

## ***Colletotrichum gloeosporioides* E *C. boninense* ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO CAFÉ NO BRASIL**

Rejane L. Freitas<sup>1</sup>; Eunize M. Zambolim<sup>2</sup>; Daniela T. Lelis<sup>1</sup>; Eveline T. Caixeta<sup>3</sup>; Laércio Zambolim<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bolsista do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, rejbqi@yahoo.com.br, daniela\_tlelis@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Pesquisadora, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, eunize@ufv.br – autor para correspondência

<sup>3</sup> Pesquisadora, D. Sc., Embrapa Café, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, eveline.caixeta@embrapa.br

<sup>4</sup> Professor titular, PhD., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, zambolim@ufv.br

**RESUMO:** *Colletotrichum gloeosporioides* sempre esteve associado ao sintoma de antracnose do cafeeiro, embora não tenha sido possível provar a sua patogenicidade à planta. Em 2010, de amostras de *Coffea* spp. do Espírito Santo e Bahia, foi isolado, além de *C. gloeosporioides*, um *Colletotrichum* com características morfológicas diferentes (colônia branca a róseo-alaranjada, com halos concêntricos escuros). A identificação da espécie foi feita pela amplificação da região ITS (*internal transcribed spacer*) do rDNA com o *primer* universal ITS4 em combinação com os *primers* CaInt2, CgInt e Col1, específicos para *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, respectivamente. Os *primers* ITS4 e Col1 amplificaram um produto único de aproximadamente 500pb, esperado para *C. boninense*. A região ITS do rDNA e o gene *GAPDH* do isolado do Espírito Santo foram amplificados pelos *primers* ITS1 e ITS4, e GDF e GDR, respectivamente. As sequências resultantes foram depositadas no GenBank com números de acessos JF683320 e JF331654, respectivamente, e analisadas filogeneticamente com outras espécies de *Colletotrichum*. A região do rDNA apresentou 99% de identidade com sequências de *C. gloeosporioides* e *C. boninense*. No entanto, a análise do gene *GAPDH* confirmou que o isolado era definitivamente *C. boninense sensu lato*, por se mostrar idêntico a outras sequências em um amplo clado de isolados da espécie. Para avaliar a patogenicidade de *C. boninense* ao cafeeiro foi usada uma suspensão de conídios a  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> para inoculação em hipocótilos, com e sem ferimento. Trinta dias após a inoculação foi detectada necrose em 30% dos hipocótilos com ferimento. Folhas destacadas foram inoculadas com discos de micélio e apresentaram lesão sete dias após a inoculação, somente no tratamento com ferimento. No momento, estão sendo inoculados frutos verdes destacados de cafeeiro e os resultados sugerem a associação entre *C. gloeosporioides* e *C. boninense* no estabelecimento da doença. Este é o primeiro relato de *C. boninense* associado à antracnose do café no Brasil.

**Palavras-chave:** Patogenicidade, antracnose, *Coffea arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense*.

## ***Colletotrichum gloeosporioides* AND *C. boninense* ASSOCIATED WITH ANTHRACNOSE DISEASE OF COFFEE IN BRAZIL**

**ABSTRACT:** *Colletotrichum gloeosporioides* has always been associated with anthracnose symptoms of coffee. However, it has not been possible to confirm its pathogenicity to the plant. In 2010, besides *C. gloeosporioides*, another fungus of the genus *Colletotrichum* showing distinct morphological characteristics (colonies white to orange-pinkish, with grey concentric haloes) was isolated from necrotic leaves and branches of *Coffea canephora* cv. Konillon in the Espírito Santo and Bahia State. The identification of the unknown *Colletotrichum* species was accomplished by amplifying the internal transcribed spacer (ITS) region from rDNA with the universal primer ITS4 in combination with the species-specific primers CaInt2, CgInt and Col1, for *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* and *C. boninense*, respectively. The primers ITS4 and Col1 amplified a single DNA product of approximately 500bp, which is expected for *C. boninense*. Sequences data from the rDNA ITS region and from the Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene of the isolate from Espírito Santo were deposited in GenBank under the accession numbers JF683320 and JF331654, respectively. Those DNA sequences, as well as sequences from other *Colletotrichum* species were used for phylogenetic analysis. The ITS sequence showed an identity value of 99% with *C. gloeosporioides* and *C. boninense* sequences. On the other hand, analysis with GAPDH gene confirmed that the isolate is definitely *C. boninense sensu lato*, once it was exactly identical to other GAPDH sequences in a large clade of isolates from this species. The pathogenicity of *C. boninense* was evaluated by inoculating conidial suspension at  $10^6$  conidia/mL in wounded and non-wounded coffee hypocotyls. Thirty days after inoculation, necrosis was detected in 30% of wounded hypocotyls. Wounded detached leaves were inoculated with mycelia disks and they showed necrotic lesions seven days after inoculation. Detached green berries are currently being inoculated and the results suggest an association between *C. gloeosporioides* and *C. boninense* to establish the disease. This is the first report of *C. boninense* associated with anthracnose disease of coffee in Brazil.

**Key words:** pathogenicity, anthracnose, *Coffea arabica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense*.

Trabalho financiado pela Embrapa Café, CNPq e MAPA.

## INTRODUÇÃO

Em cafeeiro, os sintomas de antracnose como seca de ramos, folhas e frutos sempre foram associados à *Colletotrichum gloeosporioides*. Apesar disso, ainda não foi possível comprovar sua patogenicidade ao cafeeiro, uma vez que sintomas externos não aparecem após a inoculação. Diante desse fato, existe a hipótese de que *C. gloeosporioides* é um fungo endofítico e oportunista ao cafeeiro, podendo causar injúrias quando a planta é submetida a determinadas condições de estresse. Outra possibilidade é a existência de um complexo de diferentes espécies de *Colletotrichum*, responsável pelos sintomas observados em condições de campo. Neste sentido, torna-se importante a identificação de novas espécies do fungo e sua caracterização morfológica e molecular. Neste trabalho, relatamos a identificação de uma nova espécie de *Colletotrichum* associada à antracnose do café no Brasil e sua possível associação com *C. gloeosporioides* no estabelecimento da doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dois isolados de *Colletotrichum*, obtidos a partir de folhas de cafeeiro com sintomas de necrose no Estado do Espírito Santo, foram cedidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Os isolados, denominados Incaper 13501 e Incaper 13422, apresentavam características similares às de *C. gloeosporioides* quando crescidos em meio de batata dextrose ágar (BDA). Outros isolados, com as mesmas características, foram obtidos a partir de ramos e frutos de cafeeiro, provenientes da Bahia, com sintomas característicos de infecção por *C. gloeosporioides*. Para a confirmação da espécie de *Colletotrichum* optou-se pela técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia), utilizando o *primer* universal ITS4 (White *et al.*, 1990) em combinação com CgInt (Mills *et al.*, 1992), CaInt2 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994) e Col1 (Pileggi *et al.*, 2009), específicos para *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense*, respectivamente. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e visualizados pela coloração com brometo de etídio, seguido da exposição à luz ultravioleta.

Para o isolado Incaper 13422 foi feita a clonagem e o sequenciamento dos genes  $\beta$ -*tubulina* e *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e da região *ITS* (*internal transcribed spacer*) do rDNA. A busca de similaridade local entre as sequências consenso de interesse e sequências depositadas em banco de dados foi feita por meio do aplicativo *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no site do *NCBI*.

A caracterização morfológica de *C. boninense* foi feita com colônias crescidas em BDA, a 25°C e fotoperíodo de 12h, por sete dias. Os conídios foram espalhados em laminulas, contendo 15µL de água esterilizada, e incubados em câmara úmida por 48h. Após esse tempo, as laminulas foram montadas em lâminas com lactofenol e observadas ao microscópio de luz. A medição do tamanho dos conídios e dos apressórios foi feita com auxílio de uma régua presente na ocular do microscópio.

A fim de confirmar a patogenicidade de *C. boninense* (Incaper 13422), hipocótilos de *C. arabica* no estágio palito de fósforo foram inoculados com suspensão de conídios (concentração de  $2 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>), acrescida de Tween 0,01%, com e sem fermento, utilizando um atomizador De Vilbiss. Como testemunha foi utilizada água esterilizada + Tween 0,01%. As bandejas foram envoltas por saco plástico e mantidas a 19°C, no escuro, por 48 horas. Após esse tempo, uma nova suspensão foi preparada e os hipocótilos foram reinoculados. As bandejas foram novamente cobertas e mantidas a 22°C e fotoperíodo de 12h, até aparecimento de sintomas. Foram também inoculadas folhas jovens de *C. arabica*, com e sem fermento, utilizando-se discos de micélio do isolado Incaper 13422. Como testemunha, utilizou-se disco de meio BDA.

A possível associação entre *C. gloeosporioides* e *C. boninense* foi avaliada pela inoculação de frutos verdes destacados de cafeeiro. Os frutos foram desinfestados superficialmente, acondicionados em gerbox e inoculados com 20 µL da suspensão de conídios (concentração de  $2 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>), acrescida de Tween 0,01%, com e sem fermento. Após 48h, foi feita a reinoculação dos frutos, compondo cinco tratamentos: 1) testemunha (água esterilizada); 2) *C. gloeosporioides* (1ª e 2ª inoculação); 3) *C. boninense* (1ª e 2ª inoculação); 4) *C. gloeosporioides* (1ª) + *C. boninense* (2ª); 5) *C. boninense* (1ª) + *C. gloeosporioides* (2ª). A avaliação está sendo feita diariamente e os frutos lesionados estão sendo utilizados para reisolamento do fungo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção de dois isolados (Incaper 13422 e um isolado de ramo da Bahia), todos os demais foram confirmados como *C. gloeosporioides*. A ausência de banda para os dois isolados descartou a possibilidade de serem *C. gloeosporioides* ou *C. acutatum*. A partir daí, a estratégia adotada foi a clonagem de alguns genes para posterior sequenciamento, na tentativa de identificar a espécie. Para este trabalho, foi utilizado o isolado Incaper 13422.

Os resultados de *BLAST* obtidos com as sequências do isolado Incaper 13422 estão ilustrados na **Figura 1**. Com o gene  $\beta$ -*tubulina* foi observada uma identidade de 91% com sequências de *C. gloeosporioides* e de *Glomerella acutata*, 90% com *C. kahawae* e 89% com *C. graminicola*. Para a região *ITS* foi verificada uma alta identidade (99%) tanto com sequências de *C. gloeosporioides* quanto de *C. boninense*. O gene *GAPDH*, por sua vez, apresentou alta identidade (98%) apenas com sequências de *C. boninense*.

A	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	<a href="#">J14138.1</a>	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene beta-tubulin (T	1135	1135	100%	0.0	91%
	<a href="#">B273716.1</a>	Glomerella acutata CaTUB2 gene for beta-tubulin 2, complete cds, s	1133	1133	99%	0.0	91%
	<a href="#">Y245020.1</a>	Colletotrichum kahawae beta tubulin (BTUB2) gene, exons 6 and 7	1106	1106	100%	0.0	90%
	<a href="#">M34492.1</a>	C.graminicola beta-tubulin-2 (TUB2) gene, complete cds	1085	1085	100%	0.0	89%
	<a href="#">AY780119.1</a>	Induratia sp. SMH1255 beta-tubulin gene, partial cds	1079	1079	99%	0.0	89%
	<a href="#">DQ166861.1</a>	Verticillium dahliae var. longisporum isolate 1 beta tubulin (TUB) qe	1067	1067	99%	0.0	88%
	<a href="#">DQ166860.1</a>	Verticillium dahliae var. longisporum isolate 71 beta tubulin (TUB) q	1067	1067	99%	0.0	88%
	<a href="#">DQ166858.1</a>	Verticillium dahliae var. longisporum isolate 74 beta tubulin (TUB) q	1067	1067	99%	0.0	88%

B	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	<a href="#">FJ459928.1</a>	Colletotrichum gloeosporioides isolate T119 18S ribosomal RNA gen	1009	1009	89%	0.0	99%
	<a href="#">FJ459924.1</a>	Colletotrichum gloeosporioides isolate T92 18S ribosomal RNA gene	1009	1009	89%	0.0	99%
	<a href="#">EU520088.1</a>	Colletotrichum gloeosporioides isolate NW685 18S ribosomal RNA q	1009	1009	89%	0.0	99%
	<a href="#">EU520087.1</a>	Glomerella cinquata isolate NW677b 18S ribosomal RNA gene, part	1009	1009	89%	0.0	99%
	<a href="#">FJ481122.1</a>	Colletotrichum gloeosporioides isolate T102 18S ribosomal RNA gen	1003	1003	89%	0.0	99%
	<a href="#">FJ459941.1</a>	Glomerella cinquata isolate T109 18S ribosomal RNA gene, partial s	1002	1002	89%	0.0	99%
	<a href="#">FJ940901.1</a>	Colletotrichum gloeosporioides isolate au 006 18S ribosomal RNA q	1000	1000	89%	0.0	99%
	<a href="#">EU734586.1</a>	Colletotrichum sp. GM69-L02 internal transcribed spacer 1, partial s	1000	1000	89%	0.0	99%
	<a href="#">EU734585.1</a>	Colletotrichum sp. GM67-L02 internal transcribed spacer 1, partial s	1000	1000	89%	0.0	99%
	<a href="#">EU734584.1</a>	Colletotrichum sp. GM57 internal transcribed spacer 1, partial sequ	1000	1000	89%	0.0	99%
	<a href="#">EU822802.1</a>	Colletotrichum boninense isolate COL7 18S ribosomal RNA gene, pa	1000	1000	89%	0.0	99%

C	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	<a href="#">GU935861.1</a>	Colletotrichum boninense isolate C01139 glyceraldehyde-3-phosphate	355	355	100%	5e-95	98%
	<a href="#">FJ949450.1</a>	Colletotrichum boninense strain PAS27 glycerol-3-phosphate dehydro	329	329	88%	3e-87	100%
	<a href="#">FJ949452.1</a>	Colletotrichum boninense strain PAS25 glycerol-3-phosphate dehydro	324	324	88%	1e-85	99%
	<a href="#">GU935863.1</a>	Colletotrichum boninense isolate C05016 glyceraldehyde-3-phosphate	172	172	100%	6e-40	83%
	<a href="#">GU935862.1</a>	Colletotrichum boninense isolate C08078 glyceraldehyde-3-phosphate	167	167	100%	3e-38	82%
	<a href="#">GQ221769.1</a>	Colletotrichum boninense isolate MAFF 305972 glycerol-3-phosphate	161	161	94%	1e-36	83%
	<a href="#">FJ949453.1</a>	Colletotrichum boninense strain PAS12 glycerol-3-phosphate dehydro	147	147	80%	3e-32	83%
	<a href="#">FJ949451.1</a>	Colletotrichum boninense strain PAS10 glycerol-3-phosphate dehydro	147	147	80%	3e-32	83%

**Figura 1 – Resultados obtidos na análise de BLAST com as seqüências de  $\beta$ -tubulina (A), ITS (B) e GAPDH (C), mostrando a porcentagem de identidade (Max Ident) do isolado *Colletotrichum* spp. Incaper 13422 com seqüências depositadas em banco de dados.**

O relacionamento filogenético entre o isolado Incaper 13422 e outros isolados de *C. boninense*, inferido a partir do gene *GAPDH*, confirmou que o isolado é definitivamente *C. boninense sensu lato*, por se mostrar idêntico a outras seqüências em um amplo clado de isolados desta espécie (**Figura 2**). De fato, a amplificação de um produto único com a combinação dos *primers* específicos ITS4 e Col1 confirmou o isolado Incaper 13422 e o isolado da Bahia como *C. boninense*. Novamente, não houve a amplificação esperada para as outras espécies de *Colletotrichum* (**Figura 3**).

Além da confirmação molecular, foi feita a caracterização morfológica do fungo. As colônias apresentaram coloração branca a róseo-alaranjada, com halos concêntricos escuros devido à abundante formação de esporódóquios, com massa de conídios alaranjada, reverso alaranjado (**Figura 4, A e B**). Os conídios (amerosporos) eram hialinos e elipsóides, de 10-16 x 5.0-7.5  $\mu$ m. Os apressórios com poro germinativo eram melanizados, apresentando formato irregular e espatulado (**Figura 4, C**), de 7.5-11.0 x 5.5-8.5  $\mu$ m, formados sozinhos ou associados (**Figura 4, D**).

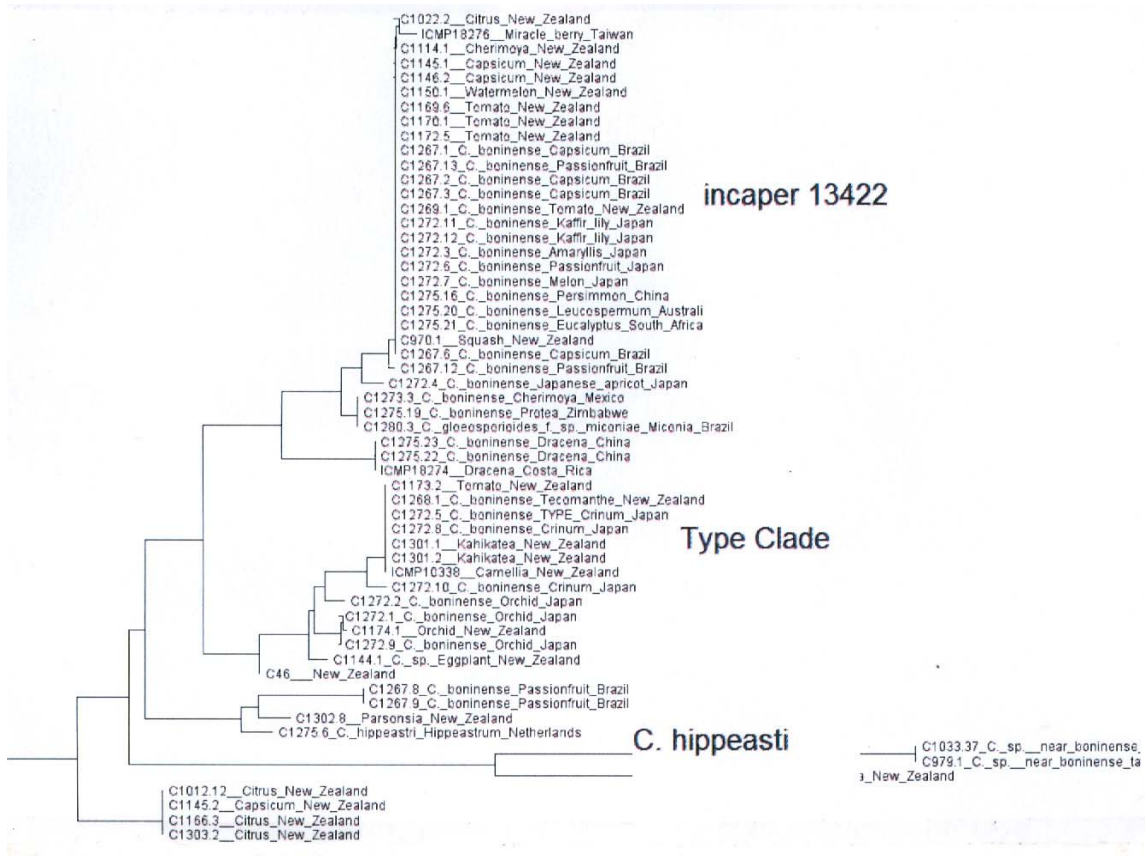


Figura 2 - Árvore filogenética inferida a partir do gene *GAPDH*, ilustrando o relacionamento entre o isolado Incaper 13422 e outros isolados de *C. boninense*.

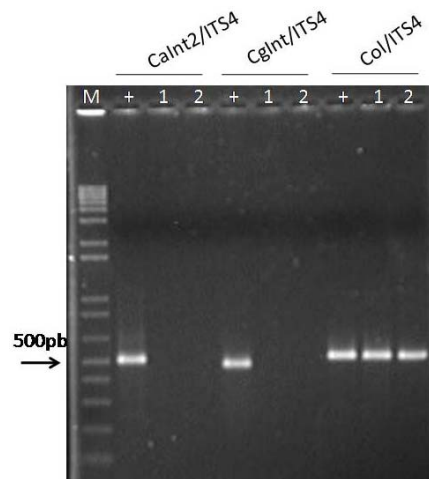
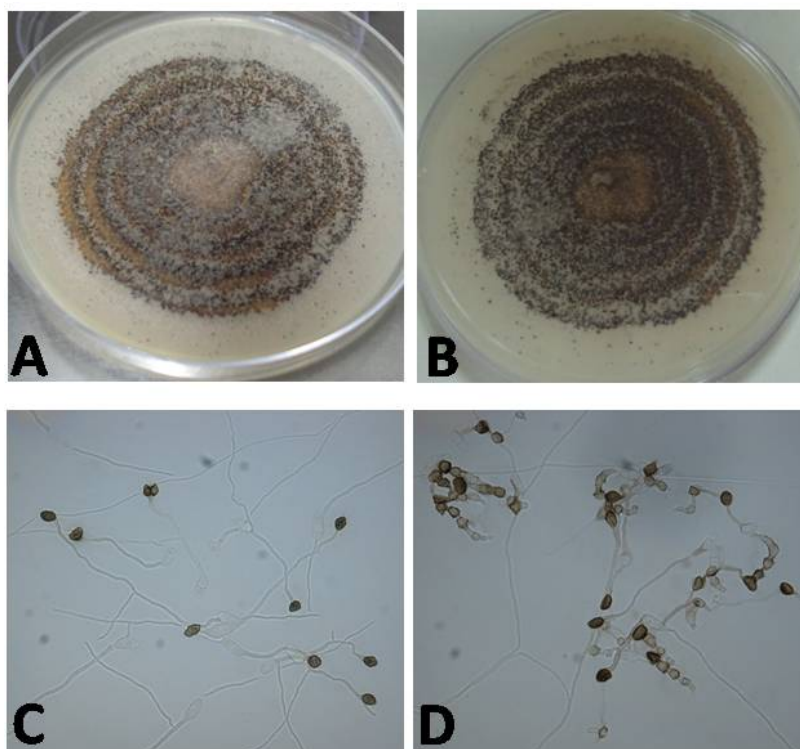


Figura 3 - Produto amplificado por meio de reação de PCR, utilizando o *primer* universal ITS4 em combinação com os *primers* CaInt2, CgInt e Col1, específicos para *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, respectivamente. M representa o marcador de peso molecular. A seta indica a banda de 500pb. (+) se refere ao controle positivo usado nas diferentes reações. (1): DNA do isolado Incaper 13422. (2): DNA do isolado da Bahia.



**Figura 4 – Características morfológicas de *C. boninense*.** Cultura crescida em BDA, aos sete dias, apresentando halos concêntricos, com abundante esporulação (A) e reverso alaranjado (B). Conídios hialinos e elipsóides, com apressórios melanizados (C), formados sozinhos ou associados (D).

A patogenicidade de *C. boninense* foi avaliada em hipocótilos e folhas destacadas de cafeeiro. Aos 30 dias após a inoculação (dai), foi detectada necrose em 30% dos hipocótilos com fermento (dados não mostrados). Nas folhas inoculadas foi possível observar necrose uma semana após a inoculação, mas apenas no tratamento ‘com fermento’ (Figura 5). Convém salientar que estes experimentos foram realizados anteriormente com vários isolados de *C. gloeosporioides* existentes no laboratório, embora não tenha sido verificado qualquer sintoma.

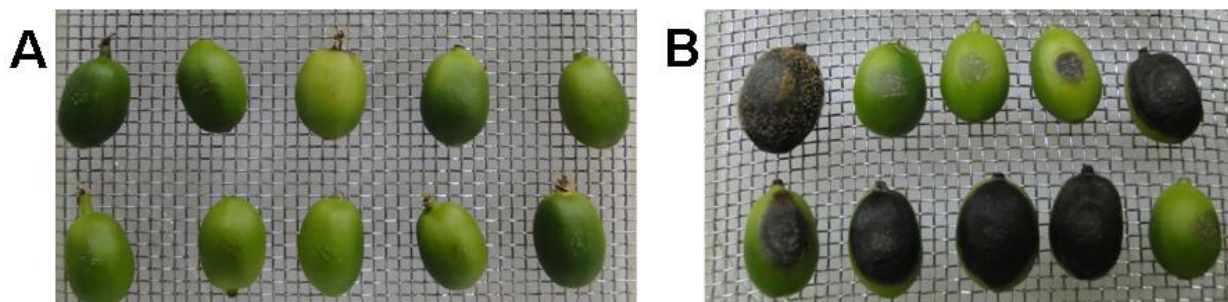


**Figura 5 – Patogenicidade do isolado Incaper 13422 em folhas destacadas de *C. arabica*.** Folhas inoculadas com disco de BDA (testemunha, à esquerda) e com disco de micélio do isolado Incaper 13422 (à direita). Uma semana após a inoculação, as folhas inoculadas com o isolado apresentavam necrose, apenas no tratamento ‘com fermento’.

Os resultados obtidos com a inoculação de *C. boninense* e *C. gloeosporioides* em frutos verdes de cafeeiro sugerem a associação das duas espécies no estabelecimento da doença, uma vez que não houve lesão nos frutos inoculados apenas com uma das espécies. Aos 15 dai, foi verificada uma alta taxa de necrose (70%) nos frutos inoculados primeiramente com *C. boninense* e após 48h, com *C. gloeosporioides*, mas apenas no tratamento com fermento (Figura 6 B). Curiosamente, não houve lesão nos frutos inoculados primeiro com *C. gloeosporioides* e depois



com *C. boninense*, mantendo-se similar à testemunha (**Figura 6 A**). Estas observações dão suporte à hipótese de que *C. gloeosporioides* é um fungo oportunista e que atua em associação com outras espécies de *Colletotrichum* para causar danos ao cafeeiro. Trabalhos complementares serão realizados a fim de esclarecer essa questão.



**Figura 6 – Patogenicidade das espécies de *Colletotrichum* em frutos verdes destacados de *C. arabica*. A-** Frutos inoculados com água esterilizada (testemunha), com fermento. **B-** Frutos inoculados com *C. boninense* (1<sup>a</sup>) + *C. gloeosporioides* (2<sup>a</sup>), com fermento, aos 15dai.

## CONCLUSÕES

- 1- O isolado oriundo de *C. canephora* foi identificado com base em características morfológicas e moleculares. A análise do gene *GAPDH* confirmou que o isolado era definitivamente *C. boninense sensu lato*, por se mostrar idêntico a outras sequências em um amplo clado de isolados da espécie.
- 2- *C. boninense* está associado à antracnose do cafeeiro no Brasil, tendo sido capaz de infectar hipocótilos e folhas destacadas de cafeeiro, mas apenas ‘com fermento’.
- 3- Frutos verdes destacados de cafeeiro somente apresentaram lesão após inoculação de *C. boninense* seguida de *C. gloeosporioides*, no tratamento com fermento. O inverso não ocorreu.
- 4- Os dados sugerem que *C. gloeosporioides* é um fungo oportunista e que atua em associação com outras espécies de *Colletotrichum* em folhas e frutos do cafeeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MILLS, P. R., SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 98:137-143, 1992.
- PILEGGI, S. A. V. et al. Molecular and morphological markers for rapid distinction between 2 *Colletotrichum* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 55:1076-1088, 2009.
- SREENIVASAPRASAD, S., SHARADA, K., BROWN, A. E., MILLS, P. R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*, 45: 650-655, 1996.
- WHITE, T. J., BRUNS, T. D., LEE, S., TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 315–322, 1990.