



**MONITORAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE  
*Colletotrichum* sp. DE CAFÉ EM EXPERIMENTO FACE (FREE AIR CO<sub>2</sub> ENRICHMENT)**

Petra Ferronato Gomes de **Abreu**<sup>1</sup>; Rosely dos Santos **Nascimento**<sup>2</sup>; Kátia de Lima **Nechet**<sup>3</sup>

**Nº 15407**

**RESUMO** - *Esse trabalho teve como objetivo monitorar a população endofítica do fungo Colletotrichum sp. e caracterizar a taxa de crescimento micelial dos isolados obtidos de plantas de café das cultivares Catuaí vermelho e Obatã mantidas no experimento ClimapestFACE. O experimento contém doze anéis, dos quais em seis anéis há injeção de CO<sub>2</sub> puro que mantém a concentração 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  acima da concentração de CO<sub>2</sub> do ambiente. As coletas de folhas sadias de café foram realizadas em seis períodos, caracterizados como duas estações de verão e uma de inverno. Os isolamentos foram feitos a partir de 10 fragmentos centrais de cada folha coletada. A caracterização dos isolados obtidos foi feita a partir da medição diária de colônias em meio de cultura para o cálculo da taxa de crescimento micelial e obtenção de dendograma por análise de agrupamento. Para ambas cultivares, não houve diferença estatística entre o número de isolados endofíticos de Colletotrichum sp. obtido nas condições de aumento de concentração de CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ambiente. Observou-se diferença significativa para esse parâmetro entre as estações e entre as cultivares. O maior número de isolados obtido, independente da cultivar, foi na coleta do inverno. A matriz de similaridade permitiu agrupar os isolados em um grupo contendo os obtidos da cultivar Catuaí e outro da cultivar Obatã. Em ambas as cultivares o aumento do CO<sub>2</sub> não teve efeito no agrupamento dos isolados. As variações observadas nesse experimento foram em função da cultivar de café e época de coleta, e não do aumento de CO<sub>2</sub>.*

**Palavras-chaves:** *Coffea arabica*, fungo mitospórico, dióxido de carbono, mudanças climáticas, gases de efeito estufa

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biologia, UNICAMP, Campinas-SP; petraferronato@gmail.com

2 Técnico Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; rosely.nascimento@embrapa.br

3 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; katia.nechet@embrapa.com



**ABSTRACT** - *The aim of this work was to monitor the population of endophytic fungus Colletotrichum sp. and characterize the radial growth rate of isolates from coffee plants cv. Catuaí vermelho and cv. Obatã under field conditions of ClimapestFACE facilities. The experiment comprised twelve octogonal rings, six of them were fumigated with pure CO<sub>2</sub> that keeps the concentration of CO<sub>2</sub> at 200 μmol.mol<sup>-1</sup> above the ambient CO<sub>2</sub>. Healthy coffee leaves were collected in six specific months, comprising two summer seasons and one winter season. The isolations were performed from 10 central parts of each collected leaf. The daily measurement of colony growth was done on culture medium and was used to calculate the radial growth rate. A dendrogram was constructed by cluster analysis using the data obtained from growth rate. There was no significant difference between the number of endophytic isolates of Colletotrichum sp. collected from plants under enriched CO<sub>2</sub> and ambient CO<sub>2</sub>. There was significant difference, for this parameter, among seasons and between cultivars. A higher number of isolates was observed in winter season, regardless of the cultivar. The similarity matrix resulted in two groups, one from cv. Catuaí and another from the cv. Obatã. The CO<sub>2</sub> enrichment condition had no influence in the cluster of isolates in both cultivars. The variations observed in this assay were influenced by the cultivar and by the seasons, not by the CO<sub>2</sub> enrichment conditions.*

**Key-words:** *Coffea arabica*, mitosporic fungi, carbon dioxide, climate change, greenhouse gases

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera é um dos parâmetros mais bem documentados considerando o contexto das mudanças climáticas. A concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico apresentou uma taxa de crescimento médio de  $2 \pm 0,1 \mu\text{mol.mol}^{-1}.\text{ano}^{-1}$  durante o período de 2002-2011, o maior aumento já observado desde que a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico começou a ser medida em 1958 (CIAIS et al., 2013). Atualmente, a concentração de CO<sub>2</sub> é de  $390 \mu\text{mol.mol}^{-1}$  com projeções de aumento variando de 500 a  $1000 \mu\text{mol.mol}^{-1}$  em 2100 (IPCC, 2014). O impacto do aumento de CO<sub>2</sub> em ecossistemas e agroecossistemas vem sendo amplamente pesquisado visando prever a resposta desses sistemas ao novo cenário de condição ambiental. A maioria dos estudos, porém, são conduzidos em condições controladas o que mascara o real efeito do aumento de CO<sub>2</sub> (AINSWORTH; LONG, 2004).



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Experimentos do tipo FACE (Free Air Carbon-dioxide Enrichment) permitem o estudo do aumento de CO<sub>2</sub> em plantas e ecossistemas em condições naturais, a céu aberto, e têm sido, em sua maioria, instalados em ecossistemas temperados na América do Norte e Europa (JONES et al., 2014). Na América Latina, o primeiro experimento do tipo FACE (ClimapestFACE) foi instalado na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna-SP, com a cultura do café e opera desde agosto de 2011. A instrumentação é baseada na tecnologia de rede de sensores sem fio desenvolvido pela Embrapa Instrumentação, em São Carlos-SP. A liberação de CO<sub>2</sub> ocorre por injeção direta e está programada para ocorrer entre 7:00 e 17:00 horas até atingir a concentração de 200  $\mu\text{mol. mol}^{-1}$  acima da atual no centro dos anéis. (TORRE-NETO et al., 2014).

Dentre as avaliações fitossanitárias realizadas no ClimapestFACE, está o monitoramento de população endofítica do gênero fúngico *Colletotrichum*. Fungos endofíticos vivem dentro dos tecidos das plantas sem causar sintomas aparentes de infecção. O papel ecológico desses organismos tem sido bem estudado, embora não elucidado completamente, está associado à defesa das plantas, tolerância a estresse ambiental e produção de metabólitos (DOUANLA-MELI; LANGER, 2012). Espécies de *Colletotrichum* são relatadas como fitopatogênicas, endofíticas, epifíticas e saprófitas em várias culturas (WEIR et al., 2012). As condições ambientais e de hospedeiro influenciam na diversidade de populações endofíticas (KRIEL et al., 2000).

Não há informação na literatura sobre o efeito do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> em populações endofíticas de isolados de *Colletotrichum* sp. em café. Assim, o objetivo desse trabalho foi monitorar a população endofítica de *Colletotrichum* sp. e caracterizar a taxa de crescimento micelial dos isolados obtidos de plantas de café das cultivares Catuaí vermelho IAC-144 e Obatã mantidas no experimento ClimapestFACE.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas na área experimental do ClimapestFACE em Novembro de 2012, Janeiro, Março, Junho e Novembro de 2013 e em Fevereiro de 2014. O experimento segue o delineamento em blocos casualizados, totalizando seis blocos. Cada bloco é constituído de dois anéis de 10 m de diâmetro, um com aplicação de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> ambiente + 200  $\mu\text{mol. mol}^{-1}$ ) e outro sem aplicação de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> ambiente). As cultivares Catuaí vermelho IAC-144 e Obatã foram plantadas dentro dos anéis em fevereiro de 2011.

### 2.1 Isolamento de *Colletotrichum* sp endofítico.



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Para o isolamento de *Colletotrichum* sp. endofítico foram coletadas folhas sadias de café de ambas as cultivares em plantas marcadas dentro de cada anel. Em cada período, coletaram-se quatro folhas de cada cultivar/anel, totalizando 48 folhas/cultivar/período de coleta. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e encaminhadas ao laboratório para processamento.

Da parte central de cada folha coletada foram retirados 10 fragmentos de 10 x10 mm. Os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada, transferidos para uma solução de álcool 75% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3-5% por 3 minutos e álcool 75% por 30 segundos. Após esse período, os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada, secos em papel de filtro esterilizado e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura Extrato de Malte-Levedura-Agar. As placas foram mantidas em sala de incubação com luz, a 25°C e observadas diariamente durante 30 dias quanto ao sinal de crescimento micelial do fungo *Colletotrichum*. As colônias com características de esporulação do fungo foram transferidas e mantidas em frascos de penicilina contendo meio de cultura de Agar Levedura Malte (YMA).

### 2.2 Caracterização da taxa de crescimento micelial dos isolados

Para avaliação do crescimento micelial, um disco de micélio de 5 mm de cada colônia fúngica, obtida a partir do crescimento em placa de Petri contendo meio BDA e mantida por sete dias a 25°C, no escuro, foi depositado no centro de placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram colocadas a 25°C, no escuro e a medição ortogonal do diâmetro da colônia foi feita diariamente com auxílio de paquímetro durante 10 dias para obtenção da taxa de crescimento micelial diária. O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada repetição representada por uma placa de Petri.

### 2.3 Análise dos dados

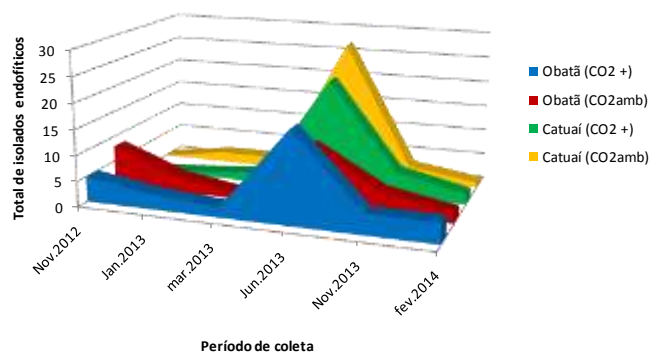
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância usando o GLM procedure do software SAS versão 9 e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas separadamente por coleta (6 períodos); por estação do ano, considerando verão 1 (novembro 2012, janeiro e fevereiro de 2013), inverno (junho 2013) e verão 2 (novembro de 2013 e fevereiro de 2014); pelo período total de avaliação. Para essa última análise foi calculada a área abaixo da curva de número total de isolados obtido por tratamento e por período, segundo metodologia de Campbell e Madden (1990).



A partir dos valores médios da taxa de crescimento micelial diária dos isolados obteve-se um dendograma por meio de análise de agrupamento usando-se como medida de distância o single-link no programa MiniTab v. 16.1.1. O dendograma obtido foi usado para comparar a similaridade entre os isolados de *Colletotrichum* sp.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as coletas realizadas foram obtidos isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp. O número total de isolados obtidos em cada coleta é apresentado na Figura 1 por cultivar e por condição de CO<sub>2</sub>. Na primeira coleta, em novembro de 2012, foram obtidos apenas isolados da cultivar Obatã. Nas demais coletas, os isolados foram obtidos de ambas as cultivares. O maior número de isolados obtido, independente da cultivar e da condição de CO<sub>2</sub>, foi na coleta de junho de 2013. O número de isolados obtidos nesse período variou de 12 a 27, enquanto nas demais coletas a variação foi de 2 a 8 isolados obtidos (Figura 1).



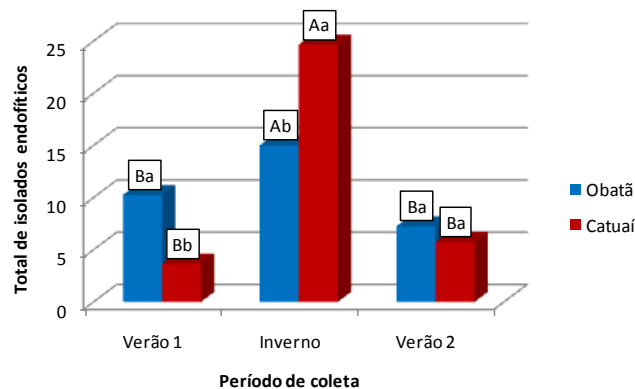
**Figura 1.** Número total de isolados endofíticos do fungo *Colletotrichum* sp. obtidos de plantas de café das cultivares Obatã e Catuaí em condições de aumento de concentração de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>+) e condição de CO<sub>2</sub> ambiental (CO<sub>2</sub>amb) em todos os períodos de coleta.

Não houve diferença significativa do número de isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp. entre as cultivares e entre as condições de CO<sub>2</sub> quando compararam-se os dados obtidos por cada um dos seis períodos de coleta, e nem considerando o período total de coleta expresso em área abaixo da curva de número de isolado. Entretanto, quando analisaram-se os dados obtidos por estação do ano, observou-se diferença significativa do número de isolados endofíticos de



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015  
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

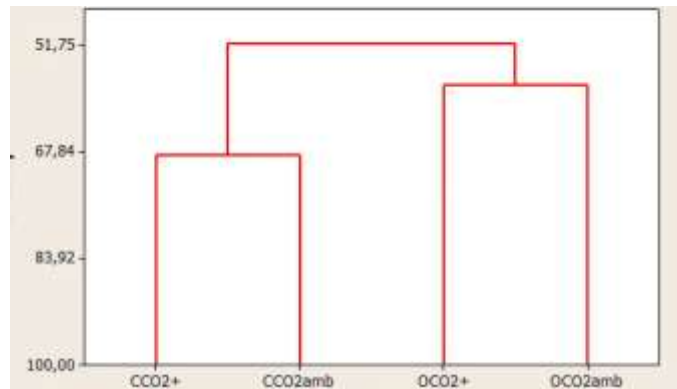
*Colletotrichum* sp entre as estações e entre as cultivares (Figura 2). Não houve diferença estatística para o fator condição de CO<sub>2</sub>.



**Figura 2.** Número total de isolados endofíticos do fungo *Colletotrichum* sp. obtidos de plantas de café das cultivares Obatã e Catuaí nas estações verão 1 (nov.2012/jan.2013/mar.2013), inverno (jun.2013) e verão 2 (dez.2013/fev. 2014). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre estações, dentro da mesma cultivar, e letras minúsculas entre as cultivares, dentro da mesma estação, não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na estação verão 1 observou-se diferença entre as cultivares, sendo que maior número de isolados foi obtido da cultivar Obatã. Na estação inverno, também observou-se diferença estatística entre as cultivares, porém nessa estação, o maior número de isolados foi obtido da cultivar Catuaí. Na estação verão 2 não houve diferença estatística entre as cultivares. Para ambas as cultivares o maior número de isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp. obtido foi na estação inverno que diferiu estatisticamente das demais estações avaliadas.

A matriz de similaridade construída a partir dos valores médios de taxa de crescimento micelial diária dos isolados obtidos permitiu agrupar os isolados em dois grupos. Um grupo contendo isolados obtidos da cultivar Catuaí e outro grupo com isolados obtidos da cultivar Obatã (Figura 3). Em ambas as cultivares o aumento do CO<sub>2</sub> não teve efeito no agrupamento dos isolados por similaridade.



**Figura 3.** Dendrograma gerado pela análise de agrupamento usando-se como medida de distância o single-link construído a partir dos valores médios de taxa de crescimento micelial diária de isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp. obtidos das cultivares de café Catuaí (C) e Obatã (O) em condições de aumento de CO<sub>2</sub> (CO2+) e CO<sub>2</sub> ambiente (CO2amb).

Nosso estudo mostrou que ocorre população endofítica de *Colletotrichum* sp. em café do experimento ClimapestFACE e que a variação observada no número de isolados obtidos foi em função da cultivar de café e época de coleta, e não do aumento de CO<sub>2</sub>. Além disso, os isolados obtidos nessas condições agruparam por similaridade com os isolados de CO<sub>2</sub> ambiente. Espécies de *Colletotrichum* são relatadas como endofíticas em diferentes órgãos de cafeeiros (FERREIRA et al., 2005; PRIHASTUTI et al. 2009). Fatores ambientais e a fisiologia do hospedeiro influenciam os fungos endofíticos de plantas (HIGGINS et al., 2014). As coletas foram feitas em plantas jovens e com pouco mais de um ano de liberação de CO<sub>2</sub>. Porém o efeito do aumento de CO<sub>2</sub> observado após longos períodos de exposição pode causar diferentes resultados dos obtidos. Para o período avaliado o CO<sub>2</sub> não interferiu na população endofítica de *Colletotrichum* sp. em café.

#### 4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o aumento de CO<sub>2</sub> não teve efeito no número de isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp. obtidos e não influenciou no agrupamento de isolados por similaridade de taxa de crescimento micelial diária. A cultivar de café e a estação do ano influenciaram no número de isolados obtidos e a similaridade dos isolados foi observada para as cultivares de origem do isolamento.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq-PIBIC pela concessão da bolsa ao primeiro autor.



## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, E. A.; LONG, S. P. What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>. **New Phytologist**, Cambridge, v. 165, n. 2, p. 351-372, 2004.

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

CIAIS, P.; SABINE, C. Carbon and other biogeochemical cycles. In: CAMBRIDGE: STOCKER, T. F.; QIN, D.; PLATTNER, G.-K.; TIGNOR, M.; ALLEN, S. K.; BOSCHUNG, J.; NAUELS, A.; XIA, Y.; BEX, V.; MIDGLEY, P. M. (Ed.). **Climate change 2013: the physical science basis: contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 465-570.

DOUANLA-MELI C.; LANGER E. Diversity and molecular phylogeny of fungal endophytes associated with *Diospyros crassiflora*. **Mycology**, London, v. 3, n. 3, p. 175-187, 2012.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S. de; PEREIRA, I. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 880-885, 2005.

HIGGINS, K. L.; ARNOLD, A. E.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host and habitat generalists characterized by strong spatial structure. **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 8, p. 1-11, 2014.

PACHAURI, R. K.; MEYER, L. A. (Ed.). **Climate change 2014: synthesis report: contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva: Core Writing Team, 2014. 151 p.

JONES, A. G.; SCULLION, J.; OSTLE, N.; LEVY, P. E.; GWYNN-JONES, D. Completing the FACE of elevated CO<sub>2</sub> research. **Environment International**, Amsterdam, v. 73, p. 252-258, 2014.

KRIEL, W. M.; SWART W. J.; CROUS P.W. Foliar endophytes and their interactions with host plants, with specific reference to the Gymnospermae. **Advances in Botanical**, London, v. 83, p. 1-34, 2000.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Thailand, v. 39, p. 89-109. 2009

TORRE NETO, A.; GHINI, R.; DENTZIEN, A.; NECHET, K. Rede de sensores sem fio para estudo dos impactos das mudanças climáticas no cafeeiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, 2014, São Carlos, SP. Anais do SIAGRO: ciência, inovação e mercado 2014. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação, 2014. p. 353-356.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies In Mycology**, Baam, v. 73, n. 1, p.115-180, 2012.