de uma planta doente do que de uma planta sadia. O número médio de isolados obtidos da folha, pecíolo e caule tanto de planta sadia como de planta doente não diferenciaram entre si estatisticamente pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Como o fungo *C. gloeosporioides* coloniza sistemicamente todo o ramo plagiotrópico, a poda tipo esqueletamento não seria eficaz na eliminação do patógeno, visto que poda tipo esqueletamento consiste em eliminar cerca de 1/3

a 2/3 do comprimento dos ramos plagiotrópicos, resultando na diminuição da quantidade de segmentos de ramos produtivos (NICK, 1998).

Nos testes de patogenicidade realizados, os isolados de plantas sadias não foram capazes de colonizar a folha da planta e manifestar o sintoma de necrose característico da inoculação de *C. gloeosporioides* (NECHET; ABREU, 2002). Dados semelhantes foram obtidos por (FERREIRA et al., 2009a) que, ao inocular *C. gloeosporioides* isolados de manga em cafeeiro, não obtiveram reação de doença.

Tabela 1 Porcentagem de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de plantas doentes e sadias nas diferentes localizações dos ramos plagiotrópicos da planta e teste de patogenicidade desses isolados

Tecido isolado	(% de <i>Colletotrichum</i> spp. Isolados)		Reação dos isolados no teste de patogenicidade	
	Planta sadia	Planta doente	Planta sadia	Planta doente
Folha	14,81 Aa	48,14 Bb	-	-
Pecíolo	14,81 Aa	66,66 Bb	-	+
1º secção do ramo plagiotrópico	11,11 Aa	59,25 Bb	-	+
2º secção do ramo plagiotrópico	29,63 Aa	74,07 Bb	-	+
3º secção do ramo plagiotrópico	18,52 Aa	70,36 Bb	-	+
4º secção do ramo plagiotrópico	22,22 Aa	55,55 Bb	-	+
5º secção do ramo plagiotrópico	29,63 Aa	48,14 Bb	-	+
6º secção do ramo plagiotrópico	7,40 Aa	59,25 Bb	-	+

“Tabela 1, conclusão”

Tecido isolado	(% de <i>Colletotrichum</i> spp. Isolados)		Reação dos isolados no teste de patogenicidade	
	Planta sadia	Planta doente	Planta sadia	Planta doente
7° secção do ramo plagiotrópico	18,52 Aa	44,44 Bb	-	+
8° secção do ramo plagiotrópico	11,11 Aa	33,33 Bb	-	+
9° secção do ramo plagiotrópico	3,70 Aa	59,25 Bb	-	+
10° secção do ramo plagiotrópico	14,81 Aa	59,25 Bb	-	+
CV (%)	42,08		-	-

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferenciam entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. (+) presença (-) e ausência de reação de doença causada pelos isolados.

Tabela 2 Coloração dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de plantas doentes e sadias nas diferentes localizações da planta

Tecido isolado	Coloração das colônias	
	Planta sadia	Planta doente
Folha	Cinza clara	Branca
Pecíolo	Branca	Cinza escura
1° secção do ramo plagiotrópico	Cinza escura	Cinza escura
2° secção do ramo plagiotrópico	Cinza clara	Cinza escura
3° secção do ramo plagiotrópico	Branca	Cinza escura

“Tabela 2, conclusão”

Tecido isolado	Coloração das colônias	
	Planta sadia	Planta doente
4° secção do ramo plagiotrópico	Cinza clara	Cinza escura
5° secção do ramo plagiotrópico	Branca	Cinza escura
6° secção do ramo plagiotrópico	Cinza escura	Cinza escura
7° secção do ramo plagiotrópico	Cinza clara	Cinza escura
8° secção do ramo plagiotrópico	Cinza clara	Cinza escura
9° secção do ramo plagiotrópico	Cinza clara	Cinza escura
10° secção do ramo plagiotrópico	Cinza escura	Cinza escura

Todos os isolados provenientes de plantas doentes foram capazes de causar doença quando inoculados em plantas de cafeeiro, exceto o isolado de folha. Esse fato pode ser explicado pelo fato de que os isolados de *C. gloeosporioides* patogênico estão localizados nos vasos condutores do pecíolo e caule da planta (PEREIRA et al., 2009). Os sintomas observados nas folhas são sintomas reflexo da colonização dos vasos do xilema e floema.

A coloração predominante das colônias para os isolados obtidos de plantas doentes foram cinza-escura, enquanto para os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de plantas sadias foram obtidas colônias de diversas colorações com predominância da cor cinza- clara (Tabela 2).

4 CONCLUSÃO

A maior porcentagem de isolados de *Colletotrichum* spp. foi observado em plantas com mancha manteigosa. Somente os isolados obtidos de pecíolos e ramos plagiotrópicos de plantas doentes foram capazes de causar doença quando inoculados.

A coloração das colônias de *C. gloeosporioides* patogênicas apresentaram uma coloração cinza-escuro.

REFERÊNCIAS

- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.
- CARVALHO, H. P. et al. Efeito de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, agente etiológico da mancha manteigosa, na germinação e viabilidade de sementes de cafeeiro1. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 34, n. 2, p. 264-271, 2012.
- DURÁN, E. L. et al. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 83, n. 4, p. 350-355, Apr. 2005.
- FERREIRA, J. B.; ABREU, M.; 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.
- FERREIRA, J. B. et al. Efeito de fungicidas no controle da seca de ramos do cafeeiro (*C. arabica* L.) com mancha manteigosa (*Colletotrichum* spp.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 111, ago. 2005. Resumo. Suplemento.
- FERREIRA, J. B. et al. Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 4, p. 273-281, 2009a.
- FERREIRA, J. B. et al. Morphologic aspects of colonization of *Colletotrichum gloeosporioides* on organs of coffee plants with blister spot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, jul./ago. 2009b.
- LINK, S.; ONOFRE, S. B. Microrganismos epifíticos da vassourinha *Baccharis dracunculifolia* D. C. (*Asteraceae*). **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 3, n. 1, p. 131-143, abr. 2010.
- LINS, S. R. O.; ALVES, E.; ABREU, M. S. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 488-495, dez. 2007.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

NICK, J. A. **DRIS para cafeeiros podados**. 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1998.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*: cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, 2009.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. **Semiologia do cafeeiro**: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, 2010. 215 p.

SILVA, R. L. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Surrey: CMI, 1980. 696 p.

CAPÍTULO 3 Metodologia de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em folha e em ramo ortotrópico de mudas de cafeeiro

RESUMO

Neste estudo, objetivou-se avaliar metodologias de inoculação de *C. gloeosporioides* em folha e em ramo de cafeeiro. Para avaliar o melhor método de inoculação em folha, as mudas foram inoculadas com as concentrações de 0, 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 e 4×10^6 conídios/mL e os tratamentos foram: T1 - ferimento por um conjunto de dez alfinetes entomológicos T2 - ferimento com carbetó de silício em pó T3 - ferimento com esponja de aço T4 - ferimento por ventilação forçada T6 – ausência de ferimento, sendo nesses tratamentos feito a deposição da suspensão de inoculo e T5 – injeção da suspensão de inoculo no mesófilo foliar. Para avaliar o melhor método de inoculação em caule, o internódio terminal foi inoculado com os tratamentos: T1 - corte em “V” com bisturi T2 - testemunha sem ferimento T6 - ferimento com esponja de aço. Nesses tratamentos, foram feitas as deposições das cinco concentrações de suspensão T3 - Corte em “V” com bisturi e adição de meio de cultura com e sem colônia do fungo T4 - Inserção de palito de dente com e sem colônia do fungo T5 - Inserção de palito de dente imerso nas suspensões. Os experimentos foram conduzidos em blocos casualizados e as variáveis foram submetidas ao teste de Tukey e Scott-Knot a 5% e, a partir da severidade final da doença e para cada concentração de inoculo, foi realizada a análise de regressão e plotagem das curvas. Ao término do experimento foi feito o isolamento e visualização dos melhores métodos em microscópio eletrônico de varredura. O melhor método de inoculação em folha foi o T3. A melhor concentração de suspensão foi a de 4×10^6 conídios/mL. O melhor método de inoculação em ramo foi o T4 que fez crescerem as colônias. Os melhores métodos apresentaram colonização do fungo nos tecidos da planta.

Palavras-chave: Inoculação. Microscopia eletrônica de varredura. Severidade.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate methods of *C. gloeosporioides* inoculation on coffee leaf and stem. To assess the best inoculation method on the leaf, the seedlings were inoculated with concentrations of $0,5 \times 10^5$, 1×10^6 , 2×10^6 and 4×10^6 conidia/mL with the treatments: T1 - wounded by a set of ten entomological pins, T2 - wounded with silicon carbide powder, T3 - wounded with steel sponge, T4 - wounded with forced ventilation, T6 - no wound, depositing the inoculum suspension, and T5 - injection of the inoculum suspension into the foliar mesophyll. To assess the best inoculation method on the stem, the terminal internode was inoculated with treatments: T1 - "V" cut with a scalpel, T2 - control without injury, and T6 - wounded with steel sponge, depositing five of the suspension concentrations, T3 - "V" cut with a scalpel with the addition of culture medium with and without fungal colony, T4 - insertion of a toothpick with and without the fungal colony, and T5 - insertion of a toothpick immersed in the suspensions. The experiments were conducted in randomized blocks and the variables were subjected to the Tukey and Scott Knot tests at 5% and, with the final disease severity and for each inoculum concentration, regression analysis and plotting of the curves was performed. At the end of the experiment, the inoculation and visualization of the best methods was done on scanning electron microscope. The best inoculation method on the leaf was T3. The best suspension concentration was 4×10^6 conidios/mL. The best inoculation method on the stem was the T4 which grew colonies. The best methods showed fungal colonization in the plant tissues.

Keywords: Inoculation. Scanning electron microscopy. Severity.

1 INTRODUÇÃO

O complexo *Colletotrichum* – cafeeiro é composto por diversos patossistemas como: a antracnose de folhas e frutos, a seca ou morte de ponteiros, a mancha manteigosa e a antracnose-dos-frutos-verdes ou coffee berry disease (MOUEN et al., 2007; OROZCO, 2003).

Dentre esses patossistemas, a mancha manteigosa tem causado preocupação, visto que nas plantas doentes há uma intensa seca de ramos que leva a planta a um declínio vegetativo e produtivo (DORIZOTO; ABREU, 1993; FERREIRA et al., 2004).

A disseminação e transmissão do patógeno de uma planta para outra é via sementes (FERREIRA et al., 2010) não foi observada transmissão planta a planta no campo (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009). Alguns estudos de microscopia do processo infeccioso foram feitos por Ferreira et al. (2009), para demonstrar possíveis vias de penetração do fungo na planta, sendo observada, principalmente, a penetração via ferimentos.

Para a realização de estudos em um patossistema, muitas vezes é necessário ter bem definida a metodologia de inoculação. Diversas metodologias têm sido utilizadas para inoculação do *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ) em plântulas e plantas de cafeeiro. As plântulas de cafeeiro foram capazes de ser infectadas quando pulverizadas com suspensão de inoculo de *C. gloeosporioides*., enquanto que a inoculação em folhas de plantas sem utilizar ferimentos não foi capaz de estabelecer a doença. Ao utilizar a técnica de ferimento na inoculação da suspensão, as plantas inoculadas apresentaram sintomas, porém não houve uma uniformidade na manifestação dos sintomas (NECHET; ABREU, 2002).

Sabe – se que o *C. gloeosporioides* coloniza sistemicamente os vasos condutores das plantas localizados no caule, porém ainda não foi testada uma

metodologia de inoculação em caule. Assim sendo, objetivou-se, neste estudo avaliar metodologias de inoculação de *C. gloeosporioides* em folha e em ramo de muda de cafeeiro.

2 MATERIAL E METODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas, no departamento de Fitopatologia e no Fitotron® no Departamento de Agricultura, setor de Cafeicultura ambos da Universidade Federal de Lavras UFLA.

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizado foi obtido a partir do isolamento de ramos plagiotrópico de plantas com mancha manteigosa da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, no Departamento de Agricultura setor de cafeicultura da UFLA.

Os ramos doentes foram trazidos para o laboratório seccionados e desinfestados em álcool 70%, por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2 % por 2 minutos e lavados duas vezes em água destilada e esterilizada. Após essa etapa, os fragmentos foram depositados em placas de petri de 9 cm de diâmetro, contendo o meio de cultura MEA (Extrato de Malte-Ágar) 2% e incubados em BOD a 25° C fotoperíodo 12 horas durante sete dias. Após os sete dias, foi selecionada uma colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* e retirado um disco de micélio que foi transferido para outra placa de petri, contendo MEA 2% e incubada em BOD nas mesmas condições descritas anteriormente até a esporulação. A partir da esporulação, foi adicionada água destilada e esterilizada sobre a colônia e foi feita uma suspensão de conídios que foi depositada sobre uma placa, contendo o meio sólido de ágar-água e com o auxílio de um microscópio óptico de luz e um estilete foi possível a seleção de um único conídio que foi colocado em uma placa de petri ,contendo MEA a 2% para a obtenção de uma cultura monospórica.

Para avaliar o melhor método de inoculação em folha, foram feitas inoculações de acordo com os métodos da tabela 1, de uma área circular de 2 cm de diâmetro nos dois primeiros pares das folhas das mudas.

Tabela 1 Descrição dos métodos de inoculação de *C. gloeosporioides* em folhas de mudas de cafeeiro

Método de ferimento da folha	Método de aplicação da suspensão
T1 - Ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes.	Deposição de 50 μ L sobre o ferimento.
T2 - Ferimento na página abaxial da folha com carbeta de silício em pó.	Deposição de 50 μ L sobre o ferimento.
T3 - Ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço.	Deposição de 50 μ L sobre o ferimento.
T4 - Ferimento causado pelo vento do ventilador a 5.8 km/h.	Deposição de 50 μ L sobre a folha..
T5 - Injeção.	Injeção de 50 μ L no mesofilo da folha.
T6 - Testemunha sem ferimento.	Deposição de 50 μ L sobre a folha.

As mudas utilizadas no experimento foram da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 com seis pares de folha, crescidas em casa de vegetação e acondicionadas em saquinhos de ploietileno de 400 mL com a mistura de solo, areia e esterco bovino decomposto na proporção de 3:1:1.

Para a obtenção da suspensão nas concentrações 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 e 4×10^6 foi adicionada água destilada e esterilizada sobre as colônias obtidas de cultura monospórica, foi feita a raspagem a contagem e a calibração com o auxílio de uma Câmara de Newbauer e um microscópio óptico.

As mudas foram inoculadas, com as suspensões de conídios de *C. gloeosporioides*, nas concentrações de 0, 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 e 4×10^6 conídios/mL, de acordo com os métodos descritos anteriormente. Depois de inoculadas, as plantas foram mantidas a 23°C ($\pm 2^\circ$ C), Umidade Relativa de 95%

($\pm 5\%$) e Fotoperíodo de 12 horas em um período de 48 horas. Após esse período, a umidade relativa foi alterada para 75% ($\pm 5\%$) até a finalização do experimento. Quinze dias após a inoculação do fungo, foi finalizado o experimento realizando as avaliações da severidade final da doença. Para avaliar a severidade, as folhas inoculadas foram destacadas da planta e escaneadas, para serem analisadas no programa Assess® que quantificou a área lesionada em relação à área foliar total. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 6 tratamentos com 5 doses de inoculação e 3 repetições, com 3 plantas por unidade experimental.

Para avaliar o melhor método de inoculação em ramos, o delineamento experimental foi em blocos casualizados com 6 tratamentos com 5 doses de inoculação e 4 repetições, com 2 plantas por unidade experimental. O internódio terminal do ramo ortotrópico foi inoculado de acordo com os tratamentos descritos na tabela 2.

Tabela 2 Descrição dos métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em ramos de mudas de café

Método de ferimento do ramo	Método de aplicação da suspensão
T1 - Corte em “V” com bisturi.	Deposição de 50 μ L
T2 - Testemunha sem ferimento.	Deposição de 50 μ L
T3 - Corte em “V” com bisturi.	Adição de disco de micélio e recobrimento com uma fita crepe
T4 - Inserção de palito de dente.	Palitos recobertos por micélio do fungo
T5 - Inserção de palito de dente.	Palito imerso na suspensão
T6 - Ferimento com esponja de aço.	Deposição de 50 μ L

A obtenção e preparação das mudas e da suspensão do inóculo foi igual à metodologia utilizada para a inoculação em folhas. O preparo dos palitos que foram utilizados no experimento foi de acordo com a metodologia proposta por Cota e Costa (2010) onde os palitos foram previamente fervidos por duas vezes em água deionizada para a eliminação de quaisquer resíduos, sendo feita a troca de água nas duas fervuras. Os palitos foram secos em estufa a 60° C e, posteriormente, acondicionados em beakers para autoclavagem. Após a autoclavagem, parte dos palitos foram colocados em placas de petri com MEA a 2% ,onde foi colocado o fungo para crescer junto a eles e parte dos palitos foram guardados para serem imersos nas diferentes concentrações das suspensões preparadas. Para a preparação dos discos de micélio foram utilizadas placas com MEA e placas cobertas com o fungo cortados em discos de tamanho de 5 mm. As mudas foram inoculadas e mantidas nas mesmas condições do experimento de inoculação em folhas. As avaliações foram feitas em intervalos de 5 dias, observando-se individualmente os sintomas da doença nos ramos das plantas.

As variáveis significativas no teste F da análise de variância foram submetidas ao teste de Tukey e Scott-Knot a 5% de probabilidade, para determinar qual foi o método de inoculação e a concentração de inóculo mais efetivo. A partir dos resultados obtidos da severidade final da doença para cada concentração de inóculo, foi realizada a análise de regressão e a plotagem das curvas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SAS.

Ao término dos dois experimentos, as lesões dos tratamentos que apresentaram sintomas foram observadas na lupa e foi feito o isolamento.

Folhas e ramos do melhor tratamento foram processados para visualização em microscópio eletrônico de varredura. Os cortes foram fixados em solução Karnovsky modificada (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M), por um período de

24 horas. Após esse período, foram retirados do fixador e transferidos para glicerol 30% por 30 minutos. Em seguida, imersos em recipiente plástico contendo nitrogênio líquido e cortados com bisturi sobre uma placa de metal, imersa em um recipiente plástico, também contendo nitrogênio líquido. Seccionados transversalmente, as amostras (aproximadamente 10 seções) foram colocadas em microtubos contendo água destilada. Foram transferidos os dez fragmentos de cada tratamento para uma solução-tampão de cacodilato (0,05M) e lavados por três vezes durante 10 minutos. Em seguida, foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavados em água destilada por três vezes e desidratados em soluções com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Posteriormente, os espécimes foram levados à secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido em aparelho Balzers CPD 030; em seguida, montados em suportes de alumínio (stubs) e cobertos com ouro (evaporador Balzers SCD 050) para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens foram geradas e registradas digitalmente, havendo diversas imagens para cada amostra nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de inoculação em folhas que utilizou a esponja de aço seguido da deposição da suspensão no local (T3) foi o método mais eficiente, proporcionando a maior média da porcentagem da área lesionada, seguido pelo tratamento que utilizou carborundum para o ferimento da folha (T2). (FIGURA 1 e 2). Ferimentos em folhas de cafeeiro feitos com esponja de aço não haviam sido feitos anteriormente para inoculação, já ferimentos com carbeto de silício foram feitos por Nechet e Abreu (2002).

Os demais tratamentos não diferiram entre si estaticamente, sendo que no tratamento sem ferimento (T6) e no tratamento que utilizou o vento do ventilador como meio de ferimento (T4) não apresentaram área foliar lesionada.

No T6, o fungo não foi capaz de colonizar a planta, resultado semelhante foi obtido por Nechet e Abreu (2002) que, ao inocular folhas de mudas de cafeeiro sem realizar ferimentos não obtiveram sintomas. O fato de a inoculação, utilizando o método T4, não ter resultado positivo pode ser explicado pela velocidade do vento que não foi capaz de ferir a planta ao ponto do *C. gloeosporioides* poder colonizá-la, pois Paradela Filho et al. (2001) relataram que cafeeiros expostos ao vento apresentam mais ferimentos e maior colonização por *Colletotrichum* spp. O tratamento que utilizou o conjunto de alfinetes entomológicos para realizar a inoculação (T1), não diferiu estatisticamente dos tratamentos T4 e T6 que não apresentaram sintomas, porém houve uma área foliar lesionada considerável quando foram utilizadas as maiores doses de suspensão (FIGURA 2). O tratamento T1 não foi o melhor método de inoculação, porém alguns autores relataram o uso desse método em seus trabalhos (OGOSHI, 2011; SANTOS NETO, 2012).

O tratamento que utilizou a injeção da suspensão (T5) não diferiu estatisticamente dos tratamentos T4 e T6, manifestando pequenas reações nas

concentrações mais elevadas. Relatos de sucesso na injeção de inóculo é comumente encontrado quando utilizando bactérias fitopatogênicas (ARAÚJO; MARIANO; MICHEREFF, 2005) quanto a fungos e, especialmente, em relação ao *C. gloeosporioides*, o ambiente interno da folha pode ser não favorável para a germinação dos conídios.

A manifestação do sintoma aumentou linearmente com o aumento da concentração da suspensão, fato semelhante foi observado por Moraes et al. (2006) que, ao utilizarem diferentes doses da suspensão de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro obtiveram aumento linear da severidade da antracnose do feijoeiro (FIGURA 3).

A concentração da suspensão de 4×10^6 conídios/mL, dentro de um mesmo método de inoculação, foi a concentração mais elevada que foi utilizada e também a que mais lesionou o tecido.

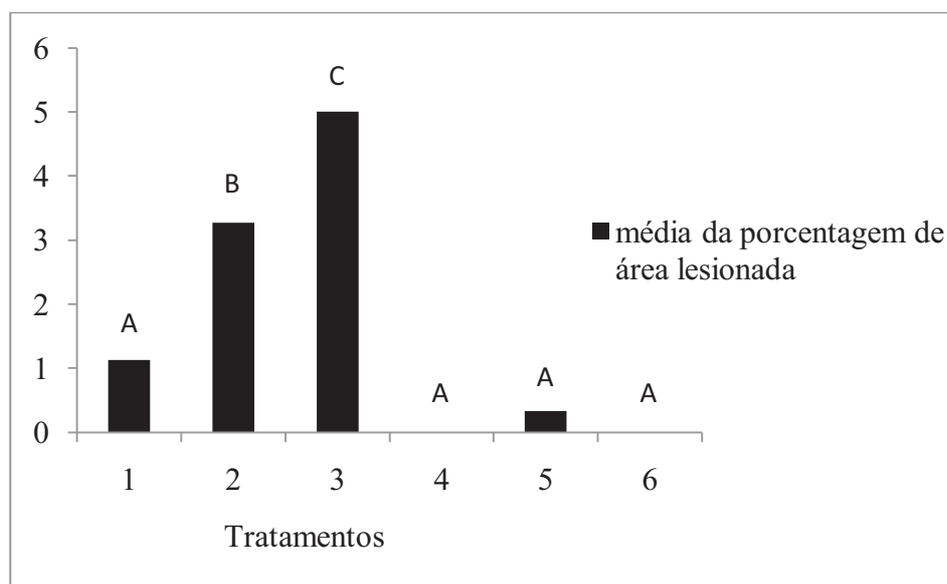


Figura 1 Média da porcentagem de área da folha lesionada em cada tratamento. Tratamento (1-6) 1 - ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes 2 - ferimento na página abaxial da folha com carbeto de silício em pó 3 - ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço 4 - ferimento causado pelo vento do ventilador a 5,8 km/h 1, 2, 3 e 4 deposição da suspensão 6 – deposição da suspensão sem ferimento e 5 – injeção da suspensão de inoculo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente a 5% no teste Scott-Knot

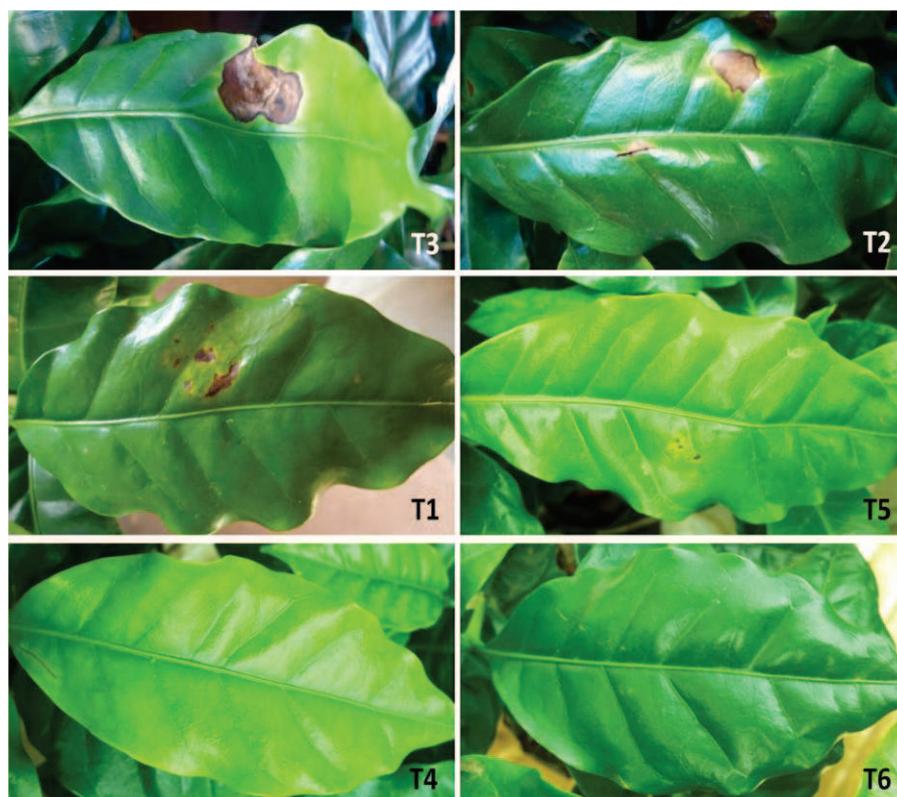


Figura 2 Folhas de mudas de café inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* com diferentes métodos de inoculação. T1 - ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes T2 - ferimento na página abaxial da folha com carbeto de silício T3 - ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço T4 - ferimento causado por ventilação forçada. Nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 foi depositada a suspensão de inóculo. T6 – deposição da suspensão sem ferimento e T5 – injeção da suspensão de inóculo

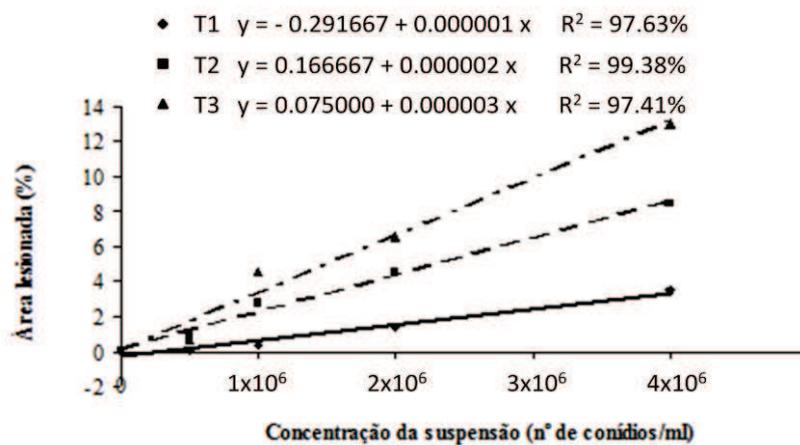


Figura 3 Curvas de regressão da porcentagem de área lesionada de acordo com a metodologia e a concentração de suspensão utilizada. 1 = tratamento 1 - ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes, 2 = tratamento 2 - ferimento na página abaxial da folha com carbeto de silício em pó, 3 = tratamento 3 - ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço. 1,2 e 3 deposição da suspensão de inóculo

Tabela 3 Área foliar lesionada em cada concentração de suspensão dentro de cada tratamento

Tratamento	Concentração da suspensão de inoculo (conídios/mL)				
	0	5X10 ⁵	1X10 ⁶	2X10 ⁶	4X10 ⁶
T1	0,00 Aa	0,00 Aa	0,67 Ba	1,33 Ba	3,67 Ca
T2	0,00 Aa	1,00 Bb	2,67 Cb	4,33 Cb	8,33 Db
T3	0,00 Aa	0,67 Bb	4,67 Dc	6,67 Dc	13,00 Ec
T4	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ad	0,00 Ad	0,00 Ad
T5	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ad	0,67 Ba	1,00 Be
T6	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ad	0,00 Ad	0,00 Ad

T* tratamentos. T1 - ferimento na página abaxial da folha por um conjunto de dez alfinetes entomológicos equidistantes T2 - ferimento na página abaxial da folha com carbeto de silício T3 - ferimento na página abaxial da folha com esponja de aço T4 - ferimento causado por ventilação forçada. Nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 foi depositada a suspensão de inóculo. T6 – deposição da suspensão sem ferimento e T5 – injeção da suspensão de inóculo. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si estatisticamente a 5% no teste Tukey.

A colonização das folhas foi comprovada quando foi feito o isolamento das partes sintomáticas e obtido o fungo *C. gloeosporioides* em todos os tecidos onde foi inoculado o fungo, exceto naqueles onde a concentração de suspensão não foi capaz de causar doença.

No experimento de inoculação em caule, somente o tratamento que utilizou a inserção de um palito coberto por micélio no caule (T4) e o tratamento que utilizou uma esponja de aço para fazer o ferimento com posterior deposição da suspensão de inoculo (T6), foram os que apresentaram área foliar lesionada após a inoculação (FIGURA 4).

Resultado semelhante foi obtido por Costa e Cota (2010) que, ao inocular plantas de milho com *Colletotrichum graminicola* crescido sobre os palitos no colmo do milho, obteve a reação de doença.

No tratamento T6, somente a concentração de inoculo de 4×10^6 conídios/mL foi capaz de causar sintomas quando inoculado em caule, sendo que as demais concentrações não diferiram da testemunha quanto aos sintomas.



Figura 4 Sintoma de necrose no caule inoculado com *Colletotrichum gloeosporioides*. A – Inserção de palito de dente no caule sem a presença do micélio do fungo, B – Inserção de palito de dente no caule recobertos com o micélio do fungo, C – Ferimento do caule com esponja de aço e deposição de água destilada e esterilizada, B – Ferimento do caule com esponja de aço e deposição da suspensão de inoculo na concentração de 4×10^6 conídios/mL

Para comprovar a presença do *C. gloeosporioides* na colonização dos tecidos que apresentaram sintomas, foi feito o isolamento de todos os tecidos do caule e foi comprovada a presença do fungo somente no T4 onde os palitos

foram acondicionados sobre a colônia do fungo e no T6 na concentração de 4×10^6 .

Para a visualização histopatológica da colonização do *C. gloeosporioides* em folha e em caule, foram escolhidos folhas do T3 na concentração de suspensão de 4×10^6 conídios/mL do experimento de inoculação em folhas e foram escolhidos caules do T4 do experimento de inoculação em caules.

Foi possível observar as hifas do *C. gloeosporioides* no processo de colonização dos vasos do xilema e floema do caule (FIGURA 5). Essa colonização dos vasos condutores foi observada por Pereira et al. (2009) que, ao estudarem caules de plantas com mancha manteigosa, observaram uma intensa colonização por *C. gloeosporioides*.

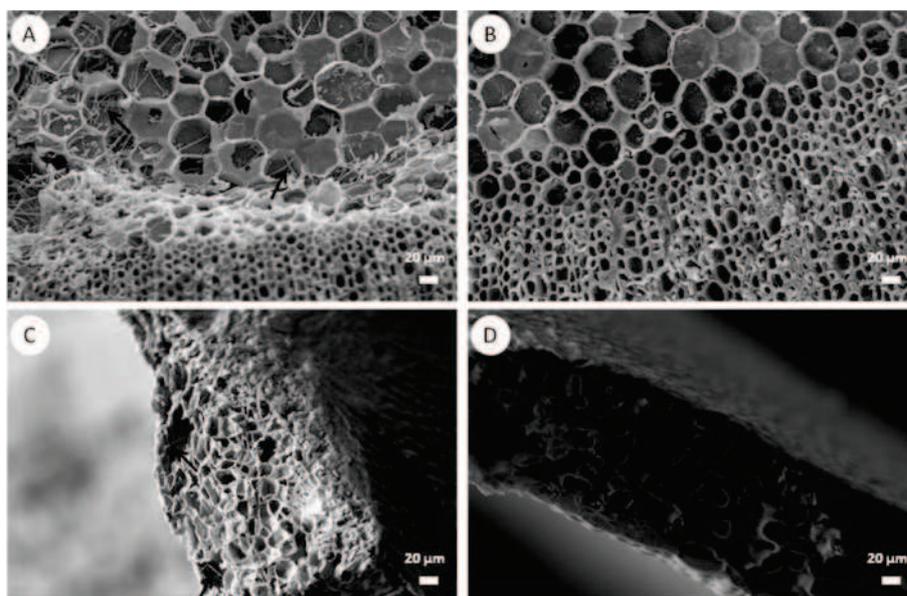


Figura 5 Eletromicrografia de varredura de ramos e folhas de cafeeiro inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides*. A: Ramo ortotrópico de mudas de cafeeiro com colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* B: Caule de mudas de cafeeiro sadia C: Mesofilo da folha de cafeeiro colonizada com *Colletotrichum gloeosporioides* D: Mesofilo de folhas de cafeeiro sadia

A colonização do *C. gloeosporioides* em folha também foi observada por Ferreira et al. (2009) que, ao estudar o patossistema, observou intensa colonização dos tecidos foliares.

4 CONCLUSÃO

O melhor método de inoculação em folha foi o que utilizou esponja de aço para ferir a página abaxial das folhas, seguido pela deposição da suspensão de inoculo.

A melhor concentração de suspensão utilizada foi a de 4×10^6 conídios/mL.

O melhor método de inoculação em caule foi o que utilizou a inserção de colônia de *C. gloeosporioides* crescida em palitos de dente esterilizados.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. V.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Métodos de inoculação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 31, n. 1, p. 69-73, mar. 2005.
- COTA, L. V.; COSTA, R. V. **Métodos de Inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2010. 7 p. (Circular Técnica, 137).
- 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. 285, ago. 1993. Suplemento.
- FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. A. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.
- FERREIRA, J. B. et al. Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 4, p. 273-281, 2009.
- FERREIRA, J. B. et al. 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. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.
- MORAES, S. R. et al. Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2006.
- MOUEN, B. J. A. et al. Spatio-temporal dynamics of arabica coffee berry disease due to *Colletotrichum kahawae* on a plot scale. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 10, p. 1229-1236, Oct. 2007.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

OGOSHI, C. **Fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de plantas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

OROZCO, E. F. M. **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, 2003.

PARADELA-FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: IAC, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*: cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, 2009.

SANTOS NETO, H. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados da mancha manteigosa**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CAPITULO 4 Escala diagramática para mancha manteigosa em folhas de cafeeiro

RESUMO

A mancha manteigosa é uma doença transmitida por sementes. Esta característica da doença revela que os estudos de severidade podem trazer mais respostas do que estudos de incidência. Devido a inexistência de uma padronização para quantificação visual da severidade da mancha manteigosa, objetivou-se, neste trabalho, construir e validar uma escala diagramática para avaliação da severidade da mancha manteigosa em cafeeiro. Foram coletadas folhas em campo com diferentes intensidades de sintomas da doença, e determinada eletronicamente a severidade real. Com base na distribuição de frequência dos valores de severidade e, de acordo com a lei de estímulo visual de Weber-Fechner, foram definidos os limites máximo, mínimo e os níveis intermediários da escala. A validação foi realizada por oito avaliadores que estimaram a severidade em 50 folhas com diferentes intensidades de sintomas. Foi realizada uma avaliação sem o auxílio da escala diagramática e duas avaliações com a utilização da escala, em intervalos de sete dias. Foram avaliadas a acurácia, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade das estimativas. A escala desenvolvida apresenta sete níveis: 0 (0%), 1 (0,1-3%), 2 (3,1-6%), 3 (6,1-12%), 4 (12,1-25%), 5 (25,1-50%), e 6 ($\geq 50,1\%$). Utilizando a escala proposta, os avaliadores apresentaram melhores níveis de acurácia, precisão, reprodutibilidade e repetibilidade nas estimativas, quando comparados aos avaliadores que não utilizaram a escala diagramática. A escala diagramática foi adequada para auxiliar na estimativa visual da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro.

Palavras-chave: *Coffea arábica*. *Colletotrichum gloeosporioides*. Patometria.

ABSTRACT

The blister spot is a disease transmitted by seeds. This characteristic shows that severity studies can provide more responses than incidence studies. Due to the lack of standardized visual severity quantification of the blister spot, the objective of this work was to construct and validate a diagrammatic scale for assessing the severity of blister spot in coffee. Leaves were collected in the field with different symptom intensities, and the actual severity was electronically determined. Based on the frequency distribution of the severity values and according to the Weber- Fechner visual stimulus law, the minimum, intermediate and maximum limits of the scale were defined. The validation was performed by eight evaluators who estimated the severity on 50 leaves with different symptom intensities. One evaluation was performed without the aid of the diagrammatic scale and two using the scale at seven day intervals. The accuracy, precision, repeatability and reproducibility estimates were evaluated. The scale developed presents seven levels: 0 (0%), 1 (0.1-3%), 2 (3.1-6%) 3 (6.1-12%) 4 (12.1- 25%) 5 (25.1-50%) and 6 ($\geq 50.1\%$). Using the proposed scale, the evaluators showed better accuracy, precision, reproducibility and repeatability estimates when compared to those not using the scale. The diagrammatic scale was appropriate to assist in the visual estimation of the severity of blister spot in coffee leaves.

Keywords: *Coffea arabica*. *Colletotrichum gloeosporioides*. Pathometry.

1 INTRODUÇÃO

A mancha manteigosa é uma doença do cafeeiro cujo agente etiológico é o *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ (OROZCO, 2003). Os sintomas de mancha manteigosa são manchas de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro, em estádios avançados, as manchas chegam a coalescer, determinando queda prematura das folhas (BITANCOURT, 1958; MANSK; MATIELLO, 1977).

O principal meio de disseminação da doença é via semente, não sendo transmitido planta a planta no campo (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009), assim, uma avaliação da incidência da doença no campo não obteria boas informações visto que as plantas consideradas sadias dificilmente se tornarão doentes.

Ferreira et al. (2009) utilizaram a contagem do número de lesões na folha para avaliar o progresso da doença quando tratadas com fungicidas. A contagem do número de lesões não é precisa para mensurar a severidade da doença pelo fato de que duas lesões menores podem ocupar menor área na folha que uma lesão grande.

Baseado nesses princípios, um estudo da epidemiologia e controle da doença necessitaria de uma mensuração da severidade na planta para assim sabermos, ao longo do tempo, o progresso da doença na mesma planta (BELASQUE JÚNIOR et al., 2005).

Uma maneira fácil de aumentar a precisão e acurácia ao obter a severidade da doença em uma planta é com o auxílio de uma escala diagramática. Na elaboração de escalas diagramáticas devem ser considerados importantes aspectos como conferir se o limite superior da escala corresponde à intensidade máxima de doença observada, determinar se a intensidade real de doença e sua representação na escala são precisas e se as subdivisões da escala

respeitam as limitações da acuidade visual humana, definidas pela lei de estímulo-resposta de Weber-Fechner. Conforme essa lei, a acuidade visual é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo (HORSFALL; BARRAT, 1945; HORSFALL; COWLING, 1978). Além disso, para verificar a qualidade das estimativas propiciadas pela escala diagramática, os níveis de acurácia, precisão e reprodutibilidade devem ser analisados (CAMPBELL; MADDEN, 1990; KRANZ, 1988; NUTTER JUNIOR et al., 1993; NUTTER JUNIOR; SCHULTZ, 1995).

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de construir e validar uma escala diagramática para avaliação da severidade da mancha manteigosa em cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para elaborar a escala diagramática, foram coletadas 118 folhas de cafeeiros com diferentes níveis de severidade da doença. Essas folhas foram provenientes de cafeeiros naturalmente infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* em lavouras no campo, de diversas cultivares. Para confirmar o agente etiológico da doença, foi realizado o isolamento em extrato de malte MEA a 2%. As folhas com lesões foram escaneadas, usando uma impressora multifuncional. Com o auxílio do software Assess[®] (American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA), foram determinadas a severidade real da doença (porcentagem de área foliar lesionada). Foram consideradas como lesão foliar, as manchas de coloração verde pálida, bem como as pontuações necróticas no interior dessas manchas.

Considerando os níveis mínimo e máximo de severidade observados, foi verificada a distribuição de frequência dos dados, ou seja, qual a quantidade de folhas por intervalo de porcentagem de área foliar lesionada, para determinar quais os intervalos de maior concentração. Com base na lei da acuidade visual de Weber-Fechner (HORSFALL; BARRAT, 1945; NUTTER JUNIOR; SCHULTZ, 1995) e nos intervalos de classe de maior frequência, foi elaborada a escala diagramática. Depois de estabelecidos os intervalos de severidade a serem representados, e considerando a forma e distribuição das lesões, imagens reais de folhas com lesões de mancha manteigosa foram utilizadas para construir a escala.

No teste de validação da escala diagramática, foram utilizadas 50 imagens de folhas de cafeeiro com sintomas da doença, representando todos os níveis da escala. Essas imagens foram inseridas aleatoriamente em slides individuais para visualização no Microsoft[®] PowerPoint[®] 2010 e apresentadas a

oito avaliadores sem experiência na quantificação de doenças de plantas, em três avaliações.

Na primeira avaliação, os avaliadores atribuíram notas às folhas apresentadas, sem o auxílio da escala. Após sete dias, os mesmos avaliadores realizaram a segunda avaliação, utilizando a escala diagramática pela primeira vez. Para avaliar a repetibilidade das estimativas com a escala diagramática, sete dias após a primeira avaliação, nova sequência das mesmas folhas foi organizada e uma segunda estimativa visual com auxílio da escala efetuada por esses mesmos avaliadores.

A acurácia e a precisão de cada avaliador foram determinadas por meio de regressão linear simples, com a severidade real obtida eletronicamente como variável independente e a severidade estimada pelo avaliador como variável dependente.

A acurácia das estimativas de cada avaliador e do conjunto de avaliadores foi determinada pelo teste *t* aplicado ao intercepto da regressão linear (β_0), para verificar a hipótese $H_0: \beta_0 = 0$, e ao coeficiente angular da reta (β_1), para testar a hipótese $H_0: \beta_1 = 1$, a nível 5% de probabilidade ($p=0,05$). Valores de intercepto significativamente diferentes de 0 (zero) indicam superestimativa (>0) ou subestimativa (<0) da severidade real a níveis baixos de intensidade da doença, enquanto valores de coeficiente angular da reta que desviam significativamente de 1 (um) indicam superestimativa (>1) ou subestimativa (<1) sistemática da severidade real em todas as intensidades da doença (NUTTER JUNIOR; SCHULTZ, 1995).

A precisão das estimativas foi determinada por coeficiente de determinação da regressão (R^2), pela variância dos erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) e pela repetibilidade das estimativas, determinada pela análise de regressão da segunda avaliação em relação à

primeira da mesma unidade amostral, ou seja, o mesmo conjunto de folhas apresentado aleatoriamente (NUTTER JUNIOR et al., 1993).

A reprodutibilidade das estimativas foi avaliada analisando-se valores de R^2 obtidos de regressões lineares entre as severidades estimadas da mesma unidade amostral por diferentes avaliadores combinados em pares (CAMPBELL; MADDEN, 1990; KRANZ, 1988; NUTTER JUNIOR; SCHULTZ, 1995).

Os dados foram tabulados utilizando-se o software Microsoft® Excel® 2010, e as análises estatísticas realizadas no programa SAS® v 9.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor máximo e mínimo de severidade da mancha manteigosa encontrados nas folhas de cafeeiro analisadas foram 50,09% e 0,98%, respectivamente. Os limites inferior e superior de severidade da doença representados na escala foram 0 (zero) e 50,09%, respectivamente (Tabela 1). Imagens de folhas com valor de severidade maior que 50,09% não foram incluídas na escala diagramática, porque não foram encontradas folhas com severidade da doença acima desse valor (FIGURA 1).

Tabela 1 Distribuição de frequência, a intervalos unitários, dos valores de severidade (%) da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro

Intervalo (severidade %)	Frequência	Percentual (%)	Frequência acumulada	Percentual acumulado (%)
0-1	9	7,5	9	7,5
1-2	3	2,49	12	9,99
2-3	2	1,66	14	11,65
3-4	6	4,98	20	16,63
4-5	7	5,81	27	22,44
5-6	2	1,66	29	24,1
6-7	7	5,81	36	29,91
7-8	5	4,15	41	34,06
8-9	3	2,49	44	36,55
9-10	7	5,81	51	42,36
10-11	4	3,32	55	45,68
11-12	5	4,15	60	49,83
12-13	4	3,32	64	53,15
13-14	8	6,64	72	59,79
14-15	4	3,32	76	63,11
15-16	11	9,13	87	72,24
16-17	6	4,98	93	77,22

“Tabela 1, conclusão”

Intervalo (severidade %)	Frequência	Percentual (%)	Frequência acumulada	Percentual acumulado (%)
17-18	0	0	93	77,22
18-19	4	3,32	97	80,54
19-20	4	3,32	101	83,86
20-21	4	3,32	105	87,18
21-22	2	1,66	107	88,84
22-23	4	3,32	111	92,53
23-24	1	0,83	112	93,36
>24	8	6,64	120	100

Nota 0 (0,0 %)	 0,0 %	 0,0 %	 0,0 %
Nota 1 (0,1 - 3,0 %)	 0,5 %	 1,1 %	 2,5 %
Nota 2 (3,1 - 6,0 %)	 3,4 %	 4,1 %	 5,5 %
Nota 3 (6,1 - 12,0 %)	 6,3 %	 8,4 %	 11,6 %
Nota 4 (12,1 - 24,0 %)	 13,1 %	 18,2 %	 23,0 %
Nota 5 (24,1 - 50,0 %)	 25,8 %	 34,3 %	 46,9 %
Nota 6 (≥ 50,0 %)		 50,1 %	

Figura 1 Escala diagramática de folhas de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa

A escala foi elaborada considerando os intervalos percentuais 0, 3-6, 6-12, 12-25 e 25-50% de severidade, obedecendo a lei de “Weber-Fechner”. Oliveira et al. (2001) também construíram uma escala diagramática obedecendo a mesma lei para mancha de olho pardo (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro, porém não utilizaram a classe 25-50%.

A avaliação com a escala proporcionou aos avaliadores uma maior precisão e acurácia, em relação à avaliação, sem utilizar a escala (Tabela 1). Custodio et al. (2011) também obtiveram maior precisão e curácia nas avaliações que utilizaram a escala em relação as avaliações onde não a utilizaram.

Todos os avaliadores super estimaram a severidade da doença quando não utilizaram a escala. Entre os avaliadores, pelo menos uma das hipóteses $\beta_0 = 0$ e $\beta_1 = 1$, da equação de regressão linear entre severidade real e estimada, foi rejeitada, enquanto para os avaliadores A e E as duas hipóteses foram rejeitadas (Tabela 1), indicando super estimativa da severidade da doença. Em outros estudos também foi observado que as hipóteses $\beta_0 = 0$ e $\beta_1 = 1$ foram mais aceitas nas avaliações com a escala (MENGE et al., 2013; SANTOS et al., 2010).

Com o uso da escala diagramática, os avaliadores foram mais acurados na avaliação da severidade da doença (Tabela 1). Na primeira avaliação utilizando a escala, 62% dos avaliadores apresentaram intercepto e coeficiente angular da reta de regressão linear iguais a 0 (zero) e 1 (um), respectivamente. Já, na segunda avaliação, nenhum avaliador teve o coeficiente angular diferente de 0 e 1.

Segundo Vale et al. (2004), ao realizarem várias avaliações, os avaliadores precisos seguem um padrão de desvio mínimo entre o valor estimado e a severidade real. Todos os avaliadores apresentaram uma baixa precisão sem a utilização da escala. No entanto, com a utilização da escala, a

precisão teve um aumento na primeira avaliação e na segunda avaliação com a escala, apresentando um R^2 maior em relação à avaliação inicial sem a escala, ou seja, foram mais precisos (Tabela 2).

Tabela 2 Intercepto (β_0), coeficiente angular da reta (β_1) e coeficiente de determinação (R^2) de equações de regressão linear relacionando estimativas visuais da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro, efetuadas por avaliadores sem e com o auxílio da escala diagramática, à severidade real determinada eletronicamente

Avaliadores	Sem a escala			Primeira avaliação com a escala			Segunda avaliação com a escala		
	β_0	β_1	R^{2**}	β_0	β_1	R^{2**}	β_0	β_1	R^{2**}
A	5,59*	1,57*	0,74	1,92ns	0,79ns	0,79	1,01ns	0,94ns	0,88
B	6,96ns	2,57*	0,64	2,1ns	0,88ns	0,73	1,44ns	0,97ns	0,76
C	8,17*	0,43ns	0,25	0,76ns	0,97ns	0,79	0,3ns	1,02ns	0,85
D	0,72ns	1,73*	0,66	0,3ns	1,08ns	0,86	0,14ns	1,06ns	0,86
E	7,99*	1,56*	0,62	0,84ns	0,98ns	0,82	0,35ns	1ns	0,83
F	1,84ns	1,56*	0,69	0,1ns	0,98ns	0,80	0,4ns	0,99ns	0,83
G	26,13*	0,08ns	0,00	0,35ns	1,03ns	0,83	0,21ns	1,02ns	0,84
H	36,83*	0ns	0,00	0,34ns	1ns	0,81	0,11ns	1,02ns	0,83

(*) e (ns) representam situações em que a hipótese nula ($\beta_0 = 0$ ou $\beta_1 = 1$) foi, respectivamente, rejeitada e não rejeitada pelo teste t ($P = 0,05$); ** representa situações significativas com probabilidades de 5% para o teste t ($P < 0,05$).

Apesar disso, houve redução nos erros absolutos quando foi utilizada a escala, ocorrendo menor amplitude dos valores (Figura 2). De fato, os valores mínimo e máximo observados para os resíduos de todos os avaliadores sem utilizar a escala foram, respectivamente, -36,09 e 93,98, enquanto com o uso da escala, na média entre as duas avaliações esse intervalo foi reduzido para -39,76 e 23,85.



Figura 2 Distribuição dos resíduos (severidade estimada – severidade real) das estimativas da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro estimada sem e com o auxílio da escala diagramática em duas avaliações

Houve redução dos erros absolutos com a utilização da escala. Na avaliação sem a utilização da escala, 52 % dos resíduos estavam fora do intervalo entre -10 e $+10$ intervalo este aceitável, segundo critérios adotados por programas de treinamento na quantificação de doenças, como o Disease.Pro (NUTTER JUNIOR; WORAWITLIKIT, 1989). Entre as duas avaliações, utilizando a escala, em média 98% dos erros absolutos estavam dentro desse intervalo. Entretanto, a presença de algum nível de erro absoluto nas mensurações, utilizando a escala diagramática na quantificação da severidade da doença, pode ser compensada pela padronização das avaliações (MICHEREFF; ANDRADE; NORONHA, 2006).

Os avaliadores apresentaram boa repetibilidade na estimativa da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro com o uso da escala proposta. O aumento na precisão foi confirmado pela repetibilidade das estimativas. A quantidade média de variação na primeira avaliação explicada em comparação com a segunda avaliação foi de 91 % e o valor do coeficiente angular da reta foi significativamente igual, indicando precisão das estimativas em 100 % dos avaliadores (Tabela 3). Como precisão refere-se à repetibilidade associada com uma estimativa (VALE et al., 2004), a escala diagramática para a

mancha manteigosa do cafeeiro permitiu a repetibilidade da mensuração da doença.

Tabela 3 Intercepto (β_0), coeficiente angular da reta (β_1) e coeficiente de determinação (R^2) de equações de regressão linear relacionando a segunda à primeira estimativa da severidade da mancha manteigosa em folhas de cafeeiro, efetuada por um mesmo avaliador com o auxílio da escala diagramática

Avaliadores	Coeficientes		
	β_0	β_1	R^{2**}
A	2,25ns	0,85ns	0,67
B	0,21ns	1,01ns	0,88
C	0,37ns	0,98ns	0,92
D	-0,26ns	0,96ns	0,97
E	-0,17ns	0,99ns	0,96
F	0,70ns	0,99ns	0,96
G	-0,01ns	0,98ns	0,98
H	0,04ns	0,99ns	0,97

* e ns representam situações que a hipótese nula ($\beta_0 = 0$ ou $\beta_1 = 1$) foi, respectivamente, rejeitada e não rejeitada pelo teste t ($P = 0,05$); ** representa situações significativas com probabilidades de 5% para o teste t ($P < 0,05$).

Outro parâmetro para avaliar a eficiência da escala diagramática é a reprodutibilidade. De acordo com Nutter e Schultz (1995), em uma mesma unidade experimental, diferentes avaliadores, utilizando uma mesma escala, devem estimar os mesmos valores de severidade.

A semelhança entre essas avaliações é verificada por regressões lineares entre as severidades estimadas por avaliadores, combinados aos pares. Sem a utilização da escala diagramática, o valor de R^2 das regressões das estimativas entre os pares de avaliadores variou de 0 a 0,76, com média de 0,31 (Tabela 4).

Com a utilização da escala diagramática, os valores de R^2 variaram de 0,79 a 0,94 e 0,82 a 0,98%, respectivamente, na primeira e segunda avaliação, sendo $\geq 0,75$ em 87% das combinações de avaliadores. Resultado semelhante foi obtido por outros autores em validações de escalas diagramáticas de outros patossistemas (GOMES; MICHEREFF; MARIANO, 2004; MARTINS et al., 2004).

4 CONCLUSÃO

Foi possível construir uma escala diagramática para avaliar a severidade da mancha manteigosa em folhas de café.

A escala diagramática desenvolvida para auxiliar a quantificar a severidade da mancha manteigosa em folhas de café proporciona melhores níveis de acurácia, precisão e reprodutibilidade das avaliações.

REFERÊNCIAS

- BELASQUE JÚNIOR, J. B. et al. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 387-393, 2005.
- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.
- CUSTÓDIO, A. A. P. et al. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1067-1076, nov./dez. 2011.
- FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. A. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.
- FERREIRA, J. B. et al. Efeito de fungicidas e influência de fatores climáticos sobre a mancha manteigosa no cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 417-424, mar./abr. 2009b.
- GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 1, p. 38-42, mar. 2004.
- HORSFALL, J. C.; BARRAT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 35, p. 665-667, 1945.
- HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. Pathometry: the measurement of plant disease. In: _____. **Plant disease: an advanced treatise: how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. v. 2, p. 119-136.
- KRANZ, J. Measuring plant disease. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Ed.). **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer Verlag, 1988. p. 35-50.

- MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “Conilon” (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.
- MARTINS, M. C. et al. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 179-184, abr. 2004.
- MENGE, D. et al. Development and validation of a diagrammatic scale for estimation of cashew blight for epidemiological studies. **International Journal of Advanced Research**, London, v. 1, n. 4, p. 26-38, June 2013.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; NORONHA, M. A. Elaboration and validation of diagrammatic key to evaluate leaf smut severity in cowpea. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 1, p. 51-56, mar. 2006.
- NUTTER JUNIOR, F. W. et al. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 8, p. 806-812, Mar. 1993.
- NUTTER JUNIOR, F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 17, n. 1, p. 174-184, 1995.
- NUTTER JUNIOR, F. W.; WORAWITLIKIT, O. Disease. Pro: a computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 1135, 1989.
- OLIVEIRA, C. A. Diagrammatic scale to evaluate severity of brown eye spot in coffee trees leaves. In: SIMPÓSIO DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória: EMBRAPA Café, 2001. p. 80.
- OROZCO, E. F. M. **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, 2003.
- SANTOS, W. F. et al. Elaboration and validation of a diagrammatic scale for epidemiological studies of cercospora leaf spot of castor bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 6, p. 403-408, June 2010.

VALE, F. X. R. et al. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro.
In: _____. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. São
Paulo: Perfil, 2004. p. 90-123.

**CAPITULO 5 Distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos de folhas de
cafeeiro em torno da lesão de mancha manteigosa e
cercosporiose utilizando-se a microanálise de raios-x**

RESUMO

O conhecimento sobre a distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos vegetais pode favorecer o entendimento dos mecanismos de ataque dos patógenos às plantas e os mecanismos de defesa das plantas contra a infecção de fitopatógenos e, dessa forma, auxiliar na elaboração de estratégias de manejo. Nesse contexto, no presente estudo, objetivou-se verificar a existência de diferenças na distribuição dos nutrientes minerais nos tecidos de folhas de cafeeiro *Coffea arabica* L. em torno da lesão de mancha manteigosa *Colletotrichum gloeosporioides* e cercosporiose *Cercospora coffeicola*, utilizando-se a microanálise de raios-X (MAX). Fragmentos de tecido de folhas de cafeeiro contendo respectivamente tecido sintomático e tecido assintomático foram desidratados em sílica gel, receberam cobertura de carbono e submetidos à microanálise de raios-X. Existe variação nos teores de K e Ca nos tecidos de folhas de cafeeiro com lesão de cercosporiose e variação de K nos tecidos com lesão de mancha manteigosa. Maior teor de K foi encontrado no tecido assintomático em torno da lesão, decrescendo em direção ao tecido sintomático. Maior teor de Ca foi encontrado no tecido necrótico, decrescendo em direção ao tecido assintomático, sendo essa variação apenas nas lesões de cercosporiose. Logo, a MAX, associada à nutrição mineral de plantas pode auxiliar no entendimento e manejo da mancha manteigosa e da cercosporiose do cafeeiro.

Palavras-chave: Cálcio. Microscopia eletrônica de varredura. Potássio.

ABSTRACT

Knowledge of mineral nutrient distribution in plant tissues may favor the understanding plant pathogen mechanisms and the plants' defense mechanisms against phytopathogen infection, thus aiding in the elaboration of management strategies. In this context, the present study aimed at verifying the existence of different mineral nutrient distribution in *Coffea arabica* L. leaf tissues surrounding the *Colletotrichum gloeosporioides* blister spot lesion and *Cercospora coffeicola* cercosporiose, using the X-ray microanalysis (XMA). There are variations in the contents of K and Ca in the coffee leaf tissues with cercosporiose lesions and of K in the tissues with blister spot lesions. Higher K content was found in asymptomatic tissue surrounding the lesion, decreasing toward the symptomatic tissue. Higher Ca content was found in the necrotic tissue, decreasing toward the asymptomatic tissue, varying only in cercosporiose lesions. Soon, the XMA, associated with plant mineral nutrition, can aid in understanding and managing coffee blister spot and cercosporiose.

Keywords: Calcium. Potassium. Scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

A mancha manteigosa é uma enfermidade do cafeeiro atribuída ao agente etiológico *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (LINS et al., 2008; POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010), que tem por sintomas, manchas de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro que, em estágios avançados, coalescem e determinam a queda prematura das folhas (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2009). Alguns trabalhos já foram feitos com a intenção de reproduzir os sintomas de mancha manteigosa, a partir da inoculação do *C. gloeosporioides* em plantas de cafeeiro, o que apenas foi observado em poucas plantas dentre as inoculadas (NECHET; ABREU, 2002).

Essa difícil manifestação de sintomas pode estar relacionada a algum fator ambiental que apresente um papel importante no favorecimento da doença e na manifestação dos sintomas (BITANCOURT, 1958). A cercosporiose ou mancha-de-olho-pardo é outra enfermidade do cafeeiro, sendo esta causada pelo patógeno *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. O aparecimento das lesões nas folhas leva a planta a uma desfolha, resultando em uma redução na produção (GARCIA JÚNIOR et al., 2003; POZZA et al., 2004).

Dentre os fatores ambientais relacionados ao estabelecimento de doenças, os nutrientes minerais apresentam uma devida importância por estarem envolvidos no metabolismo vegetal primário e secundário, podendo afetar positivamente ou negativamente a resistência das plantas aos patógenos (MARSCHNER, 1995). Em alguns patossistemas do cafeeiro como a cercosporiose, mancha de phoma e ferrugem, já foi observada a influência do desequilíbrio nutricional de nutrientes como N, K, Ca e Mg no progresso dessas doenças (LIMA et al., 2010; POZZA et al., 2001; SANTOS et al., 2008).

A microanálise de raios X em linha é uma técnica que permite identificar e quantificar elementos químicos ao longo de toda linha analisada (ALVES, 2005), podendo ser utilizada para analisar o tecido lesionado na faixa que compreende do interior da lesão até o tecido sadio e nos direcionar nos estudos da relação nutriente e patossistema.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar por meio da técnica de microanálise de raios x os níveis de elementos químicos na parte interna e externa de lesões de mancha manteigosa e cercosporiose em folhas de cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi desenvolvido nos Laboratórios de Epidemiologia de Doenças de Plantas e Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Folhas de cafeeiro com lesões de mancha manteigosa e cercosporiose foram coletadas no terceiro par de folhas de ramos plagiotrópicos em cafeeiros com quatro anos de idade, da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. A lavoura está localizada no setor de cafeicultura Departamento de Agricultura no município de Lavras – MG. Todas as lesões foram provenientes de infecção natural ocorrida em campo. Para a confirmação do agente etiológico, uma amostra foi retirada, desinfestada e isolada em Extarto de Malte a 2%. Para o isolamento do *Colletotrichum gloeosporioides*, foi utilizado o ramo da planta onde estava a folha doente e para *Cercospora coffeicola* foi isolado das lesões da folha.

Fragmentos do limbo foliar com 5 mm de comprimento foram coletados nas bordas das lesões, de forma a conter, respectivamente, áreas com tecido sadio e lesionado. Fragmentos de folhas com lesões de mancha manteigosa continham áreas com tecido sadio e halo de cor verde-pálida e folhas com lesões de cercosporiose continham tecido sadio e necrosado. Perfurações feitas com alfinete entomológico nos fragmentos de folhas foram utilizadas para delimitar as regiões do tecido (sadio e doente), durante as análises microscópicas. Foram preparadas 10 amostras, contendo fragmentos de folhas com lesão, assim como 10 amostras, contendo fragmentos de folhas sadias (assintomáticas).

Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise de raios X (MAX)

O preparo das amostras foi realizado segundo protocolo padrão do LME. Os fragmentos de folhas foram aderidos sobre suportes de alumínio “stubs” com o auxílio de fita adesiva de carbono dupla face e devidamente identificados. Esses espécimes foram mantidos em dessecador, contendo sílica gel por 24 h para desidratação. Posteriormente, foram levados ao aparelho ‘sputtering’ (MED 010, Balzer) e cobertos com camada de carbono. Posteriormente, as amostras foram observadas em MEV (Leo Evo 40 XVP), acoplado ao sistema de MAX: EDS (Bruker Link ESPIRIT).

Foram delimitados perfis sobre as amostras, representando áreas com tecido doente e tecido sadio. Nesses perfis, foi realizado mapeamento qualitativo tanto de macro quanto de micronutrientes e outros minerais constituintes do tecido das amostras. Também foi quantificada a distribuição dos elementos minerais ao longo de uma linha (100 pontos) traçada no perfil. As imagens foram geradas e capturadas digitalmente, nas condições de trabalho de 20Kv, distância de 8,5 mm, aumento de ± 80 vezes e Kcps variando entre 3 e 4.

Os dados da quantificação dos nutrientes minerais (%) por ponto foram tabulados, utilizando-se o software Microsoft® Excel® 2010. Os nutrientes que apresentaram variação na sua distribuição ao longo do perfil foram selecionados e preparados gráficos de distribuição desses elementos. As imagens foram diagramadas no Software Photopaint do pacote Corel Draw12 e os gráficos preparados utilizando-se o programa SigmaPlot versão 12.0.

detectado esses elementos pode ser decorrente da pequena quantidade desses elementos na folha e a capacidade da técnica determinar quantidades de até 1-2%, dos elementos presentes em volumes na amostra (ALVES, 2005).

Dentre os elementos detectados, somente o Cálcio e o Potássio diferiram em quantidade dentro e fora das lesões causadas pelos patógenos, sendo que para mancha manteigosa só houve diferença na quantidade de potássio (Tabela 1, Figura 2 e 3).

Tabela 1 Média da proporção dos elementos químicos cálcio e potássio no tecido sadio e doente de folhas de cafeeiro com mancha manteigosa, com cercosporiose e sadias

Folhas com mancha manteigosa		
Elemento químico	Área do tecido	Média Porcentagem dos elementos
K	Doente	5,64% A
K	Sadia	8,62% B
Ca	Doente	4,02% C
Ca	Sadia	4,5% C
Folhas com cercosporiose		
K	Doente	9,68% A
K	Sadia	34,62% B
Ca	Doente	32,00% C
Ca	Sadia	15,70% D
Folhas sadias		
K	Sadia	60,1% A
K	Sadia	60,7% A
Ca	Sadia	41,2% B
Ca	Sadia	39,3% B

Médias seguidas de mesma letra não diferenciam entre si no teste Scott-Knot a 5% de probabilidade

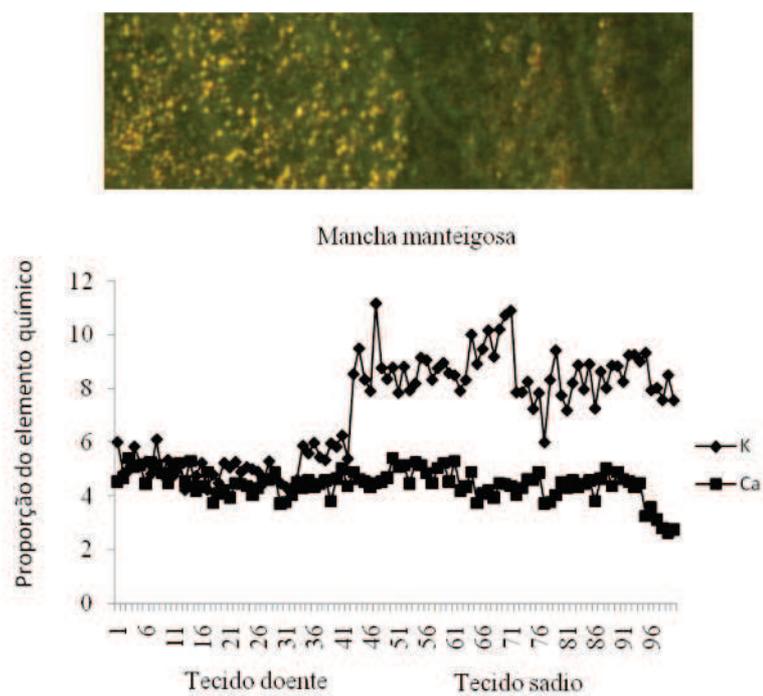


Figura 2 Foto na lupa da transição de um tecido doente para sadio, de uma lesão de mancha manteigosa em folha de cafeeiro e a representação gráfica da proporção da média dos elementos químicos Potássio e Cálcio presentes em dez amostras

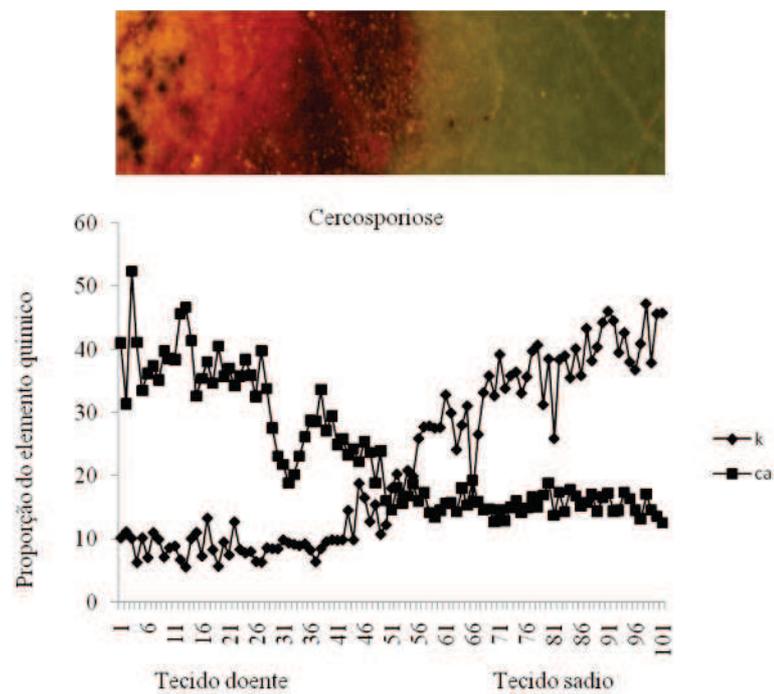


Figura 3 Foto na lupa da transição de um tecido doente para sadio, de uma lesão de cercosporiose em folha de cafeeiro e a representação gráfica da proporção da média dos elementos químicos Potássio e Cálcio presentes em dez amostras

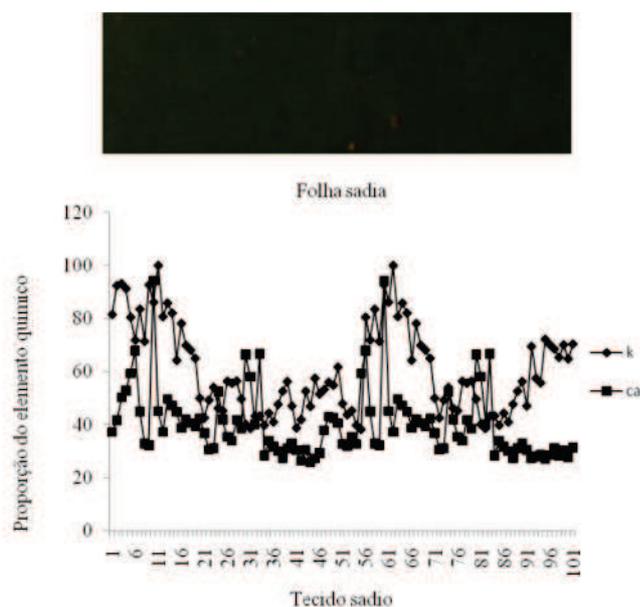


Figura 4 Foto na lupa de um tecido foliar sadio e a representação gráfica da proporção da média dos elementos químico Potássio e Cálcio presentes em dez amostras

A grande quantidade da presença de cátions Ca^{2+} no tecido foliar lesionado pode ser decorrente da função do cálcio na inibição drástica da ação de enzimas pectinolíticas produzidas (MARSCHNER, 1995). Dessa forma, a exigência das células desse tecido que está sendo infectado, atrairia uma maior quantidade de cálcio em relação ao tecido sadio presente na folha.

Outra explicação para essa alta quantidade de cálcio nos tecidos lesionados é o fato deste ser encontrado na lamela média e nos vacúolos em uma alta concentração (MARSCHNER, 1995), e, no processo infeccioso, esse cálcio dos vacúolos extravasarem.

Quanto ao potássio, o baixo nível em tecidos sintomáticos pode ser decorrente das toxinas fúngicas que induzem ao aumento do efluxo de íons K^+ , reduzindo os teores de K nos tecidos e células infectados (RICHARDSON; CROUGHAN, 1989).

4 CONCLUSÃO

Existe variação nos teores de K nos tecidos com lesão de mancha manteigosa.e de Ca e K nos tecidos de folhas de cafeeiro com lesão de cercosporiose.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 43 p. Apostila.
- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.
- FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. A. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.
- GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, jun. 2003.
- LIMA, L. M. et al. Relação nitrogênio/potássio com mancha de Phoma e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 223-228, 2010.
- LINS, S. R. O. et al. Constatação de *Xylella fastidiosa* em pecíolos e hipocótilos de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 42-47, jan./fev. 2008.
- MALAVOLTA, E. Lembrado que a revolução é: nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 111, n. 3, p. 10-11, 2005.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 1995. 889 p.
- NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.
- POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, abr. 2004.

POZZA, A. A. A. et al. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 53-60, jan. 2001.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. **Semiologia do cafeeiro**: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, 2010. 215 p.

RICHARDSON, M. D.; CROUGHAN, S. S. Potassium influence on susceptibility of bermudagrass to *Helminthosporium cynodontis* toxin. **Crop Science**, Madison, v. 29, p. 1280-1282, 1989.

SANTOS, F. S. et al. Adubação orgânica, nutrição e progresso de cercosporiose e ferrugem-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 783-791, jul. 2008.

ANEXOS

ANEXO A - Experimento de isolamento

TESTE F DA PORCENTAGEM DE ISOLADOS OBTIDOS

Arquivo analisado:

C:\Users\Marcelo\Desktop\Trabalhos\1 MESTRADO\dissertação\experimento de isolamento\porcentagem colto.dbf

Variável analisada: CG

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATA	23	36915.111111	1605.004831	6.701	0.0000
erro	48	11496.000000	239.500000		
Total corrigido	71	48411.111111			
CV (%) =	42.86				
Média geral:	36.111111	Número de observações:	72		

TESTE DE MÉDIA SCOTT-KNOTT

Arquivo analisado:

C:\Users\Marcelo\Desktop\cg.DB

Variável analisada: cg

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
trat	23	35438.727378	1540.814234	6.560	0.0000
erro	48	11273.465133	234.863857		
Total corrigido	71	46712.192511			
CV (%) =	42.08				
Média geral:	36.4161111	Número de observações:	72		

Teste Scott-Knott para a FV trat

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 8.8480479380943

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
11	3.703333	a1
8	7.406667	a1
3	11.110000	a1
10	11.110000	a1
2	14.813333	a1
12	14.813333	a1
1	14.813333	a1
5	18.516667	a1
9	18.516667	a1
6	22.220000	a1
7	29.626667	a1
4	29.626667	a1
22	33.330000	a1
21	44.440000	a2

13	48.143333 a2
19	48.143333 a2
18	55.550000 a2
24	59.253333 a2
20	59.253333 a2
23	59.253333 a2
15	59.253333 a2
14	66.660000 a2
17	70.363333 a2
16	74.066667 a2

Experimento de inoculação

TESTE F

Arquivo analisado:

C:\Users\Marcelo\Desktop\regressão.dbf

Variável analisada: %_AREA_LES

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	5	319.155556	63.831111	381.234	0.0000
CONCENTRAC	4	219.044444	54.761111	327.063	0.0000
TRATAMENTO*CONCENTRA	20	272.288889	13.614444	81.313	0.0000
BLOCO	2	0.955556	0.477778	2.854	0.0658
erro	58	9.711111	0.167433		
Total corrigido	89	821.155556			
CV (%) =	25.22				
Média geral:	1.622222	Número de observações:	90		

 Obs. Codificações usadas para as FV do quadro de ANAVA

 1: TRATAMENTO
 2: CONCENTRAC
 3: TRATAMENTO*CONCENTRAC
 4: BLOCO
 5: Fim

DESDOBRAMENTO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA CONCENTRAÇÃO

 Análise do desdobramento de TRATAMENTO dentro de cada nível de:

CONCENTRAC

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	/1 5	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
TRATAMENTO	/2 5	2.944444	0.588889	3.517	0.0076
TRATAMENTO	/3 5	56.000000	11.200000	66.892	0.0000
TRATAMENTO	/4 5	111.833333	22.366667	133.586	0.0000
TRATAMENTO	/5 5	420.666667	84.133333	502.490	0.0000
Erro	58	9.711111	0.167433		

 Codificação usada para o desdobramento

cod. CONCENTRAC

1 = 0

2 = 500000

3 = 1000000

4 = 2000000

5 = 4000000

 Teste de Scott-Knott para o
 desdobramento de TRATAMENTO dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 0.236243483290419

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
4	0.000000 a1	
5	0.000000 a1	
6	0.000000 a1	
1	0.000000 a1	
2	0.000000 a1	
3	0.000000 a1	

Teste de Scott-Knott para o
 desdobramento de TRATAMENTO dentro da codificação:
 2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 0.236243483290419

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.000000 a1	
4	0.000000 a1	
1	0.000000 a1	
6	0.000000 a1	
3	0.666667 a2	
2	1.000000 a2	

Teste de Scott-Knott para o
 desdobramento de TRATAMENTO dentro da codificação:
 3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 0.236243483290419

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

4	0.000000 a1
5	0.000000 a1
6	0.000000 a1
1	0.666667 a1
2	2.666667 a2
3	4.666667 a3

Teste de Scott-Knott para o
desdobramento de TRATAMENTO dentro da codificação:

4

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0.236243483290419

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	0.000000 a1	
4	0.000000 a1	
5	0.666667 a2	
1	1.333333 a2	
2	4.333333 a3	
3	6.666667 a4	

Teste de Scott-Knott para o
desdobramento de TRATAMENTO dentro da codificação:

5

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0.236243483290419

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	0.000000 a1	
4	0.000000 a1	
5	1.000000 a2	
1	3.666667 a3	
2	8.333333 a4	
3	13.000000 a5	

 Análise do desdobramento de CONCENTRAC dentro de cada nível de:

TRATAMENTO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONCENTRAC	/1 4	27.733333	6.933333	41.410	0.0000
CONCENTRAC	/2 4	128.933333	32.233333	192.515	0.0000
CONCENTRAC	/3 4	332.000000	83.000000	495.721	0.0000
CONCENTRAC	/4 4	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
CONCENTRAC	/5 4	2.666667	0.666667	3.982	0.0063
CONCENTRAC	/6 4	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Erro	58	9.711111	0.167433		

Codificação usada para o desdobramento

cod. TRATAMENTO

1 = 1

2 = 2

3 = 3

4 = 4

5 = 5

6 = 6

DESDOBRAMENTO DA CONCENTRAÇÃO DENTRO DE CADA TRATAMENTO

Análise de regressão para o

desdobramento de CONCENTRAC dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão de cada média dessa FV: 0.236243483290419

b1 : X

b2 : X^2

 Modelos reduzidos sequenciais

Parâmetro	Estimativa	t para SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	-0.291667	0.15401191	-1.894	0.0632
b1	0.000001	0.00000007	12.716	0.0000

 $R^2 = 97.63\%$

Valores da variável independente		
	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	-0.291667
500000.000000	0.000000	0.183333
1000000.000000	0.666667	0.658333
2000000.000000	1.333333	1.608333
4000000.000000	3.666667	3.508333

Parâmetro	Estimativa	t para		Pr> t
		SE	H0: Par=0	
b0	-0.076923	0.20088712	-0.383	0.7032
b1	0.000000	0.00000028	1.732	0.0886
b2	0.000000	0.00000000	1.665	0.1013

$R^2 = 99.30\%$

Valores da variável independente		
	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	-0.076923
500000.000000	0.000000	0.197188
1000000.000000	0.666667	0.526716
2000000.000000	1.333333	1.352026
4000000.000000	3.666667	3.667659

Somas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
b1	1	27.075000	27.075000	161.707	0.000
b2	1	0.464123	0.464123	2.772	0.101
Desvio	2	0.194210	0.097105	0.580	0.563
Erro	58	9.711111	0.167433		

Análise de regressão para o desdobramento de CONCENTRAC dentro da codificação:

2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão de cada média dessa FV: 0.236243483290419

b1 : X
b2 : X^2

Modelos reduzidos sequenciais

Parâmetro	Estimativa	t para SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	0.166667	0.15401191	1.082	0.2837
b1	0.000002	0.00000007	27.664	0.0000

R^2 = 99.38%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	0.166667
500000.000000	1.000000	1.200000
1000000.000000	2.666667	2.233333
2000000.000000	4.333333	4.300000
4000000.000000	8.333333	8.433333

Parâmetro	Estimativa	t para SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	-0.000000	0.20088712	-0.000	1.0000
b1	0.000002	0.00000028	8.509	0.0000
b2	-0.000000	0.00000000	-1.292	0.2014

R^2 = 99.60%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	-0.000000
500000.000000	1.000000	1.189247
1000000.000000	2.666667	2.335484
2000000.000000	4.333333	4.498925
4000000.000000	8.333333	8.309677

Somas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
b1	1	128.133333	128.133333	765.281	0.000
b2	1	0.279570	0.279570	1.670	0.201
Desvio	2	0.520430	0.260215	1.554	0.220
Erro	58	9.711111	0.167433		

Análise de regressão para o
desdobramento de CONCENTRAC dentro da codificação:

3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão de cada média dessa FV: 0.236243483290419

b1 : X

b2 : X^2

Modelos reduzidos sequenciais

Parâmetro	Estimativa	t para		
		SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	0.075000	0.15401191	0.487	0.6281
b1	0.000003	0.00000007	43.950	0.0000

R^2 = 97.41%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	0.075000
500000.000000	0.666667	1.716667
1000000.000000	4.666667	3.358333
2000000.000000	6.666667	6.641667
4000000.000000	13.000000	13.208333

Parâmetro	Estimativa	t para		
		SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	-0.261538	0.20088712	-1.302	0.1981
b1	0.000004	0.00000028	14.055	0.0000
b2	-0.000000	0.00000000	-2.609	0.0115

R^2 = 97.76%

Valores da variável independente		
	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	-0.261538
500000.000000	0.666667	1.694955
1000000.000000	4.666667	3.564599
2000000.000000	6.666667	7.043342
4000000.000000	13.000000	12.958644

Somas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
b1	1	323.408333	323.408333	1931.569	0.000
b2	1	1.139888	1.139888	6.808	0.012
Desvio	2	7.451778	3.725889	22.253	0.000
Erro	58	9.711111	0.167433		

Análise de regressão para o desdobramento de CONCENTRAC dentro da codificação:
4

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão de cada média dessa FV: 0.236243483290419

b1 : X
b2 : X^2

Modelos reduzidos sequenciais

Parâmetro	Estimativa	t para	
		SE	H0: Par=0
b0	0.000000	0.15401191	0.000
b1	0.000000	0.00000007	0.000

R^2 = 0.00%

Valores da variável independente		
	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	0.000000
500000.000000	0.000000	0.000000
1000000.000000	0.000000	0.000000
2000000.000000	0.000000	0.000000
4000000.000000	0.000000	0.000000

Parâmetro	Estimativa	t para SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	0.000000	0.20088712	0.000	1.0000
b1	0.000000	0.00000028	0.000	1.0000
b2	0.000000	0.00000000	0.000	1.0000

R² = 0.00%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	0.000000
500000.000000	0.000000	0.000000
1000000.000000	0.000000	0.000000
2000000.000000	0.000000	0.000000
4000000.000000	0.000000	0.000000

Somas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
b1	1	0.000000	0.000000	0.000	0.997
b2	1	0.000000	0.000000	0.000	0.997
Desvio	2	0.000000	0.000000	0.000	1.000
Erro	58	9.711111	0.167433		

Análise de regressão para o
desdobramento de CONCENTRAC dentro da codificação:
5

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão de cada média dessa FV: 0.236243483290419

b1 : X
b2 : X²

Modelos reduzidos sequenciais

Parâmetro	Estimativa	t para SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	-0.091667	0.15401191	-0.595	0.5540
b1	0.000000	0.00000007	3.793	0.0004

R² = 90.31%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	-0.091667
500000.000000	0.000000	0.050000
1000000.000000	0.000000	0.191667
2000000.000000	0.666667	0.475000
4000000.000000	1.000000	1.041667

Parâmetro	Estimativa	t para		
		SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	-0.107692	0.20088712	-0.536	0.5940
b1	0.000000	0.00000028	1.115	0.2692
b2	-0.000000	0.00000000	-0.124	0.9015

R² = 90.41%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	-0.107692
500000.000000	0.000000	0.048966
1000000.000000	0.000000	0.201489
2000000.000000	0.666667	0.494127
4000000.000000	1.000000	1.029777

Somas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
b1	1	2.408333	2.408333	14.384	0.000
b2	1	0.002585	0.002585	0.015	0.902
Desvio	2	0.255749	0.127874	0.764	0.471
Erro	58	9.711111	0.167433		

Análise de regressão para o
desdobramento de CONCENTRAC dentro da codificação:

6

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão de cada média dessa FV: 0.236243483290419

b1 : X
b2 : X^2

Modelos reduzidos sequenciais

Parâmetro	Estimativa	t para		
		SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	0.000000	0.15401191	0.000	1.0000
b1	0.000000	0.00000007	0.000	1.0000

R^2 = 0.00%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	0.000000
500000.000000	0.000000	0.000000
1000000.000000	0.000000	0.000000
2000000.000000	0.000000	0.000000
4000000.000000	0.000000	0.000000

Parâmetro	Estimativa	t para		
		SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	0.000000	0.20088712	0.000	1.0000
b1	0.000000	0.00000028	0.000	1.0000
b2	0.000000	0.00000000	0.000	1.0000

R^2 = 0.00%

Valores da variável independente	Médias observadas	Médias estimadas
0.000000	0.000000	0.000000
500000.000000	0.000000	0.000000
1000000.000000	0.000000	0.000000
2000000.000000	0.000000	0.000000
4000000.000000	0.000000	0.000000

Somas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
--------------------	------	------	------	----	------

b1	1	0.000000	0.000000	0.000	0.997
b2	1	0.000000	0.000000	0.000	0.997
Desvio	2	0.000000	0.000000	0.000	1.000
Erro	58	9.711111	0.167433		

Experimento microanalise de raios x

ANÁLISE DE FOLHA MANCHA MANTEIGOSA

Arquivo analisado:

C:\Users\Marcelo\Desktop\Trabalhos\1 MESTRADO\dissertação\experimento de microanalise d raio x\Dados microanalise d raio x\anava cerc.dbf

Variável analisada: K

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATA	3	22157.739110	7385.913037	173.536	0.0000
REP	50	539.849502	10.796990	0.254	1.0000
erro	147	6256.510890	42.561299		
Total corrigido	200	28954.099502			
CV (%) =	28.54				
Média geral:	22.8606965	Número de observações:	201		

Teste Scott-Knott para a FV TRATA

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 50.2463054187192
 Erro padrão: 0.920354983174029

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	9.686275 a1	
4	15.700000 a2	
3	32.000000 a3	
2	34.320000 a3	

ANÁLISE DE FOLHA SADIA

Arquivo analisado:

C:\Users\Marcelo\Desktop\Trabalhos\1 MESTRADO\dissertação\experimento de microanalise d raio x\Dados microanalise d raio x\anova sadia.dbf

Variável analisada: K

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATA	3	20454.862013	6818.287338	46.182	0.0000
REP	50	23514.200249	470.284005	3.185	0.0000
erro	147	21702.887987	147.638694		
Total corrigido	200	65671.950249			
CV (%) =	24.11				
Média geral:	50.3930348	Número de observações:	201		

Teste t (LSD) para a FV TRATA

DMS: 4.79072501090588 NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 50.2463054187192
Erro padrão: 1.71414687059648

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
4	39.320000	a1
3	41.240000	a1
2	60.100000	a2
1	60.705882	a2
