

PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM CAFEIRO UTILIZANDO ISOLADOS TRANSGÊNICOS

Rejane L. Freitas²; Eunize M. Zambolim³; Eveline T. Caixeta⁴; Laércio Zambolim⁵

¹ Trabalho financiado pela Embrapa Café, CNPq e MAPA

² Bolsista do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, rejbj@yahoo.com.br

³ Pesquisadora, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, eunize@ufv.br – autor para correspondência

⁴ Pesquisadora, D. Sc., Embrapa Café, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, eveline.caixeta@embrapa.br

⁵ Professor titular, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, zambolim@ufv.br

RESUMO: O gênero *Colletotrichum* é considerado o agente causal de várias doenças em uma ampla gama de hospedeiros. Em cafeeiro, *C. gloeosporioides* está associado à seca de ramos, folhas e frutos. Apesar disso, ainda não foi possível comprovar a patogenicidade do fungo ao cafeeiro, uma vez que sintomas externos dificilmente aparecem após a inoculação. Diante disso, existe a hipótese de que o fungo *C. gloeosporioides* seja endofítico e oportunista ao cafeeiro, podendo causar injúrias quando a planta é submetida a algum tipo de estresse. A fim de esclarecer a interação entre *C. gloeosporioides* e cafeeiro, isolados provenientes de *Coffea arabica* e *C. canephora*, com sintomas de necrose e mancha manteigosa, foram marcados com o gene *GFP*, que codifica para uma proteína verde fluorescente. Após a confirmação molecular dos transformantes por PCR e *Southern blot*, foi avaliada a patogenicidade de *C. gloeosporioides* em hipocótilos e em flores de *C. arabica*, por meio de inoculações com discos de micélio e suspensão de conídios, respectivamente. Foram utilizados isolados não transformados como controle. Os hipocótilos de mudinhas de café inoculados não apresentaram sintomas nem sinais do fungo. Além disso, não foi observado nenhum crescimento vegetativo ou reprodutivo do fungo marcado no interior dos tecidos, após a análise feita por microscópio de fluorescência em cortes histológicos. Entretanto foi possível re-isolar o fungo marcado a partir dos tecidos inoculados. Isso sugere que o fungo foi capaz de penetrar no hipocótilo, embora não tenha sido observada fluorescência nos tecidos. As inoculações em botões florais de café foram feitas visando detectar estruturas do fungo nos frutos em diferentes estádios de desenvolvimento (chumbinho, verde e maduro). As análises foram feitas por meio da observação da fluorescência dos tecidos. Embora existam alguns indícios de que o fungo penetrou nas flores de plantas de café inoculadas com o fungo marcado, evidenciado por pequenos pontos fluorescentes nos tecidos dos frutos, ainda é prematuro afirmar que *C. gloeosporioides* utiliza a flor para infectar a planta.

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

PATHOGENICITY OF *Colletotrichum gloeosporioides* IN COFFEE USING TRANSGENIC ISOLATES

ABSTRACT: The genus *Colletotrichum* is considered the causal agent of several diseases in a wide range of hosts. In coffee, *C. gloeosporioides* is associated with die back of the branches. Despite of that, it has not yet been possible to confirm its pathogenicity, since no external symptoms have been detected after inoculation. Therefore, there is a hypothesis that *C. gloeosporioides* is endophytic and opportunistic fungus on coffee and may cause injuries when the plant is under stress conditions. In order to elucidate the interaction between *C. gloeosporioides* and coffee isolates from *Coffea arabica* and *C. canephora* with symptoms of necrosis and greasy spot were marked with the gene *GFP*, which encodes a green fluorescent protein. After confirmation of transformants by PCR and Southern blot, the pathogenicity of *C. gloeosporioides* in hypocotyls and flowers of *C. arabica* was evaluated, using mycelium discs and conidial suspension, respectively. Wild type isolates were used as control. The inoculated hypocotyls showed no external symptoms or signs of the fungus. Furthermore, no vegetative or reproductive growth of the fungus was observed in the tissues, after the fluorescence analysis. However, the transgenic fungus could be re-isolated from the inoculated tissues. This suggests that the fungus was able to penetrate in the hypocotyls, although the fluorescence has not been detected in the tissues. The inoculations in flowers were performed to detect the fungus structures in coffee berries at different stages of development (pinhead, green and ripe fruits). The analyses were performed by fluorescent microscopy. Although there are some indications that the marked fungus penetrated in the inoculated flowers, evidenced by small fluorescent spots in the tissues of the fruits, it is still premature to affirm that *C. gloeosporioides* uses the flower to infect the plant.

Key words: pathogenicity, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Coffea arabica*.

INTRODUÇÃO

Apesar dos constantes relatos de antracnose em cafeeiro em condições de campo, existem poucos estudos sobre a caracterização do fungo e os danos diretos causados à planta. Isso gera dúvidas a respeito da patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* ao cafeeiro, das condições que favorecem a sua manifestação e dos prejuízos que pode causar. É importante salientar que a falta de conhecimento dos sintomas associados ao patógeno leva, muitas vezes, a diagnósticos errôneos. Em cafeeiro, *C. gloeosporioides* está associado à seca de ramos, folhas e frutos, embora ainda não tenha sido possível comprovar sua patogenicidade, uma vez que sintomas externos não aparecem após a inoculação. Diante disso, existe a hipótese de que *C. gloeosporioides* seja endofítico e oportunista ao cafeeiro, podendo causar injúrias quando a planta é submetida a determinadas condições de estresse.

O estudo da interação planta-fungo tem sido facilitado com a utilização da proteína verde fluorescente (GFP) como gene repórter (Maor et al., 1998), iniciada em 1996. Desde então têm sido reportados diversos estudos com *Colletotrichum acutatum*, *C. lindemuthianum*, *Ustilago maydis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Fusarium oxysporum*, dentre outros, e seus respectivos hospedeiros (Dumas et al., 1999; Maor et al., 1998; Spellig et al., 1996; Horowitz et al., 2002).

GFP é um polipeptídeo fluorescente de 27 kDa extraído da alga marinha *Aequorea victoria*, que absorve luz UV ou azul e emite na região verde do espectro (Cody et al., 1993). Diferentemente dos genes repórteres β -galactosidase e β -glucuronidase, também largamente utilizados em fungos, GFP não necessita de co-fatores, substratos exógenos ou oxigênio para sua atuação (Prasher et al., 1992).

Os fungos transgênicos expressando GFP são facilmente detectados na planta sem qualquer intervenção externa, fornecendo informações valiosas sobre o seu desenvolvimento *in situ* (Horowitz et al., 2002). Além disso, a marcação com GFP permite diferenciar o fungo inoculado de possíveis fungos parasitas presentes na planta. As análises são feitas por microscopia de fluorescência em um comprimento de onda determinado, de forma que apenas os isolados marcados sejam visualizados.

Diante desses fatos, este trabalho teve por objetivo estudar a patogenicidade de *C. gloeosporioides* ao cafeeiro por meio de isolados transgênicos do fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *C. gloeosporioides* coletados de Conillon (folhas com necrose) e de “Catuaí” (frutos e folhas com mancha manteigosa e necrose) foram marcados com a proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* - GFP), por protoplastização mediada por PEG (Rodríguez and Yoder, 1987 - com adaptações). A confirmação molecular dos transformantes foi feita por PCR, utilizando *primers* específicos para o gene de resistência *hph* presente no plasmídeo pSM1 (Inglis et al, 1999) e por meio de *Southern blot*. Os transformantes selecionados, contendo uma única cópia do plasmídeo pSM1, foram armazenados em sílica-gel a 4°C. A reativação dos isolados foi feita em meio batata-dextrose-ágar, a 22°C.

Sementes de *C. arabica* foram germinadas em vasos contendo substrato estéril, sob temperatura e fotoperíodo controlados. Hipocótilos no estágio palito de fósforo foram inoculados com e sem ferimento, utilizando-se discos de micélio dos diferentes transformantes. Os isolados não transformados foram utilizados como controle. Foram feitas três repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com duas plântulas. Os vasos foram mantidos em câmara úmida por 48 horas, com temperatura e fotoperíodo controlados. Após 30 dias, foram realizados os cortes histológicos, no intuito de verificar a presença do fungo no interior dos tecidos do hipocótilo inoculado por meio de microscopia de fluorescência.

A fim de verificar se a flor pode servir como via de entrada para *C. gloeosporioides*, plantas de *C. arabica* apresentando gemas florais na fase de abotoado foram inoculadas com os isolados transformados e não transformados, a seguir: 1) isolado de fruto de “catuaí”, 2) isolado de “catuaí” - mancha manteigosa, 3) isolado de Conillon - necrose. A inoculação foi feita injetando-se a suspensão (concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹) no interior do botão floral. Para cada isolado foram inoculados dois ramos contendo cinco rosetas. As plantas que serviram como testemunha foram inoculadas com água estéril. Após a inoculação, os ramos foram cobertos com saco plástico por 24 horas e mantidos em câmara de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados. O experimento encontra-se em andamento e sua avaliação está sendo realizada nos frutos em diferentes estádios de desenvolvimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *C. gloeosporioides* marcados com GFP apresentaram estabilidade fenotípica quando repicados periodicamente em meio seletivo contendo higromicina. Além disso, a expressão da proteína GFP foi confirmada pela

observação de fragmentos de micélio dos transformantes ao microscópio de fluorescência (Figura 1). Por meio da técnica de *Southern blot*, foi possível confirmar a presença de uma única cópia do plasmídeo pSM1 em todos os transformantes (Figura 2). Essa informação é de extrema importância, uma vez que a incorporação de mais de uma cópia pode causar recombinações, levando à perda de resistência à higromicina ou do gene GFP.

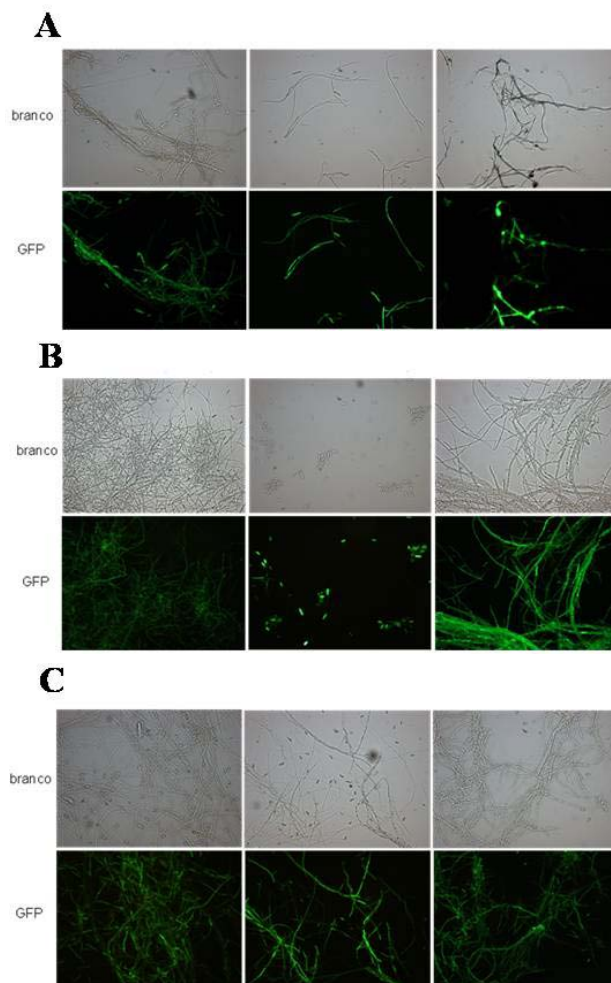


Figura 1 - Micrografias dos transformantes de *C. gloeosporioides*. Fragmentos de micélio e conídios dos transformantes observados ao microscópio de fluorescência Olympus BX-41, com objetiva de 20X. A emissão de fluorescência, mediante a utilização do filtro adequado (WB – azul), confirma a presença da proteína GFP (*green fluorescent protein*), e assim, a marcação do fungo. **A-** transformante de conillon (necrose), **B-** transformante de catuaí (mancha manteigosa), **C-** transformante de catuaí (fruto).

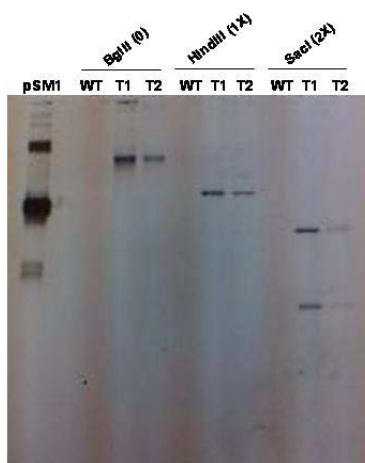


Figura 2 - Foto representativa da hibridização de um transformante de *C. gloeosporioides*, isolado de cafeeiro Conillon. Neste experimento foi utilizado o plasmídeo pSM1 como sonda (e como controle positivo). Os DNAs do isolado selvagem (WT) e de dois transformantes (T1 e T2) foram digeridos com as enzimas de restrição *BglII*, *HindIII* e *SacI*, capazes de clivar o plasmídeo 0, 1 e 2X, respectivamente. A banda única apresentada mediante clivagem com a enzima *BglII* (que não cliva o plasmídeo) confirma a presença de uma única cópia do plasmídeo nos transformantes.

No experimento com hipocótilos, após a análise visual foram realizados os cortes histológicos, no intuito de verificar a presença do fungo no interior dos tecidos. Entretanto, não foi observado o fungo marcado nestes tecidos (Figura 3A), embora tenha sido possível reisolar o fungo marcado a partir dos tecidos inoculados, tanto no tratamento ‘com fermento’ quanto no ‘sem fermento’ (Figura 3B). Esse resultado sugere que o fungo foi capaz de penetrar no hipocótilo, embora não tenha sido detectado nos tecidos. Diante desse fato, um novo experimento está sendo realizado na tentativa de esclarecer essas observações.

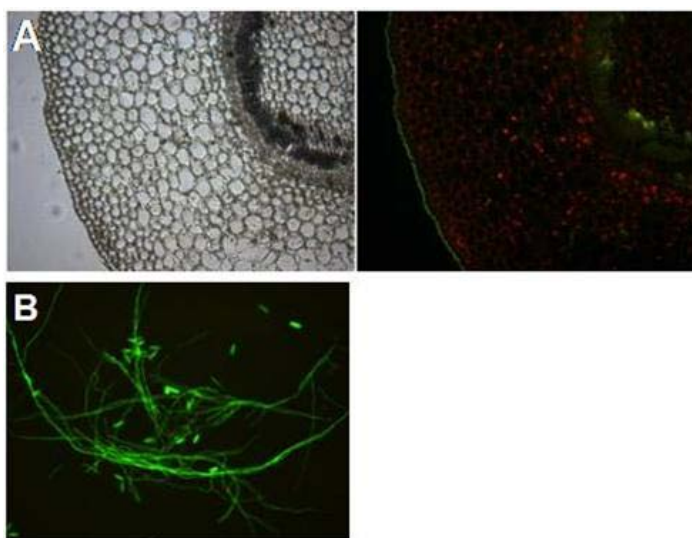


Figura 3 – Micrografias obtidas no microscópio de fluorescência Olympus BX-41, com as objetivas de 10 (A) e 20X (B). **A** – Corte histológico de hipocótilo inoculado com o transformante de *C. gloeosporioides* de Conillon. Luz branca (esquerda) e fluorescente (direita). O fungo marcado não foi visualizado no tecido. A autofluorescência observada corresponde aos componentes celulares que emitem fluorescência no mesmo comprimento de onda. **B** - Micrografia do transformante de *C. gloeosporioides* reisolado a partir de hipocótilos inoculados. A emissão de fluorescência confirma a presença do fungo marcado no tecido inoculado.

O experimento realizado com flores foi montado conforme ilustrado na Figura 4. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento sob temperatura e fotoperíodo controlados. As avaliações estão sendo feitas nos frutos, em diferentes estádios de desenvolvimento. Inicialmente, foram avaliados os frutos no estágio chumbinho (30 dias após a

inoculação). Em alguns cortes histológicos foram observados pequenos “pontos” fluorescentes, aparentemente correspondentes aos conídios dentro de algumas células (Figura 5). Tal situação não ocorreu com os cortes realizados nas plantas testemunhas, nos quais se observou apenas a autofluorescência dos tecidos (principalmente xilema). No entanto, não foi possível confirmar se esses “pontos” correspondem, de fato, ao fungo inoculado, embora seja um indício de que houve a penetração e infecção.

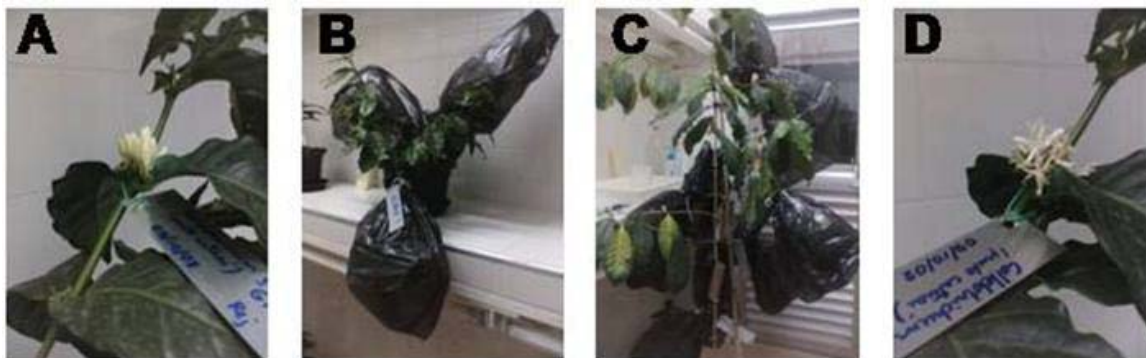


Figura 4 – Fotos ilustrativas do experimento montado com flores. As inoculações foram feitas em botões florais (A) em ramos de *C. arabica*. Após inoculação, os ramos foram cobertos com saco plástico (B e C) e mantidos nessa condição por 24 horas. Na figura D é possível visualizar as flores já abertas.

Para tentar esclarecer essa questão, novas análises foram realizadas com frutos verdes (60 dias após a inoculação), sendo observado o mesmo resultado (Figura 6).

O experimento encontra-se em andamento e novas avaliações serão feitas em frutos maduros. Com os resultados obtidos será possível confirmar se *C. gloeosporioides* é patogênico ao cafeeiro e, principalmente, se a flor pode servir como via de entrada para o fungo.

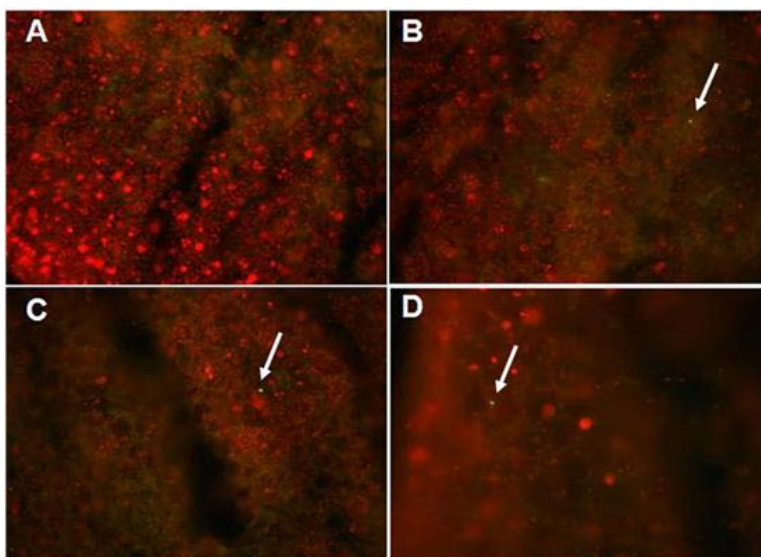


Figura 5 – Micrografias de cortes histológicos de frutos, 30 dias após a inoculação. As micrografias foram obtidas ao microscópio de fluorescência Olympus BX-41. A- testemunha (objetiva 20X). B- transformante de Catuaí- mancha manteigosa (obj. 20X). C e D- transformante de Conillon- necrose (objetivas de 10X e 20X, respectivamente). As setas apontam para possíveis esporos dos transformantes.

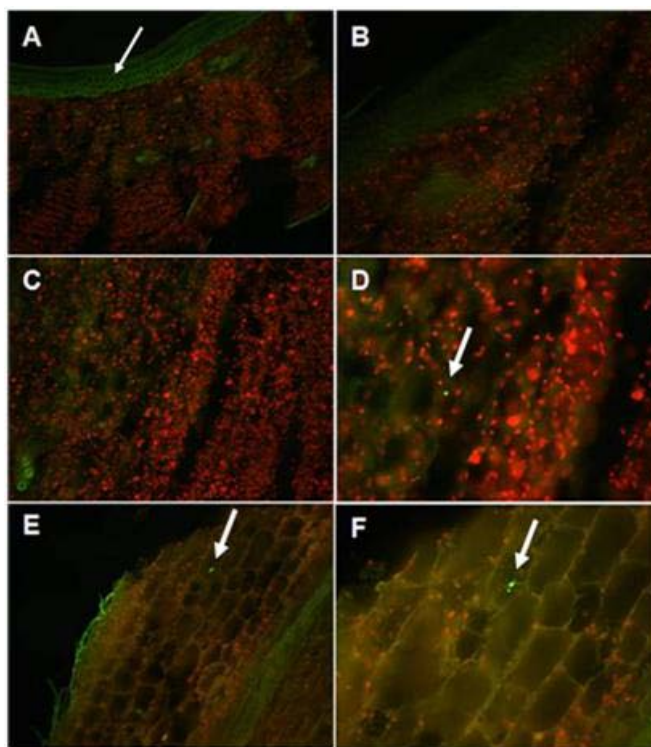


Figura 6 – Micrografias de cortes histológicos de frutos 60 dias após a inoculação. A e B- testemunha (objetivas de 10 e 20X, respectivamente). **C e D-** transformante de Catuaí- mancha manteigosa (obj. de 10 e 20X, respectivamente). **E e F-** transformante de Conillon- necrose (obj. de 20 e 40X, respectivamente). A seta em ‘A’ aponta para o tecido xilemático, enquanto que as demais apontam para possíveis esporos dos transformantes.

CONCLUSÕES

- 1- Foi possível obter diferentes isolados de *C. gloeosporioides* expressando GFP. Todos os transformantes continham uma única cópia do plasmídeo pSM1 e se mantiveram estáveis fenotipicamente.
- 2- *Colletotrichum gloeosporioides* não induziu sintomas ou sinais do fungo em hipocótilos de mudinhas de café.
- 3- Embora existam alguns indícios de que o fungo penetrou nas flores de plantas de café inoculadas com o fungo marcado, evidenciado por pequenos pontos fluorescentes nos tecidos dos frutos, ainda é prematuro afirmar que *C. gloeosporioides* utiliza a flor como via de penetração para se alojar nos frutos de café em formação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CODY, C.W., PRASHER, D.C., WESTLER, W.M., PRENDERGAST, F.G., WARD, W.W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemistry**, 32: 1212–1218, 1993.
- DUMAS, B., CENTIS, S., SARRAZIN, N., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: 1769–1771, 1999
- HOROWITZ, S., FREEMAN, S., SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, 92:743-749, 2002.
- INGLIS, P.W., QUEIROZ, P.R., VALADARES-INGLIS, M.C. Transformation with green fluorescent protein of *Trichoderma harzianum* 1051, a strain with biocontrol activity against *Crinipellis pernicioso*, the agent of witches' broom disease of cocoa. **J. Gen. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 31: 358-365, 1999.
- MAOR, R., PUYESKY, M., HORWITS, B.A., SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycol. Res.**, 102: 491-496, 1998.

- PRASHER, D.C., ECKENRODE, V.K., WARD, W.W., PRENDERGAST, F.G., CORNIER, M.J. Primary structure of *Aequoria Victoria* green fluorescent protein. **Gene**, 111:229-233, 1992.
- RODRIGUEZ, R. J., YODER, O. C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. phaseoli (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Gene**, 54:73-81, 1987.
- SPELLIG, T., BOTTIN, A. KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Mol Gen Genet**, 252: 503–509, 1996.