

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA INFEÇÃO DE *Colletotrichum* spp. EM FRUTOS DE CAFFEEIROS COM MANCHA MANTEIGOSA.

Igor S. PEREIRA¹ (igoreloi@yahoo.com.br), Mario S. ABREU², Josimar B. FERREIRA¹, Eduardo ALVES³.

¹ Doutorando, ²Professor titular, ³Professor adjunto. (Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Lavras, CP. 37, 37200-000, Lavras, MG/Projeto financiado pelo CBP&D-Café)

Resumo:

O complexo *Colletotrichum*-cafeeiro em Minas Gerais é composto por vários patossistemas dos quais poucos são estudados. A mancha manteigosa, doença causada por *C. gloeosporioides* incide sobre folhas, flores, frutos e ramos acarretando grandes perdas. Um modo de se compreender melhor esse patossistema é através dos estudos histopatológicos, onde pode-se conhecer o processo de infecção assim como os fatores que a influenciam. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras – MG com o objetivo de se observar através da microscopia eletrônica de varredura a colonização de *Colletotrichum* spp. em frutos de café (*C. arabica* L.) com mancha manteigosa nos estádios verde-cana e cereja. Nas observações realizadas não se pode distinguir nenhuma característica peculiar que diferisse as lesões de frutos verdes e frutos maduros. Pode-se observar intensa colonização no tecido próximo à epiderme, um colapso dos estômatos com aspecto lignificado e crescimento de hifas e conídios, respectivamente externa e internamente ao tecido lesionado.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., *Glomerella cingulata*, microscopia eletrônica de varredura, mancha manteigosa.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY STUDIES OF COFFEE FRUITS WITH BLISTER SPOT FOR *Colletotrichum* spp.

Abstract:

The interaction *Colletotrichum*-coffee in Minas Gerais state, Brazil, is poorly studied. The blister spot, caused by *C. gloeosporioides*, occurs on leaves, flowers, fruits and branches causing large losses. A way to improve the understanding this pathosystem is through the histopathological studies. The infection process can be investigated as well as the factors that favor it. This work was carried out in Electron Microscopy and Ultra-structural Analysis Laboratory (LME) of the Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. The main objective was to observe by scanning electron microscopy the colonization of coffee berries (*C. arabica* L.) with blister spot in the stages of green-cane and cherry by *Colletotrichum* spp. We did not see any differences between lesions of blister spot in green fruits and ripe fruits. Intense colonization by *Colletotrichum* spp. could be observed in the tissues near to epidermis. Collapse of the stomate with lignifications aspects and growth of fungal hyphae and conidia, external and internally to the diseased tissue, were also observed.

Key words: *Coffea arabica* L., *Glomerella cingulata*, scanning electron microscopy, blister spot.

Introdução

O gênero *Colletotrichum* é frequentemente relatado em várias espécies de plantas cultivadas em todo o mundo causando doenças em pré e pós-colheita especialmente nas culturas das regiões tropicais e subtropicais. Este gênero é na maioria das vezes o agente causal de doenças cujos sintomas são comumente conhecidos como antracnose (Jeffries *et al.*, 1990). A sintomatologia das doenças ocasionadas por espécies de *Colletotrichum* normalmente variam pouco entre os diferentes hospedeiros. Infecções em folhas, ramos e inflorescências jovens resultam em lesões deprimidas, escuras, com formato subcircular ou angular. Estas lesões crescem, coalescem e destroem grandes áreas, frequentemente nas margens das folhas.

Em cafeeiro (*C. arabica* L.) várias são as doenças ocasionadas por *Colletotrichum* spp. tais como antracnose em folhas, frutos e ramos (queima-castanha); seca de ponteiros; mancha-manteigosa e *coffee berry disease* a qual não ocorre em nosso país (Orozco, 2003).

No complexo *Colletotrichum* x cafeeiro, a mancha manteigosa é uma doença de grande importância e ainda pouco estudada. Os sintomas são manchas de coloração verde-claro em folhas novas, de aspecto oleoso e menos brilhante que o limbo foliar. No estágio mais avançado, as manchas apresentam deprimidas, necróticas, cor marrom-claro e bordas irregulares. Estas folhas caem prematuramente, e os ramos infectados apresentam intensa murcha descendente levando à sua seca. Nos frutos estas lesões são circulares e deprimidas, ocorrendo sua queda prematura. Os ataques mais intensos da doença ocorrem nas folhas e ramos novos em plantas adultas durante a fase de maior vegetação (Bitancourt, 1958). Esses cafeeiros doentes têm sua produção intensamente afetadas (Ferreira *et al.*, 2005).

Até o presente trabalho, estudos histopatológicos de frutos com mancha manteigosa envolvendo a microscopia eletrônica de varredura não haviam sido feitos, desse modo, o conhecimento aqui gerado abre portas para trabalhos futuros para que se possa conseguir um bom entendimento sobre este patossistema. Portanto, com base nestas informações

procurou-se observar através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) a colonização de *Colletotrichum* spp. em frutos de café (*C. arabica* L.) com mancha manteigosa nos estádios verde-cana e cereja.

Material e Métodos

Utilizaram-se frutos de café cv. Catucaí Vermelho em seleção os quais apresentavam sintomas típicos da enfermidade mancha manteigosa. Posteriormente foram separados conforme seu estágio de desenvolvimento, utilizando-se apenas frutos da fase 4 (verde-cana) e fase 5 (cereja). Os frutos selecionados foram seccionados em pequenos fragmentos de 0,5 cm², compostos pela casca e mesocarpo da região lesionada os quais foram imersos em fixador karnovsky modificado até seu preparo.

O preparo e observação das amostras em MEV foi realizado no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – MG. Posteriormente à imersão em solução fixativa por um período de no mínimo 24 h. Cinco ou mais fragmentos de cada tratamento foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato (0,05M) e lavados neste três vezes durante 10 minutos. As secções foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 2 horas. Posteriormente lavadas em água destilada, subseqüentemente desidratadas em uma série de acetona e imediatamente submetidas ao aparelho de Ponto Crítico Balzers CPD 030. Após essa desidratação as amostras foram montadas sobre *stubs* para serem cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 e examinados com o microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40.

Realizaram-se observações superficiais destes fragmentos e posteriormente fizeram-se observações internas a partir deste mesmo material. Para isso, esses fragmentos foram manualmente partidos ao meio e novamente montados sobre *stubs*, cobertos com ouro e novamente examinados.

Resultados e Discussão

As primeiras observações realizadas foram da superfície dos frutos. Nestas observações não se pôde distinguir nenhuma característica peculiar das lesões em frutos verdes que fosse diferente em frutos maduros e vice-versa.

Conforme trabalhos realizados por Lins *et al.* (2004) a incidência de *C. gloeosporioides* é elevada e indiferente às fases do fruto de cafeeiro (*C. arabica* L.) chegando em média a atingir 86,6%, observou ainda, uma elevada incidência deste fungo nos tecidos do exocarpo e mesocarpo juntos, atingindo 84,7% destes tecidos na cv Topázio, 79,16% na cv Rubi e 77,7% na cv Acaíá.

As áreas lesionadas apresentam-se delimitadas com formato circular a subcircular onde se observa um aspecto coriáceo do tecido (Figura 1-A) enquanto que na região sadia da amostra as células epidérmicas mantêm seu aspecto normal. Em observações a olho nú pode-se observar que este tecido tem um aspecto coriáceo sendo quebradiço. Na região enferma do tecido há desarranjo dos estômatos apresentando-se lignificados (Figura 1-B), não sendo observado naquelas áreas sadias da amostra (Figura 1-C).

Algumas lesões, principalmente dos tecidos mais velhos, expõem estruturas de *Colletotrichum*. Pode-se observar o crescimento de hifas sobre o tecido da casca do fruto (Figura 2-A) e também a produção de conídios mais internamente no tecido na região onde ocorre rachadura (Figura 2-C), sem a produção de setas.

Posteriormente, quando se fez a fratura das amostras podem-se observar os tecidos do exocarpo e mesocarpo internamente. Naquelas regiões enfermas nota-se o colapso celular constituído de material amorfo (Figura 2-D) e uma elevação do exocarpo pressionado pelas hifas ali presentes. Nestes tecidos é possível se observar também o crescimento de hifas (Figura 2-B) preferencialmente próximas à casca.

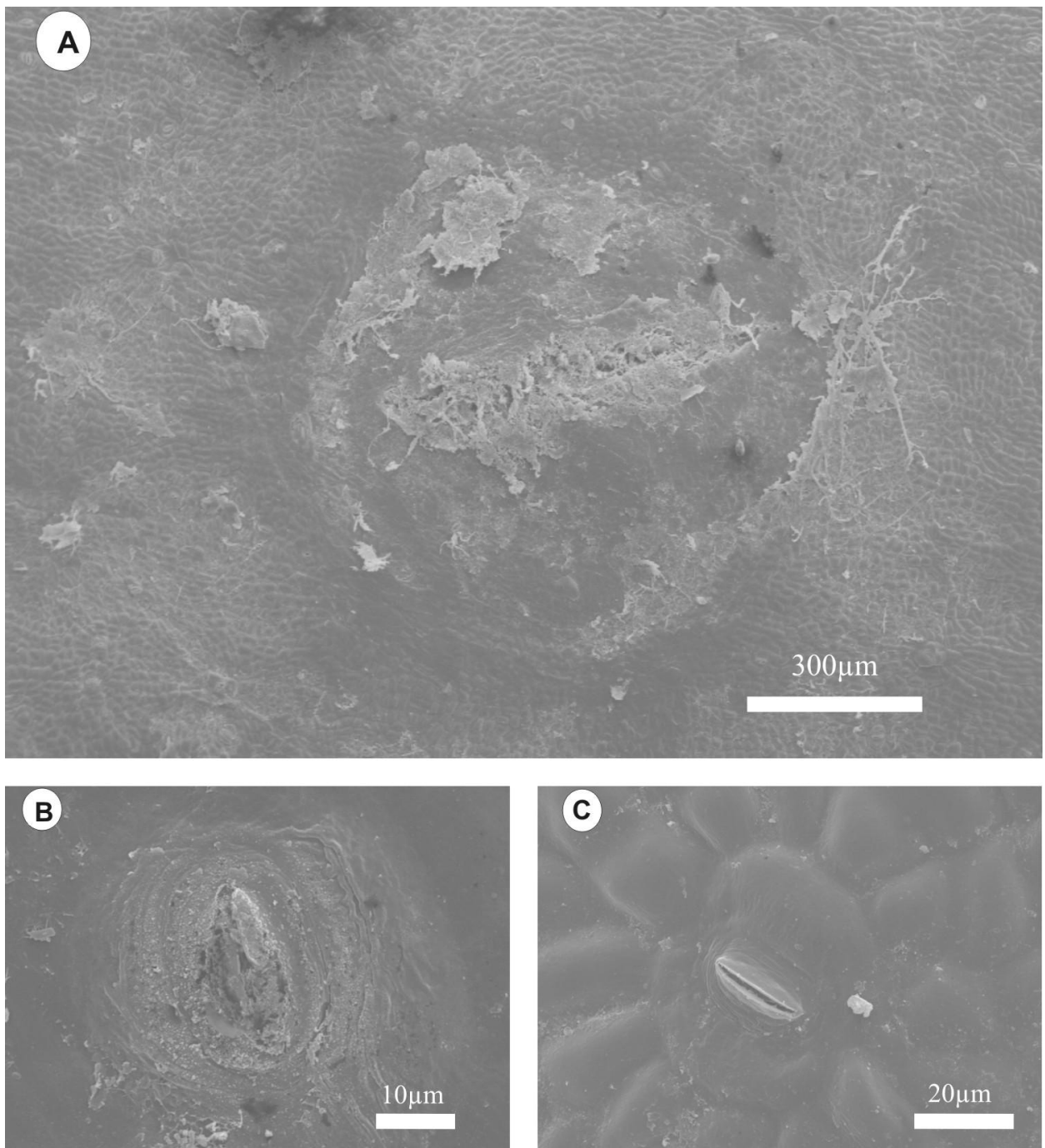


FIGURA 1 - Eletromicrografia de varredura mostrando um fruto de cafeeiro com mancha manteigosa. A - Lesão delimitada de forma circular. B - Estômato da área lesionada com aspecto corticoso. C - Estômato da área sadia no fruto.

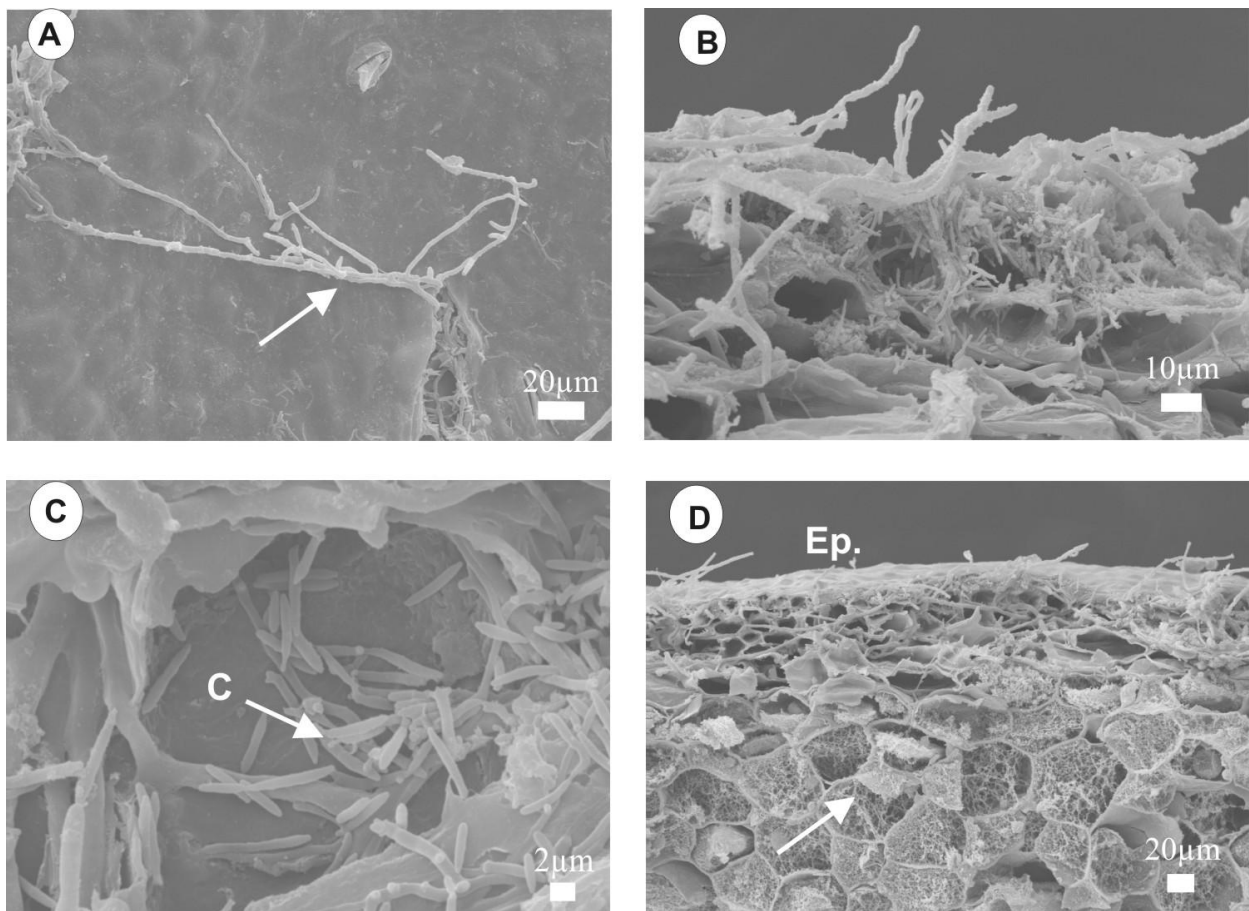


FIGURA 2 – Eletromicrografia de varredura de fruto de cafeeiro com mancha manteigosa. A - Hifas (seta) originadas de uma rachadura na região da mancha manteigosa. B – Produção de conídios no interior dos tecidos. C – Produção de conídios (C) no interior dos tecidos. D – Acúmulo de material nas células de frutos infectados (seta).

Referências Bibliográficas

- BITANCOURT, A.A. As manchas da folha do cafeeiro. 1958. O Biológico, São Paulo, v.24, n.4, p.191-201.
- FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; SILVA, E.H.; E.F. OROZCO MIRANDA; ABREU, M.S. 2005. Aspectos epidemiológicos e sintomatológicos da mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). Summa Phytopathologica, v.31, p.25-25, Suplemento.
- JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* sp. on tropical fruit crops. Plant Pathology, v.39, p.343-366.
- LINS, S.R.O.; FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; ABREU, M.S. 2004. Incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* nos estádios de formação e nos tecidos do fruto de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Fitopatologia Brasileira, v.29, p.135-135, 2004, Suplemento.
- OROZCO MIRANDA, E. F. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae*. 2003. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, 2003.