

ANDRÉ DORIZZOTTO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PATOGENICIDADE  
DE **Colletotrichum** sp ASSOCIADOS A CAFEEIROS (**Coffea  
arabica** L.) EM DOIS MUNICÍPIOS DE MINAS GERAIS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração Fitossanidade, sub-área Fitopatologia, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS — MINAS GERAIS  
1993

Aos meus pais,

PASCHOAL E NAIR

A minha namorada,

CARLA

Aos meus irmãos,

ÂNGELA, IZABEL, PASCHOAL E PEDRO

OFEREÇO E DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus. pela saúde paz concedida, e pela iluminação **nos** momentos mais críticos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Dr Mário Sobral de Abreu, pela confiança **em** mim depositada, orientação objetiva, pela disponibilidade, incentivo e principalmente amizade dispensada;

**Aos** professores do Departamento de Fitossanidade da ESAL. pelos ensinamentos e amizade;

Ao pesquisador Antônio Alves Pereira da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, pela colaboração na obtenção de sementes e frutos de café, e pelas valiosas sugestões;

Ao professor José da Cruz Machado, pelos ensinamentos e sugestões oportunas;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação da ESAL;

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade da ESAL, **pela** atenção e dedicação dispensada;

Aos funcionários da Biblioteca da ESAL, pelo auxílio nas

citações bibliográficas

Aos amigos Carlos Edgar, Bruno e Edson pela amizade e  
convívio;

e todos que de alguma maneira colaboraram para a  
realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

ANDRÉ DORIZZOTTO, filho de Paschoal Dorizzotto e Nair Nalin Dorizzotto, natural de Charqueada, Estado de São paulo, nasceu em 12 de março de 1968.

Realizou o curso primário na E.E.P.G. "Pedro Crem Filho", no período de 1975 a 1978; o curso ginásial na E.E.P.G. "Erotides de Campos", no período de 1979 a 1982; ambos em Charqueada-SP e o curso secundário no Colégio "Salesiano Dom Bosco", no período de 1983 a 1985, em Piraçicaba-SP.

Em março de 1986, iniciou o curso de Agronomia na Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras-MG, obtendo o grau de Engenheiro agrônomo em dezembro de 1990.

Em março de 1991, iniciou o curso de Pós-Graduação a nível de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitossanidade, sub-brea Fitopatologia, na Escola Superior de Agricultura de Lavras, concluindo-o em julho de 1993.

## SUMARIO

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | INTRODUÇÃO . . . . .   | 1  |
| 2.     | REVISÃO DE LITERATURA . . . . .  | 3  |
| 2.1.   | Nomenclatura e taxonomia de <i>Colletotrichum</i> . . . . .              | 3  |
| 2.2.   | Características morfológicas dos apressórios . . . . .                   | 8  |
| 2.3.   | Importância e sintomas causados pela antracnose<br>do cafeeiro . . . . . | 9  |
| 2.4.   | Relação da incidência da CBD com fungicidas cúpricos .                   | 11 |
| 2.5.   | Resistência varietal a <i>Colletotrichum</i> . . . . .                   | 12 |
| 3.     | MATERIAL E MÉTODOS . . . . .   | 15 |
| 3.1.   | Local e época do estudo . . . . .  | 15 |
| 3.2.   | Isolados utilizados . . . . .  | 15 |
| 3.3.   | Técnica de isolamento e obtenção de culturas<br>monospóricas . . . . .   | 16 |
| 3.4.   | Dimensão dos conídios . . . . .  | 17 |
| 3.5.   | Morfologia dos apressórios . . . . .                                     | 18 |
| 3.6.   | Avaliação do crescimento micelial na presença<br>de cobre . . . . .      | 18 |
| 3.7.   | Seleção do germoplasma . . . . .   | 20 |
| 3.8.   | Caracterização patogênica dos isolados . . . . .                         | 21 |
| 3.8.1. | Patogenicidade em plântulas . . . . .                                    | 21 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.8.1.1. | Obtenção das plântulas . . . . .                                    | 21 |
| 3.8.1.2. | Obtenção de inóculo e técnica de<br>inoculação . . . . .            | 22 |
| 3.8.2.   | Patogenicidade em mudas . . . . .                                   | 25 |
| 3.8.3.   | Patogenicidade em frutos verdes destacados. .                       | 25 |
| 3.9.     | Efeito da inoculação dupla e da concentração do<br>inóculo. . . . . | 26 |
| 4.       | RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .                                    | 28 |
| 4.1.     | Caracterização morfológica dos isolados. . . . .                    | 28 |
| 4.1.1.   | Características culturais . . . . .                                 | 28 |
| 4.1.2.   | Dimensão dos conídios . . . . .                                     | 30 |
| 4.1.3.   | Morfologia dos apressórios. . . . .                                 | 36 |
| 4.2.     | Efeito do cobre sobre o crescimento micelial . . . . .              | 31 |
| 4.3.     | Patogenicidade dos isolados. . . . .                                | 41 |
| 4.3.1.   | Patogenicidade em plântulas . . . . .                               | 41 |
| 4.3.2.   | Patogenicidade em frutos verdes destacados. .                       | 44 |
| 4.3.3.   | patogenicidade em mudas . . . . .                                   | 47 |
| 4.4.     | Efeito da inoculação dupla e da concentração do<br>inóculo. . . . . | 48 |
| 5.       | CONCLUSÕES . . . . .  | 53 |
| 6.       | RESUMO . . . . .  | 55 |
| 7.       | SUGESTÕES . . . . .   | 57 |
| 8.       | SUMMARY . . . . .   | 58 |
| 9.       | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .                                | 60 |

## LISTA DE TABELAS

| TABELAS |   | PÁGINA |
|---------|---|--------|
| 1       | Progênes e linhagem de cafeeiros utilizadas para o estudo. ESAL, Lavras - MG, 1993 . . .  | 21     |
| 2       | Critério de avaliação do espectro de reação à <i>Colletotrichum</i> spp apresentado por plântulas de café, ESAL, lavras - MG, 1993 . . .  | 24     |
| 3       | Distribuição da frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados monospóricos de <i>Colletotrichum coffeanum</i> oriundos de Cristais. ESAL, Lavras - MG, 1993. . . . .        | 31     |
| 4       | Distribuição de frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados monospóricos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> oriundos de Uberlândia. ESAL, Lavras-MG, 1993 . . . . . | 31     |
| 5       | Distribuição de frequência das larguras dos conídios dos isolados monospóricos de <i>Colletotrichum coffeanum</i> oriundos de Cristais. ESAL, lavras-MG, 1993. . . . .              | 33     |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 6  | <i>Distribuição de frequência das larguras dos conídios dos isolados monospóricos de <b>Colletotrichum gloeosporioides</b> oriundos de Uberlândia, ESAL, Lavras-MG, 1993. . . . .</i>                                     | 33 |
| 7  | <i>Índice medio de velocidade de crescimento micelial de culturas monospóricas de <b>Colletotrichum</b> sob diferentes concentrações do fungicida oxiclóreto de cobre em meio de cultura. ESAL, Lavras-MG, 1993 . . .</i> | 38 |
| 8  | <i>Índice medio de doença (%), em ensaio sobre a patogenicidade dos isolados em plântulas de cafeeiros. ESAL, Lavras-MG, 1993 . . . . .</i>   | 43 |
| 9  | <i>Porcentagem media de frutos afetados em ensaio sobre a patogenicidade dos isolados sobre frutos verdes. ESAL, Lavras-MG, 1993 . .</i>  | 45 |
| 10 | <i>Número medio de lesões formadas <b>por</b> folha em teste de patogenicidade com <b>Colletotrichum coffeanum</b>. ESAL, Lavras-MO, 1993 , . . . . .</i>   | 48 |
| 11 | <i>Número medio de lesões formadas por folha jovem e velha inoculadas com <b>três</b> concentrações de <b>Colletotrichum coffeanum</b> com e sem <b>inoculação</b> dupla. ESAL, Lavras-MG, 1993. . .</i>                  | 49 |

**LISTA DE FIGURAS**

| <b>FIGURA</b> |  | <b>PAGINA</b> |
|---------------|--|---------------|
| 1             | <i>Efeito do fungicida oxiclóreto de cobre sobre o crescimento micelial dos quatro isolados monospóricos . . . . .</i>                               | 40            |
| 2             | <i>Efeito da concentração de inóculo sobre o número de lesões formados em folhas jovens com inoculação simples e dupla de C. coffeanum . . . . .</i> | 51            |
| 3             | <i>Efeito da concentração de inóculo sobre o número de lesões formadas em folhas velhas com inoculação simples e dupla de C. coffeanum . . . . .</i> | 52            |

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro **é** prejudicada economicamente pela incidência de um número considerável de doenças. Entre estas doenças, **a** antracnose é um dos fatores limitantes **na** produção. Essa enfermidade é de ocorrência generalizada **na** maioria das regiões onde a cultura do cafeeiro se desenvolve, havendo uma variação grande **na** natureza e intensidade dos danos **por** ela provocados. Em muitos países do continente Africano, em que **o** café é cultivado, é **a** doença mais grave do cafeeiro, afetando principalmente **os** frutos verdes, alcançando perdas **na** produção que variam de **20% a 80%** (KRANZ, 1988), onde é chamada de "coffee berry disease" ou CBD, cujo agente causal é uma forma específica do fungo *Colletotrichum coffeanum* Noack (MC DONALD, 1926).

O surgimento, **na** Africa, da forma patogênica de **C. coffeanum**, provavelmente um *mutante*, foi devido a varios fatores e, em parte, resultado de um desequilíbrio da população fúngica, constituída de por virias especies e estirpes de *Colletotrichum*,

afetada pelas repetidas pulverizações com fungicidas cúpricos utilizados no controle à ferrugem do cafeeiro (NUTMAN & ROBERTS, 1969; GRIFFITHS, 1972 e MULINGUE & GRIFFITHS, 1974).

Embora não haja evidência comprovada até o momento da existência da CBD no Brasil, efeito semelhante ao ocorrido na Africa pode vir a ocorrer, uma vez que com o surgimento da ferrugem, nossos cafezais vêm sendo pulverizados periodicamente com produtos cúpricos.

A espécie *C. coffeanum* é considerada como inexistente causando danos, em nosso país. Entretanto em abril de 1990 foi constatada sua presença em uma lavoura de café localizada no município de Cristais - MG, causando manchas não necróticas em folhas e lesões em frutos, sintomas semelhantes aos da mancha manteigosa (WELLMAN, 1957). Posteriormente constatou-se mudas de café atacadas por *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de um viveiro localizado no município de Uberlândia - MG.

O presente trabalho visou estudar a morfologia e patogenicidade desses dois isolados obtidos nessas duas regiões cafeeiras do Estado de Minas Gerais, bem como verificar seus comportamentos quando submetidos ao crescimento em meio de cultura contendo concentrações crescentes de fungicida cúprico, desta forma tentando se estabelecer um confronto com a estirpe patogênica de *C. coffeanum* presente nos cafezais da Africa.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Nomeclatura e Taxonomia de *Colletotrichum*

As características do gênero *Colletotrichum* e sua divisão em espécies, são discutidas por ARX, citado por CARVAJAL (1987): os acérvulos são formados na epiderme do tecido hospedeiro e, menos frequentemente sob a epiderme, o micélio, proeminente e septado cresce nas células epidermais de células mais profundas, orientando-se no sentido perpendicular à superfície do substrato, fazendo pressão sobre a parede externa da epiderme e cutícula, de modo que esta se abre em locus ou fendas. Os acérvulos podem, dentro de uma mesma espécie, e, frequentemente sobre a mesma planta, variar em forma e tamanho. A camada basal possui muitas vezes um estroma composto, as vezes raso e fino. Muitas vezes os acérvulos estão cobertos com um grande número de setas rejuvenecidas, marrons, ponteagudas para cima, emergindo da parte basal. As células da camada basal se

transformam em conidióforos com formato de bastão, geralmente com 1 a 2 septos. Os conídios surgem acrogenalmente e se soltam com facilidade. Têm dimensão variável na faixa de 10 a 40 micra de comprimento por 3 a 8 micra de espessura, são elípticos, cilíndricos, fusiformes e, ainda, recurvados, unicelulares, hialinos. Embora quando existe alta umidade, o grande número de conídios formam agregados mucilaginosos de cor vermelho claro, laranja, marrom ou esbranquiçados. Os conídios são disseminados pela Água, sobretudo por respingos de chuva. Na Água ocorre a germinação formando os tubos germinativos, posteriormente são formados os apressórios; estes podem se formar diretamente dos conídios ou com mais frequência se formam nos tubos germinativos. A partir dos apressórios nascem hifas de infecção que perfuram a cutícula, iniciando-se o processo de colonização.

A descrição original da espécie *C. coffeanum* de acordo com NOACK (1902), é a seguinte: acérvulos achatados, dispersos na superfície superior das folhas ou ramos. Os conídios são quase cilíndricos, as vezes levemente curvados ou de forma um pouco irregular com as extremidades arredondadas, de cor hialina, com mucilagem granulada ou com pequenas gotas brilhantes, medindo de 4 a 5 micra de largura e 12 a 18 micra de comprimento. As setas inexistem quando os corpos frutíferos ainda são novos, aparecendo no entanto, a medida que atingem a maturidade; sendo cilíndricas, afiladas na extremidade, sem divisões ou apenas levemente septadas.

A forma patogênica de *C. coffeanum* que causa a CBD nos cafezais da Africa foi caracterizada por MC DONALD (1926), pela presença de acérvulos com setas marrom escura afiladas, com 4 ou mais septos medindo de 84 a 103 micra de comprimento. Os conídios são típicos em forma e medem 13,4 a 18,5 micra de comprimento por 4,8 a 6,6 micra de largura (media de 15,1 X 5,7 micra).

O mesmo autor refere-se ainda A presença de estirpes não patogênicas conjuntamente com a patogênica, sobre as plantas atacadas. RAYNER (1952), diferencia a estirpe patogênica das não patogênicas pela presença de micélio aéreo, de cor cinza escura, e pela formação de conídios diretamente das hifas e não em acérvulos. Ele denominou essa forma patogênica de "variante virulans". Outra diferença citada por vários autores B. seu crescimento muito lento em meio de cultura em relação As formas não patogênicas.

GIBBS (1969), coletou esporos de frutos verdes e cerejas afetados, de várias regiões do Quênia, com os quais fez isolamentos em meio de cultura contendo 0,02 % de streptomicina. Obteve culturas puras da variante "virulans", bem como de outras estirpes de *Colletotrichum*, sempre associada Aquela. Fez também isolamento a partir de conídios formados nos internódios dos ramos localizados logo abaixo daqueles que apresentavam a casca necrosada e parda. Os isolamentos obtidos foram divididos em quatro grupos, com as seguintes características culturais:  
ccm: Crescimento rápido, abundante micélio aéreo claro, conídios

formados diretamente nas hifas;

cca: Crescimento moderado, micélio aéreo claro, pouco abundante, conídios curtos, formados **em** acérvulos;

ccp: Crescimento lento, abundante micélio aéreo róseo, conídios de forma mais alongada, alguns terminando **em** ponta **em** uma das extremidades, formados diretamente sobre as hifas.

CBD ou variante "*virulans*": Crescimento lento, abundante micélio aéreo de coloração cinza-escuro, conídios formados diretamente sobre as hifas.

Hindorf, citado por ROSSETTI et alii (1975), estudou as características culturais de um grande número de cepas de *Colletotrichum* isoladas de cafeeiros do Quênia, separando **os** componentes da população desse complexo. Com base nessas características apresentou a seguinte classificação:

1 - *C. coffeanum* Noack - corresponde a forma "*virulans*" de RAYNER (1952) e a forma CBD de GIBBS (1969). Características: Micélio inicialmente branco e depois cinza, marrom escuro ou preto; conídios cilíndricos, arredondados nas duas extremidades, sempre produzidos **em** hifas, nunca **em** acérvulos; a forma perfeita *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld e Schrenk nunca foi observada em cultura pura; patogênico em frutos verdes de café; presente **nos** frutos **em** todos **os** estágios, Principalmente **nos** verdes, **nas** flores, botões florais, folhas e ramos; crescimento lento **em** meio de cultura.

2 - *C. acutatum* Simmonds - corresponde a forma ccp de GIBBS

(1969). Características: micélio inicialmente branco, tornando-se róseo e, eventualmente, vermelho escuro ou preto; conídios fusiformes, com a base arredondada e a extremidade afilada, produzidos em hifas e também em acérvulos de cor preta; afeta várias espécies vegetais, causando podridão dos frutos como em *Carica papaya*, *Fragaria* sp e *Lycopersicon esculentum* na Austrália; no cafeeiro, distribuindo-se por todas as partes: ramos, frutos verdes, cerejas, folhas; velocidade de crescimento media em cultura.

3 - *C. gloeosporioides* Penz., forma "micélio branco" - corresponde a forma ccm de GIBBS (1969). Características: micélio branco ou cinza claro, conídios cilíndricos com extremidade arredondadas, produzidos em hifas e em acérvulos; capacidade de produzir peritécios da forma perfeita *G. cingulata* em meio de cultura, comum em ramos e folhas, ocasionalmente em café seco; crescimento rápido em cultura.

4 - *C. gloeosporioides* Penz, forma "micélio esverdeado" - Características: micélio inicialmente branco, tornando-se cinza esverdeado e mais tarde marron; conídios cilíndricos, arredondados nas duas extremidades, as vezes recurvados, de tamanho maior do que os das 3 formas precedentes; Presença da forma perfeita *G. cingulata* em meio de cultura; crescimento lento em meio de cultura.

5 - *C. gloeosporioides* Penz - corresponde a forma cca de GIBBS (1969). Características: micélio escuro, escasso; conídios de

tamanho maior que os das formas precedentes, truncados na base e de extremidades afiladas, formados em acérvulos pretos; comumente encontrado só nos ramos de cafeeiros; velocidade de crescimento media em cultura.

**6 - *G. cingulata*** (Stonem.) Spauld e Schrenk. Características: micélio ocasionalmente branco, estéril; forma peritécios em cultura; restrita a ramos e folhas; crescimento rápido em cultura.

Nessa classificação, a forma de nº 1 é o agente causal de CBD; as de números 2, 3, 5 e 6 as não patogênicas; a de nº 4 apresenta certa patogenicidade (VERMEULEN, 1970).

Recentemente RODRIGUES et alii (1991), trabalhando com isolados de *C. coffeanum* que causam a CBD em Angola e Malawi, encontraram características morfológicas diferentes do isolado que causa a CBD no Quênia. Em um estudo seguinte RODRIGUES et alii' (1992), trabalhando com inoculações cruzadas destes mesmos isolados em cultivares de *C. arabica* oriundas do Brasil e da Colômbia, evidenciaram a presença de raças fisiológicas de *C. coffeanum*, uma vez que algumas progênies apresentaram resistência ao isolado do Quênia e suscetibilidade aos demais isolados.

## 2.2 Características morfológica dos apressórios

Uma característica que pode colaborar com a taxonomia de isolados de *Colletotrichum* é a morfologia dos apressórios. De

acordo com SUTTON (1968), essa característica em gramíneas pode ser uma característica adicional na taxonomia desses fungos, desde que seja correlacionada com características biológicas adicionais.

Segundo SUTTON (1962) *C. trichellum* e *C. dematium* foram considerados sinônimos por Von Arx em 1957, porém as características morfológicas de seus apressórios diferenciam um do outro. Além das diferenças entre apressórios existem diferenças morfológicas entre seus conídios, acérvulos e crescimento micelial em meio BDA.

SUTTON (1968) mostrou que existem diferenças quantitativas e qualitativas entre apressórios produzidos por isolados de *Colletotrichum* de cana - de - açúcar (*C. falcatum*) e o de sorgo e milho (*C. graminicola*). Há indicações de diferenças morfológicas entre as duas espécies e uma subdivisão de *C. graminicola* em , no mínimo, 2 grupos diferentes. Portanto, a união entre essas duas espécies feita por Von Arx em 1957, foi considerada injustificável. Ainda segundo SUTTON (1968), a maneira mais satisfatória de distinção entre os três grupos de *Colletotrichum* é a diferença qualitativa de seus apressórios.

### 2.3 Importância e sintomas causados pela antracnose do cafeeiro

O fungo *Colletotrichum coffeanum* foi constatado pela primeira vez no Brasil, em 1901, associado a seca de ramos

ponteiros de plantas de café, por Noack que assim o classificou (PEREIRA & CHAVES, 1978). A doença por tal fungo incitada pode receber varios nomes: Antracnose do cafeeiro, Queima - castanha ("Brown blight"), "Die - back", Elon die - back e "Doença da queda do café". Nenhuma dessas doenças, entretanto, apresenta gravidade comparável a CBD ou "coffee berry disease" ou doença - da - baga - do - cafeeiro (MC DONALD, 1926), enfermidade de ocorrência comum no Quênia e outros países da Africa, onde causa prejuizos consideráveis, pois ataca flores e frutos, especialmente os verdes.

MC DONALD (1926), descreveu originalmente **os** sintomas da CBD referindo-se ao ataque a frutos verdes, **os** quais inicia - se por pequenas manchas necróticas escuras, ligeiramente deprimidas, em qualquer região do fruto. Em condições favoráveis as manchas rapidamente se desenvolvem, aumentam de tamanho até tomar todo o fruto. O interior dos **grãos** fica negro, ressecado, endurecido e totalmente destruído pelo patógeno; O pedúnculo dos frutos também **são** afetados. Sobre as lesões podem se desenvolver pequenas pontuações escuras, que **são os** corpos de frutificação - acérvulos - do fungo e, em condições de elevada umidade, aparecem estruturas gelatinosas rosadas, formadas pelo conjunto de esporos. **Os** frutos assim atacados caem facilmente.

NUTMAN (1970), refere-se a outro tipo de lesão dos frutos, rasa, clara onde se formam acérvulos negros em círculos concêntricos; esta lesão é superficial, não atingindo **os** tecidos

internos. A qual classificou como do tipo "scab" e aquelas descritas por MC DONALD (1926) como "ativas".

#### 2.4 Relação da incidência da CBD com fungicidas cúpricos

No Quênia WALLIS & FIRMAN (1967), demonstraram que, em certas circunstâncias, a aplicação de pulverizações com fungicidas cúpricos pode resultar em maior índice de infecção de CBD. FURTADO (1969), refere-se ao emprego generalizado de fungicidas cúpricos no Quênia, e principalmente ao efeito "tonico" desses tratamentos. Segundo o autor, a ausência de CBD em áreas não tratadas com cúpricos, levou a conclusão de que esses fungicidas poderiam ter efeito de elevar o índice de infecção do patógeno, demonstrando em testes de campo e laboratório que, o patógeno é consistentemente mais abundante em ramos pulverizados com cúpricos do que nos não pulverizados.

NUTMAN & ROBERTS (1969) e VERMEULEN (1970), também relataram a ocorrência muito menor de peritécios de *G. cingulata*, em ramos pulverizados com cúpricos, do que em ramos não pulverizados. Esse efeito dos fungicidas cúpricos, aumentando a incidência de CBD, foi posteriormente confirmada por GRIFFLTHS (1972) e MULINGE & GRIFFLTHS (1974).

Hindorf citado por ROSSETTI et alii (1975), constatou maior frequência de *C. coffeanum* em folhas e casca dos ramos, quando pulverizados com óxido de cobre e com orto-difolatan,

enquanto que *C. gloeosporioides* nos ramos, foi em parte reduzido pelos fungicidas.

## 2.5 Resistência varietal a *Colletotrichum*

Em relação a resistência varietal a CBD, sabe-se que as seleções de *Coffea arabica* L. revelam graus variáveis de resistência ao agente da antracnose, onde o Híbrido do Timor se encontra em elevado grau de resistência (FIRMAN, 1964 e HOCKING, 1968). Dentre as variedades de boas qualidades comerciais, plantadas no Quênia, a Blue mountain foi considerada bastante resistente, em estudos feitos por NUTMAN (1970).

Para estudos sobre a resistência varietal, um novo método vem sendo usado no Quênia, utilizando-se de plântulas nas quais se inocula o hipocótilo, os cotilédones e discos de folhas novas (CARVALHO et alii, 1978). por esse método, os primeiros sintomas começam a aparecer em 6 a 1 dias. Esses sintomas variam desde pequenas lesões superficiais no hipocótilo, até lesões numerosas e maiores, de cor preta; e mesmo estrangulamento da haste e morte da plântula (VAN DER VOSSEN et alii, 1976).

No Brasil houve indícios de um foco de CBD, em uma lavoura de café situada no município mineiro de Ouro Fino, onde um fungo do gênero *Colletotrichum* foi isolado de frutos de cafeeiros e com patogenicidade confirmada na Universidade Agrícola de WAGENINGEN na Holanda. Porém os testes de

patogenicidade efetuados em condições de laboratório e campo sobre frutos verdes destacados e não, respectivamente, não apresentaram resultados consistentes e positivos (ALMEIDA et alii, 1983).

FEITOSA et alii (1977), isolaram 1517 cepas de *Colletotrichum* de cafezais do Estado de São Paulo, testando a patogenicidade de um número representativo destas cepas. A patogenicidade em testes de laboratório foi baixa, mesmo as isoladas de frutos apresentando lesões. Quando comparadas com a cepa CBD do Quênia eliminou-se a possibilidade de algumas destas serem *C. coffeanum*.

Na Costa Rica (VARGAS & GONZALES, 1972), comprovaram que o agente causal da "Mancha manteigosa", doença comum sobre *Coffea arabica* naquele país, era causada por um fungo do gênero *Colletotrichum* e não por vírus, como WELLMAN (1957), havia determinado anteriormente. Tal comprovação foi confirmada por Sanches citado por MANSK & MATIELLO (1977) em 1976.

No Brasil BITANCOURT (1958), denominou a "mancha manteigosa" de mancha oleosa considerando-a de pouca importância sobre *C. arabica* no Estado de São Paulo. Porém para as condições de algumas regiões do Estado do Espírito Santo onde predomina o cultivo do café "conilon" (*Coffea canephora* Pierre), há a descrição de sintomas de desfolha e seca progressiva dos ramos da extremidade para a base em plantas desta espécie. Isolamentos de lesões novas de folhas, ramos e frutos, obteve-se sempre colônias

típicas de *Colletotrichum* spp (MANSK & MATIELLO, 1977). Mais tarde AVILES et alii (1983), constataram graus intermediários do ataque da "mancha manteigosa" sobre o café "conilon" na região norte Fluminense, os quais propuseram uma escala de resistência das plantas: imune, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível. Acrescentam esses autores que a quantidade de cada um dos tipos é variável entre as diversas lavouras, predominando porém as do tipo moderadamente suscetível e suscetível.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e época do estudo

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de fitopatologia e patologia de sementes do Departamento de Fítossanidade da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), durante o ano de 1992 e início de 1993.

#### 3.2 Isolados utilizados

Para a realização dos ensaios foram utilizados dois isolados de *Colletotrichum* oriundos de cafeeiros da cultivar Mundo Novo, a saber: Isolado de Cristais - MG, obtido a partir de folhas de plantas adultas, identificado como *Colletotrichum coffeanum* Noack pelo professor Wademir de Albuquerque Cavalcante do Departamento de Micologia da Universidade Federal de

pernambuco; e isolado de Uberlândia MG, obtido a partir de mudas com lesões, enviadas à clínica fitossanitária do Departamento de Fitossanidade da ESAL para identificação onde foi identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* penz., com posterior confirmação na Universidade Rural de Pernambuco.

### 3.3 Técnica de isolamento e obtenção de culturas monospóricas

Com a finalidade de se obter culturas puras dos patógenos fizeram-se isolamentos a partir de lesões jovens (**sem** necrose) presentes nas folhas. **Com o** auxílio de uma tesoura foram retiradas pequenas seções da margem das lesões, de tal maneira que tivessem tecidos sadios e doentes, que em seguida foram colocados em uma solução de álcool a **50 %**, por **30** segundos; e após esse tempo transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, também por **30** segundos; posteriormente lavadas em água destilada e esterelizada; secadas em papel toalha. e transferidas para placas de Petri contendo **BDA** (extrato de batata, **200** g; dextrose, **20** g; ágar, 20g e água, **1000** ml; terramicina, **240** ppm/ml). As placas foram incubadas a temperatura de **22 ± 2°C** e luz alternada em períodos de **12** horas. **A** medida que surgiam as colônias, foram as mesmas repicadas para novas placas contendo meio **BDA**, para obtenção da cultura pura.

Essas colônias purificadas foram utilizadas para a obtenção de culturas monospóricas. **As** placas adicionou-se **água**

destilada esterelizada, obtendo-se uma suspensão de esporos de concentração baixa. Cerca de 0,2 ml desta suspensão foram vertidos em placas de Petri contendo meio ágar - água (ágar, 20 g e água, 1000 ml). Após 24 horas, em capela de fluxo laminar, sob microscópio estereoscópico os esporos germinados foram transferidos individualmente para placas contendo BDA, obtendo-se dois isolados monospóricos para cada isolado do item 3.2

Os isolados obtidos foram conservados em água pelo método de Castellani, modificado por FIGUEIREDO (1967). O método constituiu-se na transferência de discos de BDA com cultura dos fungos para tubos de ensaio com 2/3 de Água destilada esterelizada. Os tubos foram vedados e armazenados em refrigerador a temperatura de  $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os isolados foram renovados a intervalos de 3 meses

### 3.4 Dimensão dos conídios

Nos estudos das dimensões dos conídios foram utilizados os isolados monospóricos descritos no item 3.3, cultivados em meio BDA, durante 7 dias sob luz alternada com 'escuro(12/12h)' e temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  em incubadora. Após esse período foram determinados o comprimento e a largura dos conídios utilizando-se o micrômetro ocular de tambor de Huyghens, previamente calibrado para objetiva de 40 x. A suspensão de conídios foi obtida adicionando-se 20 ml de água destilada por placa e com auxílio de

um pincel de pelos finos os esporos foram liberados; essa suspensão foi filtrada através de uma camada dupla de gaze esterelizada, a fim de eliminar fragmentos de micélio.

Para facilitar as leituras foi adicionado espalhante Tween 20, na proporção de 1 gota para 100 ml de suspensão. Foram preparadas 4 lâminas de cada isolado monospóricico e medidos 25 conídios por lâmina tomados ao acaso, de modo a perfazer um total de 100 medições por isolado monospóricico. Para a distribuição da frequência, os valores observados foram aproximados segundo DUDIENAS (1990).

### 3.5 Morfologia dos apressórios

Os isolados utilizados 'neste experimento foram os mesmos do experimento anterior. Os conídios produzidos durante 7 dias' em meio BDA, foram suspensos em água destilada e esterelizada, sendo uma gota dessa suspensão depositada sobre uma lâmina de microscopia, que permaneceu em câmara úmida, a temperatura de 25°C, em um fotoperíodo de 12 horas, até a germinação. Após 24 horas os conídios foram coloridos com Azul de Amann e a morfologia dos apressórios observada com auxílio de microscópio ótico.

### 3.6 Avaliação do crescimento micelial na presença de cobre

O crescimento micelial dos isolados foi avaliado em

cultura contendo concentrações crescentes de cobre. O fungicida oxiclôreto de cobre, na concentração de **50 X** de cobre metálico, foi adicionado diretamente ao meio **BDA** autoclavado e a temperatura de **45 ± 1°C**. A partir desse meio, foram feitas diluições para outros frascos contendo **BDA** em volumes padronizados, obtendo-se meios com concentrações de **2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0** e **100 ppm**, mais o controle em que foi utilizado somente o meio **BDA**, sem fungicida. Os meios contendo o produto nas diluições referidas foram vertidos em placas de Petri de **9** cm de diâmetro, colocando-se **15 ml** por placa, num total de **4** repetições para cada concentração.

**Três (3)** discos de **5 mm** de diâmetro, retirados da margem da colônia de cada isolado crescido em **BDA** durante **7** dias, conforme referido no item **3.3**, foram transferidos e depositados equidistantes com a face micelial sobre o meio contendo diferentes concentrações do fungicida cúprico.

Após a transferência de cada isolado para cada uma das concentrações do produto, as placas foram colocadas em incubadora à temperatura de **22 ± 2°C**, por um período de **7** dias.

Para a avaliação do crescimento micelial fez-se a medição diariamente de **2** diâmetros das colônias em posição ortogonal por placa durante **os 5** primeiros dias após a semeadura do inóculo; o índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado pela seguinte fórmula.

$$VCM = \frac{(D - D_a)}{N}, \text{ onde}$$

VCM = Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

D = Diâmetro médio atual

D<sub>a</sub> = Diâmetro médio do dia anterior

N = Número de dias após a inoculação

A fórmula utilizada na determinação do índice de velocidade de crescimento micelial é a mesma utilizada por Maguire, adaptada por OLIVEIRA (1991).

Para a análise estatística os dados foram transformados segundo arc. sen.  $\sqrt{X+0,5/100}$ .

### 3.7 Seleção do germoplasma

Mudas de cafeeiros (BETTENCOURT, 1981), em geração F<sub>3</sub> descendente da planta 1 do cruzamento CIFC H 361 (CIFC 971/10 "Vilfa Sarchi" X CIFC 832/2 - "Híbrido de Timor"), com a denominação genérica de "Sarchimor" e designadas de UFV 973; três em geração F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub> oriundas da planta número 5 do cruzamento CIFC HW 26 (CIFC 19/1 - "Caturra vermelho" com o CIFC 832/1 - "Híbrido de Timor" denominadas de Catimor e uma em geração F<sub>2</sub> oriunda da UFV 357 - 14, introdução do CIFC H 528 (CIFC 2482 - Catuaí Amarelo com CIFC HW 26/13 - Catimor) combinação atualmente designada de "Cavimor", e da linhagem LCP 379/19 da cultivar Mundo Novo (tabela 1), foram utilizadas para a condução dos ensaios.

Tabela 1 - Progênies e linhagem de ,cafeeiros utilizadas para o estudo. ESAL, Lavras - MG, 1993.

| PROGÊNIE/<br>LINHAGEM | ORIGEM       | CAFEIEIRO<br>NO<br>UFV OU IAC | GERAÇÃO<br>ESTUDADA | DENOMINAÇÃO<br>DO<br>GERMOPLASMA |
|-----------------------|--------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| UFV 973               | CIFC H 361/1 | 349-3                         | F <sub>3</sub>      | SARCHIMOR                        |
| UFV 1075              | CIFC H 528   | 357-14                        | F <sub>2</sub>      | CAVIMOR                          |
| UFV 1603              | CIFC HW 26/5 | 395-141                       | F <sub>4</sub>      | CATIMOR                          |
| UFV 3869              | CIFC HW 26/5 | 1603-202 EP 20.1              | F <sub>5</sub>      | CATIMOR                          |
| UFV 3894              | CIFC HW 26/5 | 1603-488 EP 20.1              | F <sub>5</sub>      | CATIMOR                          |
| LCP 379-19            | -            | LCP 379-19                    | Sn                  | Mundo Novo                       |

### 3.8 Caracterização patogênica dos isolados

Foram utilizadas nestes 'experimentos plântulas nos estádios de "palito de fósforo" e "orelha de onça", frutos verdes destacados e mudas de cafeeiros com 2 pares de folhas permanentes inteiramente formadas.

#### 3.8.1 Patogenicidade em plântulas

##### 3.8.1.1. Obtenção das plântulas

As sementes das progênies de "Sarchimor", "Catimor" e "Cavimor" utilizadas para formação das mudas foram obtidas do

banco de Germoplasma de cafeeiros resistentes a ferrugem da Universidade Federal de Viçosa, com exceção das da linhagem de Mundo Novo, as quais foram obtidas junto ao Banco de Germoplasmas da ESAL.

Para a formação das mudas fez-se a pré germinação das sementes, através da distribuição das mesmas em caixas plásticas (40 cm de comprimento por 20 cm de largura e 13 cm de altura) contendo lâminas de saco de anagem esterelizadas e umedecidas, onde permaneceram até o surgimento da radícula (fase de esporinha). Em seguida as sementes pré germinadas foram repicadas para substratos acondicionados em caixas plásticas idênticas às usadas na pré germinação. O substrato, segundo recomendações de GUIMARÃES et alii (1989), foi constituído de terra de sub-solo de um latossolo roxo (700 l) misturada a esterco de curral curtido (300 l), ambos previamente peneirados e fertilizados quimicamente com 5 Kg de superfosfato simples e 0,5 Kg de cloreto de potássio. Esse substrato foi tratado com brometo de metila (quantidade = 150 ml/m<sup>3</sup>).

### 3.8.1.2 Obtenção de inóculo e técnica de inoculação

Obteve-se o inóculo de suspensão de esporos Provenientes de culturas dos isolados de Cristais (I isolado) e Uberlândia (II isolado) em BDA com 7 dias de idade. As suspensões de esporos foram preparadas colocando-se 10 ml de água destilada

e esterilizada nas placas de Petri contendo as colônias do fungo. Com o auxílio de um bisturi friccionaram-se levemente as colônias obtendo-se suspensões que foram filtradas através de uma camada dupla de gaze para eliminar os resíduos. Com a finalidade de evitar que os esporos ficassem aglomerados foi adicionado à suspensão o espalhante Tween 20, na proporção de 1 gota para 100 ml de suspensão. As concentrações das suspensões foram determinadas com um hemocitômetro. Através de diluições, ajustaram-se as suspensões para a concentração de  $2 \times 10^6$  esporos por ml, inoculando-se a seguir as plântulas, que 24 horas antes foram colocadas em câmara úmida e ausência de luz. A inoculação foi feita por meio de um atomizador De vilbiss nº 15, atomizando-se as plântulas até o ponto de escoamento; as testemunhas foram atomizadas com água destilada esterelizada. Em seguida estas plântulas foram acondicionadas em câmara úmida por 48 horas, à temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , na ausência de luz. Após este período procedeu-se a uma segunda inoculação nos mesmos padrões acima descritos.

Após o período de incubação, todas as bandejas foram mantidas em câmara de crescimento a temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , num fotoperíodo de 12 horas.

Com 15, 25 e 35 dias após a data da primeira inoculação as mudas foram individualmente avaliadas pela observação dos sintomas da doença no hipocótilo, segundo a escala de VAN DER VOSSEN et alii (1976), com modificações (tabela 2).

Tabela 2 - Critério de avaliação, do espectro de reação a *Colletotrichum* spp apresentado por plântulas de café. ESAL, Lavras - MG, 1993.

| NOTAS | SEVERIDADE/SINTOMAS                          |
|-------|--|
| 1     | Ausência de reação visível                   |
| 2     | Lesões superficiais castanhas                |
| 3     | Lesões mais profundas e escuras              |
| 4     | Lesões escuras com início de estrangulamento |
| 5     | Estrangulamento mais pronunciado             |
| 6     | plântula morta                               |

Para o teste de patogenicidade em plântulas foi seguido o delineamento experimental com blocos casualizados, onde a unidade experimental correspondeu a bandeja contendo de 20 a 30 plântulas com 3 repetições.

Foram feitas as análises de variância do índice de doença (ID), conforme fórmula proposta por Cirulli & Alexander segundo LIMA (1981).

$$ID = \frac{\sum (F \times V)}{(N \times X)} \times 100, \text{ onde}$$

ID = Índice de doença

F = Número de plântulas com determinado grau de infecção

V = Grau de infecção

N = Número total de plântulas inoculadas

X = Grau máximo de infecção

### 3.8.2 Patogenicidade em mudas

Foram utilizadas mudas das mesmas progênies ( exceto a progênie UFV-3869) e a linhagem da cultivar Mundo Novo utilizadas no teste com plantulas

Procedeu se a inoculação de mudas com 2 pares de folhas inteiramente formados. A metodologia de inoculação foi a mesma descrita no item 3 X 1.2.

O parâmetro avaliado foi o número médio de lesões formados por folha. Para tal, dois dias após a segunda inoculação foram marcadas 4 plantas por parcela, das quais foram retiradas, no 20º dia após a inoculação, o 1º par de folha inteiramente formada do ápice para a base de cada planta, para a contagem das lesões com auxílio de um contraste de foco luminoso. Para a análise estatística transformou-se os dados para  $\sqrt{X+0,5}$ .

### 3.8.3 Patogenicidade em frutos verdes destacados

Foram usados neste ensaio frutos verdes de café oriundos das mesmas plantas em estudo conforme a tabela 1. Os frutos foram lavados com detergente, colocados em um recipiente aberto e mantidos à temperatura ambiente (22 - 25°C) por dois dias. Após esse período os frutos que apresentaram lesões foram descartados. Frutos verdes e sadios foram então colocados em caixas de Gerbox previamente desinfetadas com álcool a 50% e

hipoclorito de sódio a 1%. Nas caixas Gerbox contendo areia tímica esterelizada, foram colocando**s** 25 frutos por caixa; em seguida **os** frutos foram inoculados com gotas (0,02 ml) da suspensão padronizada de esporos ( $2 \times 10^6$  esporos/ml), as quais eram depositadas na superfície dos frutos com o auxílio de uma "finepipeta", tomando-se o cuidado de não ferir a superfície do fruto; O inóculo foi preparado segundo a metodologia descrita no item 3.8.1.2.

**As** caixas contendo **os** frutos inoculados foram fechadas com tampas plásticas transparentes e colocadas em câmara climatizada com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**As** avaliações do número de frutos afetados foram feitas aos 15, 21, 28 e 35 dias após a inoculação

Para o teste de patogeniçidade em frutos verdes foi seguido o delineamento experimental com blocos casualizados, onde a unidade experimental foi a caixa de Gerbox com 25 frutos, e, **os** tratamentos, **os** isolados testados mais a testemunha constituída de frutos inoculados com água destilada esterelizada, repetidos quatro vezes. Para a análise estatística dos dados fez-se a transformação para  $\text{arc. sen } \sqrt{X+0,5/100}$ .

### 3.9 Efeito da inoculação dupla e da concentração do inóculo

Com o objetivo de avaliar se a diluição na concentração de inóculo juntamente com a inoculação dupla em

intervalo de 48 horas exercem efeito sobre o número de lesões produzidas por *C. coffeanum* em folhas jovens e maduras, montou-se um experimento adicional.

Mudas da linhagem LCP 379/19 da Cultivar Mundo Novo com 4 pares de folhas permanentes, foram utilizadas no experimento.

Procedeu-se a inoculação (como descrito no item 3.8.1.2) das mudas transplantadas em caixas plásticas (40x20x13cm), que 24 horas antes foram colocadas em câmara úmida. 48 horas após repetiu-se a inoculação nos tratamentos.

O experimento foi instalado inteiramente casualizado em casa de vegetação em um delineamento fatorial com 6 tratamentos [inoculação dupla e simples x 3 concentrações de inóculo: ( $2,5 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^5$ ;  $2,5 \times 10^4$  esporos/ml)]. Cada tratamento foi repetido 2 vezes.

O parâmetro avaliado foi o número de lesões formadas no 15º dia após a inoculação, para tal coletou-se 4 pares de folhas Jovens (1º par inteiramente formado no ápice da planta) previamente marcados (2º dia após a inoculação) de plantas distintas, das quais foram coletadas também 1 par de folhas maduras (1º par formado após as folhas cotiledonares) para a contagem das lesões. Para análise estatística dos dados fez a transformação para  $\sqrt{X+0,5}$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização morfológica dos isolados

Para a caracterização morfológica levou-se em consideração as características dos isolados em meio de cultura, as dimensões dos conídios e a morfologia dos apressórios.

#### 4.1.1 Características culturais

Em meio de 'cultura BDA os isolados oriundos de Cristais e Uberlândia apresentaram características distintas, o que possibilitou a diferenciação dos mesmos.

O isolado de Cristais apresentou micélio inicialmente claro escurecendo com o envelhecimento das colônias, tomando uma coloração cinza-esverdeada onde se produziu esporulação moderada. Vista lateralmente, as colônias apresentaram alto relevo nítido em relação ao meio. Na base da placa observou-se uma

coloração cinza-esverdeada escura, Observou-se **um** crescimento rápido, tendo aos sete dias ocorrido a total ocupação das placas, quando surgiram massas mucilaginosas de cor rosa a vermelho tijolo compostas por um grande número de conídios e desprovidas de setas, sendo **os** conídios alongados, alguns afinados em uma das extremidades, formados diretamente nas hifas. A forma perfeita *Glomerella cingulata* ((Stonem.) Spauld e Schrenk em momento algum foi observada em cultura pura.

O isolado de Uberlândia apresentou micélio inicialmente claro escurecendo também com o envelhecimento das colônias, onde produziu abundante esporulação, tomando uma coloração cinza com **um** aspecto róseo quando visto de cima. Observações laterais das colônias evidenciaram, **no** confronto com o isolado de Cristais, um relevo menos acentuado, e ausência de massa mucilaginosa de conídios com o envelhecimento da colônia. Foram constatados conídios curtos e arredondados nas duas extremidades, **não** produzidos das hifas mas sim em acérvulos com setas. A semelhança do isolado de Cristais, a forma perfeita **não** foi observada.

Em considerando as características culturais, foi fácil diferenciar **os** dois isolados em estudo.'

Baseado na literatura existente, e **nos** resultados obtidos observa-se semelhanças entre o isolado de Cristais, e a forma patogênica de *Colletotrichum coffeanum* Noack de ocorrência, nos cafezais da Africa, principalmente **no** que diz respeito à Produção de, conídios diretamente das hifas. Porém, difere em

outros aspectos como o crescimento rápido em meio de cultura e coloração cinza-esverdeada das colônias velhas, já que a forma patogênica CBD de GIBBS (1969), correspondente a de número 1 de Hindorf citado por ROSSETTI et alii (1975), apresenta crescimento lento e coloração cinza-escura.

Este isolado assemelha-se em todos os aspectos culturais ao agente da mancha manteigosa descrito por VARGAS & GONZALEZ (1972). levando a crer tratar-se do mesmo patógeno, uma vez que os sintomas produzidos em folhas também são semelhantes, porém este aspecto será discutido posteriormente.

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. oriundo de Uberlândia não se assemelha a nenhum isolado obtido na Africa nem mesmo aos da mesma espécie estudados por Hindorf citado por ROSSETTI et alii (1975).

#### 4.1.2 Dimensão dos conídios

No tabela 3 encontra-se a distribuição da porcentagem do número de conídios dentro de classes de comprimento, dos isolados monospóricos de Cristais.

Verificou-se que os isolados Cristais-1 e Cristais-2 de *C. coffeanum* apresentaram uma porcentagem de conídios com comprimento acima de 18 e 17 micra respectivamente. O comprimento médio dos conídios do isolado Cristais-1 foi de 18,18 micra e do

Tabela 3. Distribuição de frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados monospóricos de *Colletotrichum coffeanum* oriúndos de Cristais. ESAL, lavras - MG, 1993.

| ISOLADOS   | Porcentagem de conídios por      |    |    |      |      |      |      |    |     |    |     |     | Média**<br>(em micra) | CV<br>(X) |
|------------|----------------------------------|----|----|------|------|------|------|----|-----|----|-----|-----|-----------------------|-----------|
|            | classe de comprimento (em micra) |    |    |      |      |      |      |    |     |    |     |     |                       |           |
|            | 13*                              | 14 | 15 | 16   | 17   | 18   | 19   | 20 | 21  | 22 | 23  | 24  |                       |           |
| Cristais-1 | 0                                | 0  | 5  | 7    | 23   | 30   | 19   | 8  | 4   | 2  | 1   | 1   | 18,18                 | 8,97      |
| Cristais-2 | 3                                | 12 | 7  | 14   | 18   | 21   | 8    | 8  | 5   | 4  | 0   | 0   | 17,26                 | 12,90     |
| Média      | 1,5                              | 6  | 6  | 10,5 | 20,5 | 25,5 | 13,5 | 8  | 4,5 | 3  | 0,5 | 0,5 |                       |           |

\* Cada classe de comprimento agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 micra abaixo e 0,5 micra acima do número inteiro.

\*\* Média de 100 conídios.

Tabela 4. Distribuição de frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados monospóricos de *Colletotrichum gloeosporioides* oriúndos de Uberlândia. ESAL, Lavras - MG, 1993.

| ISOLADOS     | Porcentagem de conídios por      |     |      |      |      |     |    | Média**<br>(em micra) | CV<br>(X) |
|--------------|----------------------------------|-----|------|------|------|-----|----|-----------------------|-----------|
|              | classe de comprimento (em micra) |     |      |      |      |     |    |                       |           |
|              | 11*                              | 12  | 13   | 14   | 15   | 16  | 17 |                       |           |
| Uberlândia-1 | 3                                | 13  | 30   | 27   | 21   | 5   | 1  | 13,62                 | 8,71      |
| Uberlândia-2 | 0                                | 6   | 29   | 32   | 26   | 6   | 1  | 14,03                 | 7,36      |
| Média        | 1,5                              | 9,5 | 29,5 | 29,5 | 23,5 | 5,5 | 1  |                       |           |

\* Cada classe de comprimento agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 micra abaixo e 0,5 micra acima do número inteiro.

\*\* Média de 100 conídios.

isolado Cristais-2 foi de 17,26 micra e o coeficiente de variação do comprimento dos conídios desses mesmos isolados foi de 8,97% e 12,90% respectivamente. A variação do comprimento dos conídios do isolado Cristais-1 esteve entre 14,96 e 23,98 micra, já o comprimento dos conídios do isolado Cristais-2 variou entre 13,10 e 22,44 micra.

A distribuição da porcentagem do número de conídios dentro de classes de comprimento, dos isolados monospóricos obtidos do material oriundo de Uberlândia encontra-se na tabela 4.

Os dois isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram uma porcentagem de conídios com comprimento medio pouco acima de 13 micra. O comprimento medio dos conídios foi de 13,62 micra para o isolado Uberlândia-1 e 14,03 micra para o isolado Uberlândia-2, sendo o coeficiente de variação para estes isolados de 8,71% e 7,36% respectivamente. O comprimento dos conídios do isolado Uberlândia-1 evidenciou distribuição na faixa de 11,22 - 16,50 micra e os do isolado Uberlândia-2 na faixa de 11,66 - 17,66 micra.

Na tabela 5 encontra-se a distribuição da porcentagem do número de conídios dentro de classes de largura, dos isolados monospóricos obtidos de Cristais, e na tabela 6 os valores referentes aos isolados monospóricos obtidos de Uberlândia.

Foi observada uma variação de largura da ordem de 2,86 a 4,95 micra para o isolado Cristais-1 (média 3,87 micra) e de 2,64 a 6,60 micra (média 4,87 micra) para o isolado Cristais-2. O

Tabela 5. Distribuição de frequência das larguras dos conídios dos isolados monospóricos de *Colletotrichum coffeanum* oriundos de Cristais. ESAL, Lavras - MG, 1993.

| ISOLADOS   | Porcentagem de conídios por   |      |    |      |   | Média**<br>(em micra) | CV<br>(%) |
|------------|-------------------------------|------|----|------|---|-----------------------|-----------|
|            | classe de largura ( em micra) |      |    |      |   |                       |           |
|            | 3*                            | 4    | 5  | 6    | 7 |                       |           |
| cristais-1 | 20                            | 69   | 11 | 0    | 0 | 3,87                  | 12,27     |
| cristais-2 | 4                             | 34   | 35 | 2,1  | 6 | 4,87                  | 18,36     |
| Média      | 12                            | 51,5 | 23 | 10,5 | 3 |                       |           |

\* Cada classe de largura agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 micra abaixo e 0,5 micra acima do número inteiro.

\*\* Média de 100 conídios.

Tabela 6. Distribuição frequência das larguras dos conídios dos isolados monospóricos de *Colletotrichum gloeosporioides* oriundos de Uberlândia. ESAL, Lavras - MG, 1993.

| ISOLADOS     | Porcentagem de conídios por  |    |    |    | Média**<br>(em micra) | CV<br>(%) |
|--------------|------------------------------|----|----|----|-----------------------|-----------|
|              | classe de largura (em micra) |    |    |    |                       |           |
|              | 4*                           | 5  | 6  | 7  |                       |           |
| Uberlândia-1 | 34                           | 61 | 5  | 0  | 4,67                  | 10,28     |
| Uberlândia-2 | 0                            | 19 | 65 | 16 | 5,88                  | 9,02      |
| Média        | 17                           | 40 | 35 | 8  |                       |           |

\* Cada classe de largura agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 micra abaixo e 0,5 micra acima do número inteiro.

\*\* Média de 100 conídios

**coeficiente** de variação da largura dos conídios dos isolados Cristais-1 e Cristais-2 foi de 12,27% e 18,36% respectivamente.

A largura média dos conídios do isolado Uberlândia-1 foi de 4,67 micra e do isolado Uberlândia-2 5,88 micra e o coeficiente de variação foi de 10,28% e 9,02% respectivamente.

Os resultados expostos nos tabelas 3,4,5 e 6 mostram que há uma variação entre os isolados monospóricos de *C. coffeanum* e *C. gloeosporioides*. O isolado Cristais-1 apresentou conídios mais compridos e mais estreitos (média de 18,18 x 3,87 micra), ao contrário do isolado Cristais-2 que apresentou conídios mais curtos, porém mais largos (média de 17,26 x 4,86 micra). O isolado Uberlândia-1 apresentou conídios mais curtos e mais estreitos (média 13,62 x 4,67 micra) em relação ao isolado Uberlândia-2 (média 14,03 x 5,88).

Os resultados observados revelam uma diferença nas dimensões dos conídios dos dois isolados, e uma variação entre as culturas monospóricas. As dimensões dos conídios do isolado de *C. coffeanum* oriundo de Cristais se enquadram nas dimensões descritas por NOACK (1902), que determinou para a espécie uma variação de 12,5 - 19,0 x 4 - 5 micra nas dimensões dos conídios (SUTTON 1980). Os comprimentos médios dos conídios observados neste trabalho estão um pouco acima dos observados por MC DONALD (1926) para a forma patogênica CBD, as quais apresentam média de 15,1 micra, porém a largura média está abaixo do isolado da África, qual seja: 5,7 micra.

As medidas dos conídios dos isolados de Cristais estão próximas aquelas observadas por VARGAS & GONZALES (1972), em estudos sobre o agente da mancha manteigosa na Costa Rica. Os quais observaram que os conídios do fungo do gênero *Colletotrichum* agente da enfermidade mediam em média 20,5 x 4,9 micra com uma variação de 17,7 - 22,8 x 3,8 - 5,7 micra. Tal semelhança aumenta a possibilidade de que a enfermidade estudada neste trabalho seja a mancha manteigosa.

Quanto as dimensões dos conídios do isolado de *C. gloeosporioides* oriundo de Uberlândia, verificou-se estarem dentro dos limites estabelecidos por Arx citado por CARVAJAL (1987), para a espécie, quais sejam: conídios em média de 12 - 19 micra de comprimento por 1 - 6 micra de largura.

Apesar da variação nas dimensões entre os isolados monospóricos dos dois isolados, não houve variação quanto as características culturais dos referidos isolados. Tal variação foi observada por LIMA (1981) em seus estudos com isolados monospóricos de *C. gossypii* South Var. *cephalosporioides* A. S. Costa obtidos de lesões de ramulose de algodoeiro.

Pelos valores de coeficiente de variação calculados, nota-se que há uma variação grande no comprimento e na largura dos conídios dos isolados estudados especialmente para o isolado de Cristais (*C. coffeanum*). Tal observação foi feita por RAYNER (1952) para a forma patogênica CBD (*virulans*) no Quênia.

#### 4.1.3 Morfologia dos apressórios

Quanto a morfologia de apressórios **não** houve diferença entre **os** isolados de Cristais e Uberlândia.

A germinação dos conídios foi observada **24** horas após a suspensão dos mesmos em água. **Logo** após a germinação evidenciou-se a formação dos apressórios. Estes apareceram diretamente **nos** conídios ou em ramificações secundários do tubo germinativo ou ainda diretamente **nos** tubos germinativos. Verificou-se a formação de um ou dois apressórios **no** mesmo conídio, a formação de um apressório e um tubo germinativo sem apressório e também a formação de apenas um ou dois tubos germinativos **no** mesmo conídio.

Quanto a forma **os** apressórios apresentaram-se arredondados, um pouco clavados ou lobados, quando vistos de cima: Vistos de lado tinham formato de taça. **No** início da formação **os** apressórios eram hialinos e, posteriormente, adquiriam uma coloração marrom.

**Os** apressórios de *C. coffeanum* oriundo do material do município de Cristais foram muito semelhantes **aos** de *C. gloeosporioides* oriundo de material de Uberlândia, porem houve a formação de um número menor de apressórios **no** isolado de Cristais. **Não** foi observada alguma característica marcante que pudesse diferenciar **os** dois isolados. SUTTON, (1968) encontrou em seus estudos diferenças marcantes entre **os** apressórios de dois

isolados de *C. graminicola*, fato não ocorrido neste trabalho. Segundo SKOROPAD (1967), a maioria das espécies do gênero *Colletotrichum* forma apressórios, e, suas características morfológicas e a fisiologia de sua formação é influenciadas pela presença de nutrientes e por estímulos de contato.

Pelas características morfológicas estudadas neste trabalho foi possível a diferenciação dos dois fungos, exceto pelas características morfológicas dos apressórios. Segundo LIMA (1981) somente as características morfológicas são insuficientes para a caracterização de espécies e raças, havendo a necessidade de se realizar testes de patogenicidade para evidenciar tais diferenças.

#### 4.2 Efeito do cobre sobre o crescimento micelial

Os resultados do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos quatro isolados monospóricos dentro de cada concentração do fungicida oxicloreto de cobre, encontram-se na tabela 7. Observa-se que em todas as concentrações do produto houve uma reação diferenciada dos isolados ao nível de 5% de Probabilidade pelo teste de Tukey. Na maioria das concentrações, inclusive na testemunha o isolado Cristais-1 apresentou um IVCM Superior aos demais, sendo igual ao isolado Uberlândia-2 na concentração de 5ppm e aos isolados Uberlândia-1 e Uberlândia-2 nas dosagens de 20 e 30ppm. Em todas as dosagens do produto,

abela 7 - Índice medio de velocidade de crescimento micelial de culturas monospóricas de *Colletotrichum* sob diferentes concentrações do fungicida Oxícloreto de cobre em meio de cultura. **ESAL**, Lavras - MG, 1993'.

| SOLADOS       | DOSES (ppm) |         |        |         |        |        |         |
|---------------|-------------|---------|--------|---------|--------|--------|---------|
|               | 0           | 2,5     | 5      | 10      | 20     | 30     | 100     |
| ristais - 1   | 2,22 a      | 2,02 a  | 2,17 a | 2,27 a  | 2,11 a | 2,05 a | 1,04 a  |
| ristais - 2   | 1,12 c      | 1,09 c  | 1,13 c | 1,13 c  | 1,05 b | 1,10 b | 0,00 c  |
| berlândia - 1 | 1,82 b      | 1,52 b  | 1,55 b | 1,85 b  | 1,95 a | 1,93 a | 0,75 b  |
| berlândia - 2 | 1,77 b      | 1,82 ab | 2,13 a | 2,04 ab | 2,00 a | 1,87 a | 0,81 ab |

As medias seguidas das mesmas letras nas colunas **não** apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey a **5%**.

Inclusive na testemunha o isolado Cristais-2 apresentou um IVCM estatisticamente inferior aos demais. Nas dosagens de 2.5, 5, 10 e 100ppm o isolado Uberlândia-2 apresentou um IVCM ligeiramente superior ao isolado Uberlândia-1.

Pelos resultados expostos nota-se uma diferença entre os isolados monospóricos em todas as concentrações do produto, principalmente entre os isolados Cristais-1 e Cristais-2, diferença esta evidenciada também na dimensão dos conídios dos referidos isolados.

Para a comparação das concentrações do fungicida dentro

de cada isolado monospóricó foi realizado a análise de regressão. A figura 1 mostra as curvas referentes aos quatro isolados, as quais são representadas por equações de segundo grau. Para o isolado Cristais-1 até a dosagem de 30ppm não houve inibição do crescimento micelial, entretanto na dosagem de 100ppm houve uma redução do crescimento pela metade. Tal efeito segue a equação de regressão estimada  $Y = 9.3896 + 0.0019X - 0.0002X^2$  com  $R^2 = 0.97$ . Para o isolado Cristais-2 o comportamento foi semelhante ao Cristais-1, ou seja, apenas a dosagem maior (100ppm) foi capaz de inibir o crescimento micelial, porém nesta, a inibição foi total. Este comportamento foi explicado pela equação de regressão estimada  $Y = 7.2683 + 0.0092X - 0.0004X^2$  com  $R^2 = 0.99$ . O crescimento micelial do isolado Uberlândia-1 também somente foi inibido na dosagem de 100ppm, sendo este efeito explicado pela equação de regressão estimada  $Y = 8.3724 + 0.0380X - 0.0006X^2$  com  $R^2 = 0.93$ . O isolado Uberlândia-2 apresentou um comportamento semelhante aos demais isolados. Quando comparado ao outro isolado monospóricó de *C. gloeosporioides* este isolado apresentou um crescimento ligeiramente superior nas dosagens de 2.5, 5, e 10ppm. O efeito do crescimento micelial desse isolado nas dosagens do produto é explicado pela equação de regressão estimada  $Y = 8.9091 + 0.0140X - 0.0004X^2$  com  $R^2 = 0.95$ .

## Índice de velocidade de crescimento micelial

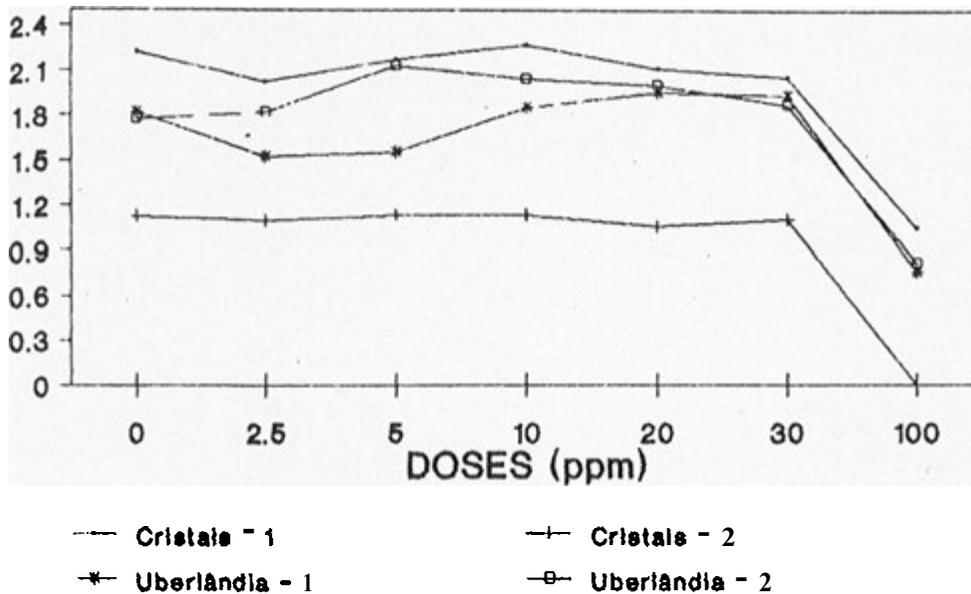


Figura 1. Efeito do fungicida Oxicleto de cobre sobre o crescimento micelial dos quatro isolados monospóricos

O efeito do cobre "in vitro" sobre *C. coffeanum* foi estudado por HOCKING (1967), onde ele avaliou o efeito da solução de cobre nas dosagens de 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 e 16 ppm sobre a germinação dos conídios. A germinação foi reduzida a 86% na dosagem de 0.5 ppm e, a 35% na dosagem de 1 ppm e a 0% nas demais dosagens. No presente estudo houve a produção de conídios até a dosagem de 30 ppm, porém não foi estudado o efeito do cobre sobre a germinação dos conídios.

Pelos resultados obtidos neste estudo **não** foi possível determinar com precisão se **os** isolados estudados, especialmente o de *C. coffeanum* apresentaram adaptabilidade quando na presença de cobre, porém esta hipótese não está destacada, uma vez que na dosagem de 100ppm **os** isolados estudados, com exceção do isolado Cristais-2, formaram clamidosporos. Tal fato **nos** sugere que, poderia haver uma possível germinação destes clamidosporos **no** campo, seguido de pulverizações cúpricas, propiciando o surgimento de isolados tolerantes ao produto. Fato que provavelmente ocorreu com a CBD na África (FURTADO, 1969 e GRIFFITHS, 1972).

### 4.3 Patogenicidade dos isolados

Para **os** testes de patogenicidade **não foram** utilizados os mesmos isolados **monospóricos estudados** nos testes anteriores, uma vez que estes perderam a patogenicidade. Procedeu-se então a novos reisolamentos.

#### 4.3.1 Patogenicidade em plântulas

Os resultados dos Índices médios de doença (ID) calculados para as progênies inoculadas com água, *C. coffeanum* e *C. gloeosporioides* aos 15, 25, e 35 dias após a inoculação encontram-se **no** tabela 8.

Foi constatado através da análise de variância efeito significativo para **os** tratamentos.

Decorridos **15** dias da inoculação já se observou **nos** tratamentos em que as progênies e a linhagem foram inoculadas com **os** dois isolados, Índices de doença superiores **As** testemunhas, embora não tenha havido diferença estatística pelo teste de Tukey a **5%** de probabilidade.

Efeito significativo foi observado aos **25** dias após a inoculação. **As** progênies **UFV 1603** e **UFV 3894** (Catimor **F<sub>4</sub>** e **F<sub>5</sub>** respectivamente) apresentaram um índice de doença superior as demais, quando inoculadas com *C. coffeanum*, com uma ligeira superioridade para a progênie da geração **F<sub>4</sub>**. O isolado de *C. coffeanum* induziu quase sempre índices de doença superiores as testemunhas e *C. gloeosporioides*. Este último se igualou a testemunha nas progênies **UFV 1075** (Cávimor), **UFV 973** (Sarchimor) e **na** linhagem da cultivar Mundo Novo, somente se igualando ao isolado de *C. coffeanum* na progênie **UFV 3869** (Catimor **F<sub>4</sub>**).

Comportamento semelhante aos **25** dias após a inoculação foi observado aos **35** dias, com algumas alterações. A progênie **UFV 3869** inoculada com *C. coffeanum* apresentou-se estatisticamente superior **As** demais. Já a progênie **UFV 1603** que aos **25** dias apresentou índice de doença superior as demais, aqui se mostrou semelhante;

Todas as progênies testadas mostraram-se suscetíveis **aos** dois isolados, especialmente ao isolado, de *C. coffeanum*.

Tabela 8 - Índice médio de doença (X), em ensaio sobre a patogenicidade dos isolados em plântulas de cafeeiros, ESAL, Lavras - MG, 1993.

| TRATAMENTOS |                         | ÍNDICE DE DOENÇA (X) |           |         |      |
|-------------|-------------------------|----------------------|-----------|---------|------|
|             |                         | 15 DIAS              | 25 DIAS   | 35 DIAS |      |
| 1           | UFV-1075 (Controle)     | 16,67 a              | 16,67 c   | 16,67   | e    |
| 2           | UFV-973 (Controle)      | 16,67 a              | 16,67 c   | 16,67   | e    |
| 3           | UFV-1603 (Controle)     | 16,67 a              | 16,67 c   | 16,67   | e    |
| 4           | UFV-3869 (Controle)     | 16,67 a              | 16,67 c   | 16,67   | e    |
| 5           | UFV-3894 (Controle)     | 16,67 a              | 16,67 c   | 16,67   | e    |
| 5           | Mundo Novo (Controle)   | 16,67 a              | 16,67 c   | 16,67   | e    |
| 7           | UFV-1075 (I isolado*)   | 17,36 a              | 24,44 abc | 29,86   | bode |
| 8           | UFV-973 (I isolado)     | 18,89 a              | 25,99 abc | 27,37   | cde  |
| 9           | UFV-1603 (I isolado)    | 21,04 a              | 37,56 a   | 31,93   | bcd  |
| 10          | UFV-3869 (I isolado)    | 19,45 a              | 24,77 abc | 47,35   | a    |
| 11          | UFV-3894 (I isolado)    | 21,93 a              | 37,46 ab  | 42,46   | ab   |
| 12          | Mundo Novo (I isolado)  | 22,95 a              | 28,87 abc | 25,09   | cde  |
| 13          | UFV-1075 (II isolado**) | 17,39 a              | 20,97 c   | 20,00   | cde  |
| 14          | UFV-973 (II isolado)    | 19,93 a              | 21,23 c   | 21,25   | cde  |
| 15          | UFV-1603 (II isolado)   | 19,04 a              | 22,42 bc  | 26,72   | cde  |
| 16          | UFV-3869 (II isolado)   | 18,98 a              | 23,23 abc | 33,33   | abcd |
| 17          | UFV-3894 (II isolado)   | 19,94 a              | 22,97 abc | 34,57   | abc  |
| 18          | Mundo Novo (II isolado) | 18,47 a              | 21,31 c   | 18,78   | de   |

As medias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

\* *C. coffeanum* \*\* *C. gloeosporioides*

Este no entanto não apresentou severidade comparável ao da CBD, a qual em 20 dias induz morte total em plântulas susceptíveis (VAN DER VOSSEN et alii, 1976). A linhagem da cultivar Mundo Novo apresentou um índice de doença inferior as demais. Este fato é relevante uma vez que, foi em uma linhagem desta cultivar constatada a presença de *C. coffeanum* no município de Cristais, o que mostra fragilidade das progênies e linhagem testadas quanto a resistência à fungos do gênero *Colletotrichum*, o que pode limitar o uso deste material em futuros programas de melhoramento visando resistência à fungos do referido gênero. RODRIGUES et alii (1992), também observaram susceptibilidade em progênies de Sarchimor, Catimor e Mundo Novo, quando inoculadas com isolados que causam a CBD. Sendo que a progênie de Mundo Novo foi susceptível aos isolados de Malawi e Angola, e resistente ao isolado do Quênia, fato que os autores atribuem a existência de raças fisiológicas de *C. coffeanum*.

#### 4.3.2 Patogenicidade em frutos verdes destacados

As porcentagens medias de frutos verdes infectados aos 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação com os dois isolados e água encontram-se na tabela 9.

Nota-se uma maior porcentagem de frutos afetados aos 14 dias após a inoculação da progênie UFV 973 (Sarchimor), com uma ligeira superioridade para os frutos inoculados com *C.*

Tabela 9 - Porcentagem media de frutos afetados em ensaio sobre a patogenicidade dos isolados sobre frutos verdes, ESAL, Lavras - MG, 1993.

| TRATAMENTOS                | % DE FRUTOS AFETADOS |           |            |           |
|----------------------------|----------------------|-----------|------------|-----------|
|                            | 14 DIAS              | 21 DIAS   | 28 DIAS    | 35 DIAS   |
| 1 UFV-1075 (Controle)      | 0,00 b               | 0,00 e    | 0,00 f     | 0,00 e    |
| 2 UFV-973 (Controle)       | 0,00 b               | 0,00 e    | 0,00 f     | 0,00 e    |
| 3 UFV-1603 (Controle)      | 0,00 b               | 0,00 e    | 0,00 f     | 0,00 e    |
| 4 UFV-3869 (Controle)      | 0,00 b               | 0,00 e    | 0,00 f     | 0,00 e    |
| 5 UFV-3894 (Controle)      | 0,00 b               | 0,00 e    | 0,00 f     | 0,00 e    |
| 6 Mundo Novo (Controle)    | 0,00 b               | 0,00 e    | 0,00 f     | 0,00 e    |
| 7 UFV-1075 (I isolado*)    | 6,41 ab              | 16,96 ab  | 28,33 abc  | 35,56 b   |
| 8 UFV-973 (I isolado)      | 13,70 a              | 21,56 ab  | 33,88 ab   | 59,61 a   |
| 9 UFV-1603 (I isolado)     | 7,15 ab              | 11,22 abc | 14,91 bcde | 23,63 bc  |
| 10 UFV-3869 (I isolado)    | 5,91 ab              | 11,72 abc | 18,79 bcd  | 27,18 bc  |
| 11 UFV-3869 (I isolado)    | 2,63 ab              | 6,68 bcde | 12,67 cde  | 15,16 cd  |
| 12 Mundo Novo (I isolado)  | 0,63 b               | 2,67 cde  | 8,82 de    | 15,60 bcd |
| 13 UFV-1075 (II isolado**) | 2,67 ab              | 3,19 cde  | 11,22 cde  | 21,89 bc  |
| 14 UFV-973 (II isolado)    | 14,86 a              | 25,78 a   | 48,98 a    | 70,61 a   |
| 15 UFV-1603 (II isolado)   | 6,67 ab              | 8,70 abcd | 10,54 cde  | 15,54 cd  |
| 16 UFV-3869 (II isolado)   | 11,22 a              | 19,25 ab  | 26,58 abc  | 32,36 bc  |
| 17 UFV-3894 (II isolado)   | 5,13 ab              | 11,45 abc | 17,40 bcd  | 21,07 bc  |
| 18 Mundo Novo (II isolado) | 0,00 b               | 0,63 de   | 3,39 f     | 4,94 de   |

medias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

\* *C. coffeanum* \*\**C. gloeosporioides*

*gloeosporioides*. Tal observação se repetiu nas outras leituras chegando próximo a **71%** de infecção aos **35** dias após a inoculação. As demais progênes apresentaram graus intermediários de infecção com destaque para a progênie UFV **1075** (Cavimor), porem nesta o isolado de *C. coffeanum* se mostrou mais agressivo. A linhagem de Mundo **Novo** apresentou em todas as leituras um menor porcentagem de frutos infectados, a exemplo do que ocorreu **no** teste de inoculação em plântulas. As progênes de Catimor apresentaram uma menor porcentagem de frutos infectados que as demais, efeito contrário ao ocorrido **no** teste com plântulas.

As lesões formadas sobre **os** frutos foram superficiais, não atingindo **os** tecidos internos **dos** mesmos, comportamento verificado também por VARGAS & GONZALEZ (1972) em seus estudos de inoculação de frutos verdes com *Colletotrichum* sp, agente da mancha manteigosa na Costa Rica. Tal fato, aliado a uma patogenicidade semelhante entre **os** dois isolados aqui estudados, reforça a hipótese de que o isolado de *C. coffeanum* não seja agente da CBD. **Os** resultados obtidos foram superiores aos obtidos por FEITOSA et alii (1977), que obtiveram um máximo de **23%** de frutos afetados em seus estudos com **70** isolados de *Colletotrichum* obtidos de ramos e frutos de cafeeiros.

As progênes de Catimor, Sarchimor e Cavimor e a cultivar de Mundo Novo testadas se mostraram todas susceptíveis aos dois isolados, a exemplo do que ocorreu **no** teste com plântulas. Portanto a mesma consideração sobre futuros trabalhos

em melhoramento pode ser feita, uma vez que o teste com frutos verdes destacados é uma das formas mais confiáveis de se avaliar a resistência (BOCK, 1956).

#### 4.3.3 Patogenicidade em mudas

O isolado de *C. gloeosporioides* não se mostrou patogênico a nenhuma das progênies e linhagem testadas na fase de muda. Já, o isolado de *C. coffeanum* induziu o aparecimento de lesões nas folhas, o que possibilitou a quantificação das mesmas. Estas lesões se iniciam por pequenos pontos não necróticos sobre a epiderme superior das folhas jovens, a qual fica ligeiramente deprimida, mais facilmente visível em contraste de luz. Sintomas estes idênticos aos descritos por VARGAS & GONZALEZ (1972), para a mancha manteigosa. Este fato, que acrescido das observações morfológicas, nos leva a crer que o isolado de *C. coffeanum* aqui estudado é agente da mancha manteigosa.

Na tabela 10 está representada a análise estatística dos dados referentes ao número medio de lesões formadas por folha nas progênies e na linhagem testadas. Nota-se que todas as progênies apresentaram um grande número de lesões por folha, com destaque para a progênie UFV 1603 (Catimor F<sub>4</sub>), que, foi estatisticamente superior as demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A linhagem de Mundo Novo apresentou um número de lesões por folha bem próximo a progênie

Tabela 10. Número medio de lesões por folha em teste de patogenicidade com *Colletotrichum coffeanum*, ESAL, lavras - MG, 1993.

| PROGÊNIE/LINHAGEM         | LESÕES POR FOLHA |
|---------------------------|------------------|
| 1 - UFV-1075              | 19,70 c          |
| 2 - UFV-973               | 24,64 bc         |
| 3 - UFV-1603              | 43,91 a          |
| 4 - UFV-3894              | 37,50 ab         |
| 5 - Mundo Novo LCP 379/19 | 37,26 ab         |

As medias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

UFV 1603, o que confirma a susceptibilidade desta cultivar ao patógeno em estudo, na qual foi constatada a presença da enfermidade.

Os valores obtidos estão próximos aos obtidos por VARGAS & GONZALES (1972), em seus estudos com o agente da mancha manteigosa.

Os resultados expostos confirmam as observações feitas anteriormente, com relação a susceptibilidade das progênies e da cultivar testadas à *C. coffeanum*.

#### 4.4 Efeito da inoculação dupla e da concentração do inóculo

O efeito da inoculação dupla dentro de cada

concentração de inóculo para folhas jovens e velhas encontra-se na tabela 11. Nota-se que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre a inoculação dupla após 48 horas e inoculação simples para as três concentrações de inóculo, tanto para folhas jovens como para folhas velhas.

Tabela.11. Número medio de **lesões** formadas por folha jovens e velhas inoculadas com três concentrações de *C. coffeanum* com e sem inoculação dupla, ESAL, Lavras - MG, 1993.

| TIPO DE INOC. | NÚMERO MÉDIO DE LESÕES POR FOLHA |                   |                   |                   |                   |                   |
|---------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|               | FOLHAS JOVENS                    |                   |                   | FOLHAS VELHAS     |                   |                   |
|               | $2,5 \times 10^6$                | $2,5 \times 10^5$ | $2,5 \times 10^4$ | $2,5 \times 10^6$ | $2,5 \times 10^5$ | $2,5 \times 10^4$ |
| SIMPLES       | 79,01 a                          | 101,76 a          | 54,07 a           | 21,19 a           | 26,44 a           | 12,88 a           |
| DUPLA         | 114,01 a                         | 81,32 a           | 69,07 a           | 24,44 a           | 15,01 a           | 16,31 a           |

As medias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

A figura 2 ilustra o efeito da concentração dentro dos tratamentos com e sem inoculação dupla após 48 horas, para folhas jovens. O tratamento que não recebeu a inoculação dupla apresentou um número maior de lesões por folha na concentração de  $2,5 \times 10^5$ . Tal efeito segue a equação de regressão estimada  $Y = 44,6532 - 11,0268 X + 1,4356 X^2$  com  $R^2 = 1,0$ . Para o tratamento que recebeu a inoculação dupla houve uma tendência de diminuição

do número de lesões com a diminuição da concentração, porém o efeito segue a equação de regressão de segundo grau estimada  $Y = -123,0816 + 58,5822 X - 5,6551 X^2$  com  $R^2 = 1,0$ , pois nas duas concentrações mais baixas os valores estiveram bastante próximos.

O efeito da concentração dentro dos tratamentos com e sem inoculação dupla após 48 horas para folhas velhas está ilustrado na figura 3. Comportamento semelhante ao ocorrido com folhas jovens foi observado nas folhas velhas. O tratamento que recebeu a inoculação dupla apresentou um menor número de lesões quando na concentração de  $2,5 \times 10^6$ . Tal efeito é explicado pela equação de regressão estimada  $Y = -68,1108 + 31,6245 X - 3,0181 X^2$  com  $R^2 = 1,0$ . Já o tratamento que não recebeu a inoculação dupla apresentou um máximo em número de lesões na concentração de  $2,5 \times 10^5$ . Este comportamento é explicado pela equação de regressão estimada  $Y = 45,5738 - 15,2761 X + 1,6689 X^2$  com  $R^2 = 1,0$ .

Os resultados expostos revelaram que a inoculação dupla induziu um maior número de lesões por folhas nas concentrações de  $2,5 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^4$  esporos por mililitro. Na concentração de  $2,5 \times 10^5$  esporos por mililitro, o tratamento que não recebeu inoculação dupla foi sempre superior ao que recebeu.

BOCK (1956), em estudos com o agente da CBD demonstrou que em suspensões onde os esporos são muitos numerosos, a porcentagem de germinação é reduzida, sendo que o ótimo de germinação foi obtido com concentrações entre  $10^5$  e  $10^6$  esporos por mililitro.

## Folhas jovens

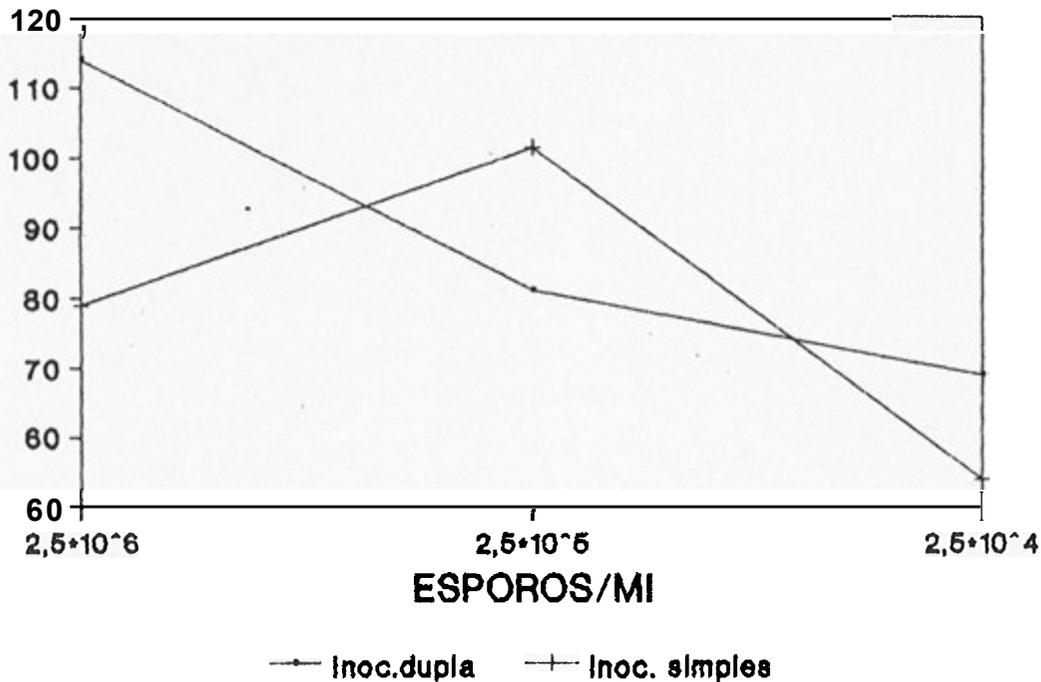


Figura 2. Efeito da concentração de inóculo sobre o número medio de lesões formadas em folhas jovens com inoculação simples e dupla de *C. coffenaum*

Os resultados obtidos no tratamento em que não foi realizada a inoculação 'dupla, tanto em folhas jovens como em folhas velhas, corroboram com os de **BOCK**, uma vez que na concentração de  $2,5 \times 10^5$ , foi obtido um maior número de lesões por folha do que nas outras duas concentrações. Porém quando efetuou-se a inoculação dupla efeito inverso foi observado.

## Folhas velhas

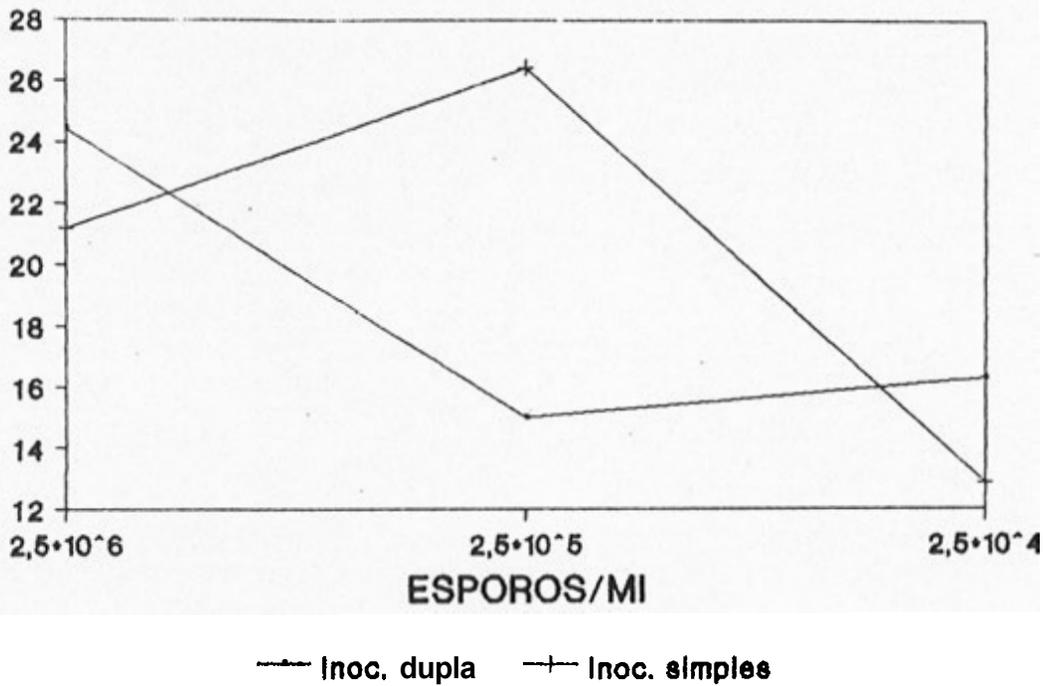


Figura 3. Efeito da concentração de inóculo sobre o número medio de lesões formadas em folhas velhas com inoculação simples e dupla de *C. coffeanum*

## 5. CONCLUSÕES

1. O isolado de *Colletotrichum coffeanum* Noack apresenta algumas características morfológicas idênticas às do agente da CBD, porém **não** se trata do variante "virulans".
2. O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. é morfológicamente semelhante às formas comumente encontradas **no** Brasil e diferente das formas da mesma espécie presentes **nos** cafezais da Africa.
3. A morfologia dos apressórios **não foi** um bom parâmetro morfológico para a caracterização dos isolados.
4. Todos dois isolados se mostraram tolerantes às dosagens de cobre testadas, necessitando de maiores estudos para se chegar **a** resultados definitivos sobre o comportamento dos mesmos em relação a esse produto.

5. Todas as progênies e a linhagem testadas se mostraram suscetíveis tanto em plântulas como em frutos verdes aos isolados testados; evidenciando a fragilidade desse material com relação a resistência à fungos do gênero *Colletotrichum*, o que pode limitar a sua utilização em futuros programas de melhoramento visando a resistência ao referido fungo.

6. O isolado de *Colletotrichum coffeanum* estudado é agente da mancha manteigosa.

## 6. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos a caracterização morfológica e averiguação da patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de regiões cafeeiras do Estado de Minas Gerais, bem como verificar o comportamento dos mesmos quando submetidos ao crescimento em meio de cultura contendo concentrações crescentes (0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 100ppm) de fungicida cúprico, a fim de se estabelecer um confronto com os dados contidos na literatura sobre a estirpe patogênica agente da CBD presente nos cafezais da Africa.

Os dois isolados apresentaram crescimento micelial e esporulação normal até a concentração de 30ppm, diminuindo somente a 100ppm, onde não houve formação de conídios, havendo no entanto a formação de clamidosporos.

O isolado identificado como *C. coffeanum* apresentou produção de conídios a partir de hifas e colônias de coloração cinza-esverdeada, características que se assemelham às do agente

da CBD descritas por MC DONALD (1926).

Para o teste de patogenicidade dos isolados procedeu-se a inoculação dos mesmos em plântulas, mudas e frutos verdes de cinco progênies originadas do Híbrido do Timor provenientes do Banco de Germoplasmas da Universidade Federal de Viçosa e mais uma linhagem da cultivar Mundo Novo proveniente do Banco de Germoplasmas da ESAL. Nenhuma das progênies e linhagem testadas mostraram-se resistentes aos isolados dos dois fungos, o que põe em dúvida a possibilidade de utilização desse material em futuros programas de melhoramento visando resistência à fungos do gênero *Colletotrichum*.

*C. coffeanum* não apresentou patogenicidade superior a *C. gloeosporioides* em frutos verdes destacados, o que nos leva a concluir não tratar-se da estirpe patogênica CBD presente nos cafezais da Africa. Este isolado é agente da mancha manteigosa, uma vez que em teste de inoculação em mudas induziu o surgimento de lesões típicas desta enfermidade nas folhas dos cafeeiros.

Em ensaio adicional avaliou-se a inoculação dupla após 48 horas da primeira, em três concentrações de inóculo ( $2,5 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^4$  conídios por mililitro) do isolado de *C. coffeanum*. Quando não se efetuou a inoculação dupla a concentração que induziu maior número de lesões por folha foi a de  $2,5 \times 10^5$  conídios por mililitro.

## 7. SUGESTOES

Com base neste trabalho evidencia-se a necessidade de maiores estudos envolvendo isolados de *Colletotrichum coffeanum*. Sugere-se trabalhar com diversas concentrações de inóculo, procurando-se desta maneira relacionar o ocorrido na concentração de  $2,5 \times 10^6$  esporos/ml com a existência de resistência induzida.

## 8. SUMMARY

The main objectives of the present work were the morphological characterization and investigation of the pathogenicity of *Colletotrichum* sp strains in coffee growing regions of Minas Gerais, as well to verify the behavior of themselves when subject to growth in culture medium containing growing concentrations (0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 100ppm) of copper fungicide, in order to establish a comparison with the data obtained in the literature about the pathogenic strain, agent of CBD present in Africa's coffee plantations.

The two strains showed both mycelial growth and normal sporulation up to concentration of 30ppm, decreasing only at 100ppm, where there was no conidial formation, occurring, nevertheless, formation of chlamydospores.

The strain identified as *C. coffeanum* presented conidial production from hyphae and grey-greenish colored colonies, with characteristics resembling those of the CBD agent described by MC DONALD (1926).

For the pathogenicity test of the strains, the inoculation of themselves was performed in seedlings, cuttings and green berries of five progenies from Timor Híbrido, proceeding from the Germoplasm Bank of the Universidade Federal de Viçosa, and a further line of Mundo Novo cultivar proceeding from the ESAL Germoplasm Bank. None of these progenies and line tested revealed themselves resistant to the two strains of the two fungi, which arraigns the possibility to utilize that material in future breeding programs, objectiving resistance to *Colletotrichum* genus fungi.

*C. coffeanum* did not show pathogenicity superior to *C. gloeosporioides* in detached green berries, which led us to conclude that it is not related to the CBD pathogenic strain present in Africa's coffee plantations. This strain is the agent of blister spot, and once under inoculation test in cuttings, it induced the development of typical lesions in coffee tree leaves.

In an additional trial, the double inoculation was evaluated after 48 hrs from the first one, in three concentrations of inoculum ( $2,5 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^5$  and  $2,5 \times 10^4$  conidia per ml) of the strain of *C. coffeanum*. When the double inoculation was not undertaken, the concentration which induced greatest number of lesions per leaf was that of  $2,5 \times 10^5$  conidia per ml.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, S. R.; MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. & MULLER, R. A.  
Observações preliminares sobre queda dos frutos sob suspeita de ataque por *Colletotrichum* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAPEEIRAS, 7, Araxá, 1983, Resumos... Rio de janeiro, IBC, 1983. P.323-6.
2. AVILES, D. P.; MATIELLO, J. B.; PINHEIRO, M. R. & MANSK, Z.  
Diversos graus de resistência do café conilon à mancha manteigosa em condições de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAPEEIRAS, 10. Poços de **Caldas**, 1983, Resumos... Rio de janeiro, IBC, 1983. p.317.
3. BETTENCOURT, A. J. Melhoramento genético do cafeeiro.  
Transferência de fatores de resistência a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabia* L. Lisboa, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, 1981. 93p. (Tese de Doutorado).

4. BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. O Biológico, São Paulo, **14:191-201**, 1958.
5. BOCK, K. R. Investigations on coffee berry disease: laboratory studies. East African Agricultural Journal, Nairobi, **22:97-103**, 1956.
6. CARVAJAL, B. P. Caracterização morfológica, fisiológica e patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu ARX (1957), causadores de podridões de frutos. Piracicaba, ESALQ, 1987. **108p.** (Tese MS).
7. CARVALHO, A. ; MONACO, L. C. & VAN DER VOSSEN, H. A. M. Resistência do cafeeiro ao *Colletotrichum coffeanum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, **6**, Ribeirão Preto, 1978. Resumos... Rio de Janeiro, IBC, 1978. **P.28-9**.
8. DUDIENAS, C. Caracterização morfológica, auxanográfica e patogênica de *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* South, var. *Cephalosporioides* Costa & Fraga Jr. Piracicaba, ESALQ, 1990. **67p.** (Tese MS).
9. FEITOSA, M. I.; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V. & LEITE, Y. R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, **44** (1/2):33-54, 1977.

10. FIGUEIREDO, M. B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. O Biológico, São Paulo, 33:9-13, 1967.
11. FIRMAN, I. D. Screening of coffee for resistance to Coffee berry disease. East African Agricultural Journal, Nairobi 29:192-4, 1964.
12. FURTADO, I. J. M. Effect of copper fungicides on the occurrence of the pathogenic form of *Colletotrichum coffeanum*. Transaction of the British Mycological Society, London, 53:325-8, 1969.
13. GIBBS, J. N. Inoculum sources for coffee berry disease. Annals of Applied Biology. London, 64:515-22, 1969.
14. GRIFFITHS, E. Negative effects of fungicides in coffee Tropical Science, London 14:79-89, 1972.
15. GUIMARÃES, P. T. G. ; CARVALHO, M. M. ; MENDES, A. N. G. & BARTHOLO, G. F. Café, Normas e Coeficientes Técnicos. Produção de mudas de café: Coeficientes técnicos da fase de viveiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 14(162):5-10, 1989.

16. HOCKING, D. Direct effects of copper upon *Colletotrichum coffeanum* Noack. Pans., London 13(2):163-7, 1961.
17. .... Disease resistance in coffee berries. I. Preliminary notes and observations. East African Agricultural and Forestry Journal, Nairobi 32:365-6, 1968.
18. KRANZ, J. Pesquisa sobre a disseminação e o controle da antracnose do cafeeiro na Etiópia. Plant Research and Development, Tübingen 27:105-14, 1988.
19. LIMA., E. F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *Cephalosporioides* A. S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. Viçosa, UFV, 1981. 47p. (Tese MS).
20. MC DONALD, J. A preliminary account of disease green coffee berries in Kenya colony. Transaction of the British Mycological Society, London 2:145-54, 1926.
21. 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, Guarapari, 1977. Resumos... Rio de Janeiro, IBC, 1977. p.172-3.

22. MULINGE, S. K. & GRIFFITHS, E. Effects of fungicides on leaf rust, berry disease, foliation and yield of coffee. Transaction of the British mycological Society. London 62:495-507, 1974.
23. NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. Boletim Agricola, São Paulo, 1902.
24. NUTMAN, P. J. Coffee berry disease. Pans, London, 16:227-86, 1970.
25. ----- & ROBERTS, F. M. The stimulating effect of some fungicides on *Glomerella cingulata* in relation to the control of coffee berry disease. Annals of Applied Biology, London 64:335-44, 1969.
26. OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). Lavras, ESAL, 1991. 111p. (Tese MS).
27. PEREIRA, A. A. & CHAVES, G. M. Antracnose do cafeeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 4(44):82-90, 1978.

28. RAYNER, R. W. Coffee berry disease - A survey of investigations carried out up to 1950. East African Agricultural Journal, Nairobi **17:130-58**, 1952.
29. RODRIGUES Jr . C. J.; VARZEA, V. M. P.; HINDORF, H.; MEDEIROS, E. F. Strains of *Colletotrichum coffeanum* Noack causing coffee Berry Disease in Angola and Malawi with characteristics different to the Kenya Strain. Journal of Phytopathology, Berlin. **131:205-9**, 1991.
30. ----- . ----- MEDEIROS. E. F. Evidence for the existence of physiological races of *Colletotrichum coffeanum* Noack Sensu Hindorf Kenya coffee, Nairobi, **57(672):1417-20**, 1992.
31. ROSSETTI, V.; FICHTENBERGUER, E.; FEITOSA, M. I. A doença dos frutos do cafeeiro denominada "coffee berry disease" (CBD) - Revisão Bibliográfica. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, **42:265-84**, 1975.
32. SKOROPAD, W. P. Effect of the temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form a pressoria and penetrate barley leaves. Canadian Journal Science Edmonton, **47:431-4**, 1967.

33. SUTTON. B. C. The apressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, **46:873-76, 1968.**
34. ----- The Coelomycoetes, fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Surrey, 1980. 696p.
35. SUTTON. B. C. *Colletotrichum dematium* (Pers ex Fr.) Grove and *C. trichellum* (Fr ex Fr.) Duke. Transaction British Mycological Society, London, **45:222-232, 1962.**
36. VAN DER VOSSEN, H A M. ; COOK, R. T. A. & MURAKURO, N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noack (Sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. Euphytica, Wageningen, **25:733-45, 1976.**
37. VARGAS, Q. E. & GONZALEZ, V. L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. Turrialba, Turrialba, **22(2):129-35, 1972.**
38. VERMEULEN, H. Coffee berry disease in Kenya. I. *Colletotrichum* spp. colonizing the bark of *Coffea arabica* L. Netherlad Journal Plant Pathology, Wageningem, **76:277-84, 1970**

39. WALLIS, J. A. N. & FIRMAN, I. D. A comparison of fungicide spray volumes for the control of coffee berry disease. Annals of Applied Biology. London, 59:111-22, 1967.
40. WELLMAN, F. L. Blister spot of Arabica coffee from virus in Costa Rica. Turrialba, Turrialba, 7:13-5, 1957.