

**QUIMIOTERAPIA E TERMOTERAPIA NO
CONTROLE DO *Colletotrichum gloeosporioides*,
AGENTE DA MANCHA MANTEIGOSA, EM
CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**

JUCILAYNE FERNANDES VIEIRA

2009

JUCILAYNE FERNANDES VIEIRA

**QUIMIOTERAPIA E TERMOTERAPIA NO CONTROLE DO
Colletotrichum gloeosporioides, AGENTE DA MANCHA
MANTEIGOSA, EM CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Vieira, Jucilayne Fernandes.

Quimioterapia e Termoterapia no controle do *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa, em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Jucilayne Fernandes Vieira. – Lavras : UFLA, 2009.
70 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.

Bibliografia.

1. Café 2. Germinação 3. Sanidade 4. Semente 5. Fruto. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.73952

JUCILAYNE FERNANDES VIEIRA

**QUIMIOTERAPIA E TERMOTERAPIA NO CONTROLE DO
Colletotrichum gloeosporioides, AGENTE DA MANCHA
MANTEIGOSA, EM CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2009

Dr^a Sara Maria Chalfoun

EPAMIG

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

UFLA

Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

OFEREÇO.

Ao Dr. Zilton Cordeiro que despertou em mim o desejo pela pesquisa, que ensinou- me muito sobre fitopatologia, sobre profissionalismo e sobre a vida.

Ao Prof. Dr. Mario Sobral que na sua simplicidade demonstrou a grandeza de ser um orientador e amigo, e no desenvolvimento desta dissertação, mostrou-se solícito e companheiro no desempenho com que abraça todas as tarefas.

DEDICO.

À minha família que é meu porto seguro e minha razão de viver.

A minha mãe e ao meu pai (Leide e Jú) que sempre incentivaram os meus estudos e, muitas vezes, abriram mão de seus sonhos em detrimento dos meus. Para eles todo meu respeito e amor.

As minhas queridas irmãs (Josi, Aline e Helen) pela cumplicidade e amor que nos une.

Ao meu sobrinho Gabriel que torna os meus dias mais felizes.

As minhas tias (Carminha “vida”, Ilma, Dida, Irene e Lúcia) e os meus tios (Arlindo, Adalto, Hamilton, Afonso e Valmir “*in memoriam*”), pelo amor tão sincero e por todo incentivo “sempre”.

A meus avós e avós que são uma inspiração em minha vida.

A todos os primos e primas pelo companheirismo e amizade.

Ao meu cunhado pelo carinho e amizade.

A todos os amigos e amigas que alegam minha vida.

Enfim, a toda a minha família do Sinimbu- AL, minha de coração, onde cresci e onde me sinto tão feliz.

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é um momento de reflexão sobre o caminho percorrido, e nos faz lembrar sempre de todos aqueles que contribuíram para que pudéssemos chegar a um projeto final, o que, no meu caso, foi à dissertação concluída”.

A Deus por todas as bênçãos recebidas em toda a minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. Mario Sobral de Abreu, pela boa orientação, pela atenção, incentivo, ensinamentos e confiança na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Vicente Campos e Dr^a Sara Maria Chalfoun de Souza, pela colaboração e valiosas sugestões apresentadas.

A todos os professores do Curso de Fitopatologia, em especial a Eduardo Alves, por contribuírem para minha formação profissional.

Aos funcionários do departamento de Fitopatologia; Vlademir, Rute, Eliane, Eloísa, Edinho, Jaqueline, Ana, Miriam, Carzim e em especial a Bruno Marques.

Aos funcionários do departamento de sementes, em especial à Elenir e Elza.

Aos funcionários e alunos do departamento de patologia de sementes, em especial à Ângela, ao Pepé, a Biotita, ao Cláudio.

Aos estagiários e amigos do departamento de diagnose de doença de plantas; Felipe, Rodrigo, Régis, Mateus, Stélio, Cecília, Josi, Angélica e em especial a Cláudio Ogoshi.

Aos estagiários do departamento de microscopia eletrônica de varredura, em especial a Douglas, Renato e Fabiano.

Ao amigo Eudes pela amizade e pela ajuda na estatística do trabalho.

Aos meus amigos do mestrado; André (Dedé), Rodrigo, João, Esdras, Adriano, Flávia, Vanessa, Carla, Carol, Valquíria, Ana Beatriz, Bernardo,

Luana, Rejane, Lahyre e Amanda, Mirela, Erika, Hebe, Carla e Juliano pela amizade.

Ao amigo Fabrício Amorim pela amizade e sugestões.

As amigas Rosana, Fernanda e Luciane, pelo companheirismo, amizade, pela alegria de compartilhar tantos momentos juntas e pela preciosa ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos, Évio, Paulo, Ricardo, Edi, Bibi, Jader, Fran, Eustáquio, Verônica, Leandro, Ana Paula, Jair e Augusto pela boa convivência, pelo companheirismo e amizade.

A Vanessa, Aninha, Pedro e Lívia, por toda ajuda nas análises bioquímicas.

E em especial aos amigos Cleilton, Elma, Waldete, Euzi, Patrícia, Vitória e Bruno que me acompanham desde a Escola de Agronomia, o meu agradecimento de todo meu coração por todos esses anos compartilhados, pela sincera amizade e por todo carinho e respeito que nos une.

As amigas de república Elma, Pati e Tânia, pela amizade e cumplicidade, durante esses dois anos de convivência em Lavras.

A fazenda Laje e a Epamig, pelas sementes cedidas.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para execução deste trabalho.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1 Quimioterapia e termoterapia no controle de <i>C. gloeosporioides</i> , agente da mancha manteigosa, em cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.).....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
CAPÍTULO 2 Tratamento químico no controle de <i>C. gloeosporioides</i> em sementes de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.).....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 Obtenção de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> de cafeeiros.....	16
2.2 Origem do lote de sementes.....	17
2.3 Inoculação das sementes.....	17
2.4 Teste de sanidade.....	17
2.5 Teste de germinação.....	18
2.6 Tratamento químico de sementes no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	18
2.7 Delineamento experimental.....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 Tratamento químico de sementes no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	20
4. CONCLUSÕES.....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 3 Tratamento térmico no controle de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em sementes cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.).....	27
RESUMO.....	28

ABSTRACT.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 Obtenção de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> de cafeeiros.....	31
2.2 Origem dos lotes.....	31
2.3 Inoculação das sementes.....	31
2.4 Teste de sanidade.....	32
2.5 Teste de germinação.....	32
2.6 Experimento 1: Influência da termoterapia na qualidade fisiológica e sanidade de sementes de café inoculadas com isolado 1 de <i>C. gloeosporioides</i>	33
2.6.1 Delineamento experimental.....	33
2.7 Experimento 2 : Influência da termoterapia na qualidade fisiológica e sanidade de sementes de café inoculadas com isolado 2 de <i>C. gloeosporioides</i>	34
2.7.1 Delineamento experimental.....	34
2.8 Experimento 3: Influência da termoterapia na qualidade fisiológica e sanidade de sementes de café coletadas de plantas com sintomas de mancha manteigosa	34
2.8.1 Delineamento experimental.....	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1 Experimento 1: Influência da termoterapia na qualidade fisiológica e sanidade de sementes de café inoculadas com isolado 1 de <i>C. gloeosporioides</i>	36
3.2 Experimento 2: Influência da termoterapia na qualidade fisiológica e sanidade de sementes de café inoculadas com isolado 2 de <i>C. gloeosporioides</i>	39
3.3 Experimento 3: Influência da termoterapia na qualidade fisiológica e sanidade de sementes de café coletadas de plantas com mancha manteigosa.....	41

4. CONCLUSÕES.....	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 4 Controle e alterações bioquímicas em frutos de cafeeiro inoculados com <i>C. gloeosporioides</i> e submetidos à termoterapia.....	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	52
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Obtenção dos frutos de cafeeiro.....	53
2.2 Inoculação de <i>C. gloeosporioides</i> nos frutos.....	53
2.3 Experimento 1: Influência da termoterapia em frutos no controle de <i>C. gloeosporioides</i> e fungos associados à semente de cafeeiro.....	54
2.3.1 Delineamento experimental.....	54
2.4 Experimento 2: Alterações bioquímicas em cafeeiros inoculados com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e submetidos a termoterapia.....	55
2.4.1 Preparo do extrato bruto de frutos de café para a avaliação de proteínas totais, da atividade de guaiacol peroxidase e da polifenoloxidase.....	55
2.4.2 Determinação do conteúdo de fenóis solúveis totais.....	56
2.4.3 Determinação de proteínas totais.....	56
2.4.4 Determinação da atividade de guaiacol peroxidase.....	56
2.4.5 Determinação da atividade de polifenoloxidase.....	57
2.4.6 Delineamento experimental.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.1 Experimento 1: Influência da termoterapia em frutos no controle de <i>C. gloeosporioides</i> e fungos associados à semente de cafeeiro.....	58
3.2 Experimento 2: Alterações bioquímicas em cafeeiros inoculados com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e submetidos à termoterapia.....	59
3.2.1 Teores de proteína total, fenóis solúveis totais e atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em frutos verdes e maduros.....	59

4 CONCLUSÕES.....	64
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
ANEXOS	68

RESUMO

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Quimioterapia e termoterapia no controle do *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa, em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

As sementes desempenham papel fundamental na disseminação de fitopatógenos a longas distâncias e transmissão desses à planta. Em muitas culturas, os fungos fitopatogênicos podem associar-se às sementes em todas as etapas de produção e manterem-se viáveis por muito tempo. Para a cafeicultura, a transmissibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* pela semente, agente causal da mancha manteigosa, constitui-se num grande problema, uma vez que as lavouras de café são formadas a partir de mudas obtidas de sementes. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da quimioterapia (em sementes) e da termoterapia (em frutos e sementes) na qualidade sanitária e germinação de sementes e possíveis alterações bioquímicas nos frutos. Para avaliação da eficiência do controle químico em sementes inoculadas com isolado obtido de sementes de plantas sem sintoma de mancha manteigosa (isolado 1), os produtos testados (g i. a/100 kg de sementes) foram: pencycuron (250), tolyfluanid (500), carbendazim+thiram (150+350), fludioxonil (25), tiram (480) e triadimenol (150). O tratamento térmico foi realizado pela imersão das sementes não inoculadas, ou inoculadas com isolado 1, ou com o isolado obtido de ramos com sintomas de seca de ponteiros de plantas com mancha manteigosa (isolado 2) em água a 50 e 60 °C, por 1 minuto, 7 minutos e 30 segundos e 15 minutos, em banho-maria. Os frutos inoculados com isolado obtido de frutos (isolado 3) de plantas sem sintomas de mancha mateigosa, ou sem inoculação foram submetidos à termoterapia por 1 minuto em banho-maria. Amostras dos frutos inoculados foram coletadas para análises bioquímicas. Foram realizados os testes de sanidade pelo método “Blotter test” e germinação em rolo de papel. O tratamento químico foi eficiente na redução da incidência de *C. gloeosporioides* nas sementes de cafeeiro. As sementes tratadas com os fungicidas tolyfluanid, tiram e triadimenol apresentaram as maiores porcentagens de plântulas normais germinadas. A termoterapia demonstrou-se eficiente em frutos e sementes controlando *C. gloeosporioides*. Entretanto, a temperatura de 60° C por 15 minutos não deve ser usada por ser prejudicial à germinação das sementes de café, visto que promove a morte do embrião. Observou-se variação nos teores de proteína total, fenóis solúveis totais, e nas atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase a depender do isolado utilizado na inoculação dos frutos.

¹ **Comitê orientador:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Chemotherapy and thermotherapy to control of *Colletotrichum gloeosporioides*, agent of blister spot, in coffee (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 70p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Pathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

Seeds play a fundamental role in the dissemination of plant pathogens to long distances and transmission of them to plant. In many crops, fungi can be associated with seeds in all the stages of crop production in addition to surviving longer. For coffee plantation, the transmission by seeds of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of blister spot is a big problem, because most of the plantations are formed by seedlings obtained from seeds. In this context, the objectives of this present work were to evaluate the efficiency of the chemotherapy (in seeds) and thermotherapy (in fruits and seeds) in the seeds healthy and germination quality and possible biochemical changes in the fruits. For evaluation of the efficiency of the chemical control in inoculated seeds with isolates obtained from seeds of plants without blister spot symptom (isolate 1), the following products were tested: (g of a. i. /100 kg of seeds): pencycuron (250), tolyfluanid (500), carbendazim+thiram (150+350), fludioxonil (25), tiram (480) and triadimenol (150). The thermal treatments was done by immersing the non-inoculated seeds or the inoculated ones with isolated 1, or with the isolate obtained from shoot die-back of coffee (isolated 2) in hot water at (50 e 60 °C, per 1 minute, 7 minutes and 30 seconds and 15 minutes) in water bath. The not inoculated or inoculated fruits (with isolate obtained from coffee fruits - isolated 3) of plants without symptoms of blister spot were submitted to the thermotherapy per 1 minute in water bath. Samples of the inoculated fruits were collected for biochemical analyses. The blotter and germination (by paper roll) test were carried out. The chemical treatments were efficient for the reduction of the incidence of *C. gloeosporioides* in the coffee seeds. The seeds treated with the fungicides tolyfluanid, tiram and triadimenol presented the biggest percentages of normal germinated seedlings. The thermotherapy demonstrated efficient in fruits and seeds on the controlling *C. gloeosporioides* in coffee seeds. However, the temperature of 60° C per 15 minutes should not be used because is harmful for the coffee seed germination causing seed embryo death. There were variations in total protein, total soluble phenols, and in the activities of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes when different isolates are used in the inoculation of the fruits.

¹ Advising Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Adviser)

CAPÍTULO 1

QUIMIOTERAPIA E TERMOTERAPIA NO CONTROLE DO *Colletotrichum gloeosporioides*, AGENTE DA MANCHA MANTEIGOSA, EM CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é uma cultura de grande importância econômica e social no mundo. O Brasil se destaca como o maior produtor e exportador mundial de café, com área total cultivada de arábica e conilon estimada em 2,35 milhões de hectares, dos quais, 228,2 mil hectares (9,7%) estão em formação e 2,12 milhões de hectares (90,3%) em produção. Municípios dos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia e Rio de Janeiro são responsáveis por 98,2% da produção nacional, aproximadamente. O Estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional com aproximadamente 1,01 milhões de hectares e produção estimada entre 17,9 e 18,9 milhões de sacas de café beneficiado para a safra 2009 (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2009).

Dentre os fatores responsáveis pela redução na produção e qualidade do café destacam-se os problemas fitossanitários ocasionados principalmente por fungos como *Hemileia vastatrix* Berk. & Br e a *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke agentes etiológicos da ferrugem e da cercosporiose (Zambolim et al., 2005), respectivamente, bem como espécies do gênero *Colletotrichum* spp.

Espécies de *Colletotrichum* spp. foram encontradas em todos os estágios de desenvolvimento e órgãos do cafeeiro: como ramos, folhas, flores e frutos (Ferreira et al., 2003), constituindo-se num complexo de doenças representado pela mancha manteigosa (Orozco Miranda, 2003), antracnose de folhas e frutos (Pereira & Chaves, 1978), seca ou morte de ponteiros (Voltan et al., 2002), queima castanha (Hocking, 1966) e a antracnose-dos- frutos-verdes ou “*Coffee Berry Disease*” (CBD) (Waller et al., 1993). Importante salientar que “*Coffee Berry Disease*” (CBD) causado por *Colletotrichum kahawae*, está restrita à África (Orozco Miranda, 2003).

A mancha manteigosa, destaca-se no patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro por ser altamente deletéria ocasionando a diminuição progressiva na

produtividade devido a morte de hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos, culminando com a morte dos cafeeiros infectados (Ferreira et al., 2005), apesar de ser uma doença de baixa progressão no tempo e no espaço (Ferreira et al., 2006, dados não publicados). Para a cafeicultura, a transmissão de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha manteigosa, pela semente (Lins, 2006; Ferreira et al., 2009) constitui-se num grande problema, uma vez que as lavouras de café são formadas a partir de mudas obtidas de sementes.

Em experimento desenvolvido com sementes de café, Orozco Miranda et al. (2002a,b) observaram incidência de *Colletotrichum* spp. nas cultivares Catuaí Amarelo (14%) e Catuaí Vermelho (10%) (com sintomas de mancha manteigosa) e Catuaí Vermelho (6%) e Acaiaí Cerrado (4%) (sem sintomas de mancha manteigosa), concluindo que o patógeno pode ser transmitido pela semente e que as cultivares com sintomas de mancha manteigosa têm maior expressão na transmissibilidade. Nas cultivares Topázio e Rubi, observaram maiores porcentagens de incidência de *Colletotrichum* spp., além da presença desse fungo em todos os tecidos estudados, enquanto que as cultivares Mundo Novo e Icatu apresentaram as menores colonizações. Após a emergência das plântulas, quando da abertura dos primeiros folíolos foi observada a presença de *Colletotrichum gloeosporioides* com as mesmas características morfológicas das colônias originais caracterizando a transmissibilidade via semente.

As espécies de *Colletotrichum* do cafeeiro são parasitas facultativos. A fase saprofítica pode se constituir em importante fonte de inóculo para a sua disseminação. Períodos contínuos de alta umidade (7 a 10 dias de chuva), temperaturas amenas em torno de 22 °C e altitude elevada favorecem o desenvolvimento de *Colletotrichum* spp. que passa da fase saprofítica para a parasítica (Paradela Filho et al., 2001).

Muitas espécies de fungos, normalmente saprófitas, tornam-se parasitas de plântulas (Carvalho & Nakagawa, 2000). Os fungos saprófitas,

segundo Neegaard (1979), colonizam as sementes sob condições de umidade relativa entre 85 a 95%, podendo reduzir a qualidade fisiológica das mesmas, sendo que essa associação de patógenos com sementes pode ocorrer por contaminação superficial ou por colonização dos tecidos internos. Quando esses fungos estão associados internamente há maior possibilidade de transmissão às plântulas, entretanto, quando externamente, os danos serão nas fases iniciais da germinação. Segundo Menten (1995), essa interferência dos patógenos associados às sementes pode determinar redução da população de plantas, além de afetar negativamente o vigor das mudas e causar desenvolvimento de epidemias. Além disso, apresentam capacidade de sobreviver em ambientes com baixa umidade relativa, proliferando em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes até a sua morte, em consequência das alterações fisiológicas e químicas que ocorrem nos tecidos (Sittisrourng, 1970).

Neste contexto, a obtenção de sementes de café de alta qualidade fisiológica e sanitária é de fundamental importância (Ferreira et al., 2004), sendo que o controle fitossanitário das sementes tem proporcionado bons resultados na produtividade, além de lavouras mais vigorosas.

Segundo Machado (2000), a redução de fungos pode ser eficientemente alcançada pelo manejo e tratamento das sementes por métodos biológicos, físicos ou químicos. O tratamento químico constitui-se numa das medidas mais antigas e eficientes de controle de doenças de plantas, apresentando, normalmente, ação direta sobre a fonte de inóculo do patógeno (Menten, 1995).

A destruição de esporos da superfície da semente depende de uma série de fatores, dentre os quais, destacam-se a espécie de fungo, a condição fisiológica da semente, a intensidade de contaminação superficial, o tipo de tratamento, o pH, a concentração do desinfetante, o tipo de tratamento e o tempo de contato com o produto (Muniz et al., 2007).

Assim, o tratamento das sementes com produtos químicos como fungicidas, bactericidas e/ou inseticidas, dependendo das condições, é

importante na preservação do vigor e para evitar ou reduzir a ação prejudicial dos microrganismos (Carvalho & Nakagawa, 2000).

Vários produtos têm sido utilizados para controlar patógenos associados às sementes, destacando-se o iprodione (Pereira et al., 2002) e carboxin/thiram em sementes de arroz (Schuch et al., 2006); hipoclorito de sódio em sementes de amendoim e de espécies florestais (Muniz et al., 2007); thiram + carbendazin em sementes de cenoura (Medeiros et al., 2006). Entretanto, para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, na cultura do cafeeiro não existem produtos registrados (Agrofit, 2009).

Além do controle químico, vários métodos alternativos para o tratamento de sementes e frutos têm sido propostos, nos últimos anos, destacando-se o tratamento via calor úmido. O tratamento térmico baseia-se no efeito de temperaturas elevadas sobre a atividade celular dos patógenos. A maioria dos micro-organismos fitopatogênicos apresenta ponto térmico letal nas temperaturas entre 45 e 60 °C. O mecanismo mais provável responsável pela morte em altas temperaturas é resultante da desnaturação de proteínas e enzimas, importantes para o metabolismo celular (Cochrane, 1958; Deverall, 1965).

A técnica de controle de fungos transmitidos por sementes utilizando calor seco ou úmido tem apresentado resultados promissores e foi considerado viável nos procedimentos fitossanitários de quarentena (Leon & Grudloyma, 1994), além do controle químico anteriormente citado. Por meio desta terapia foram controlados e/ou erradicados diversos patógenos, entre eles *Phoma betae* Frank em sementes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) (Bottcher & Horn, 1992), *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. em sementes de *Brassica juncea* Coss. (Randhawa & Aulakh, 1984), *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Fonseca et al., 1994).

A termoterapia, além de reduzir consideravelmente os fungos que contaminavam superficialmente sementes, aumentou o poder germinativo das mesmas (Donald & Lundquist, 1988) e vigor (Raju & Sivaprakasan,

1989). O tratamento térmico pode, ainda, provocar reação de defesa em plantas superiores (Schweizer et al., 1995), como a produção de fitoalexinas, barreiras estruturais supressivas para a colonização do fungo como deposição de ligninas (Stermer & Hannerschidt, 1984), mudanças na taxa e tipo de proteína sintetizadas (Loomis & Wheeler, 1980), decréscimo de algumas enzimas relacionadas com o metabolismo de proteção de plantas, dentre outras. Em alguns casos, decréscimo na atividade da peroxidase (PO) e suscetibilidade induzida associado com alta temperatura do tratamento térmico, antes da inoculação, foram observados em interações patógeno-hospedeiro (Zacheo et al., 1995).

Dessa forma, a termoterapia que tem se apresentado como uma técnica eficiente de erradicação de patógenos, em sementes e frutos, pode constituir-se numa alternativa para o controle de *C. gloeosporioides* em frutos e sementes de café. Entretanto, tornam-se necessários o estudo e aperfeiçoamento principalmente com relação às temperaturas de exposição e ao teor de água das sementes, bem como no seu efeito na qualidade fisiológica das sementes e qualidade dos frutos.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da quimioterapia (em sementes) e da termoterapia (em frutos e sementes) no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, através da análise da qualidade sanitária e germinação de sementes e possíveis alterações bioquímicas nos frutos.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxico fitossanitário**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 7 fev. 2009.

BOTTCHER, I.; HORN, G. Investigations for destroying the seed-borne black leg fungus of sugarbeet, *Phoma betae* Frank (teleomorph *Pleospora bjoerlingii* Byford), by heat treatment. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.28, p.39-42, 1992.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 427p.

COCHRANE, V.W. **The physiology of fungi**. New York: J. Wiley & Sons, 1958. 313p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2009**: primeira estimativa, janeiro/2009. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <<http://www.Conab.gov.br>>. Acesso em: 7 fev. 2009.

DEVERALL, B.J. The physical environment for fungal growth. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. (Ed.). **The fungi: an advanced treatise**. New York: Academic, 1965. v.1, p.543-560.

DONALD, D.G.M.; LUNDQUIST, J.E. Treatment of Eucalyptus seed to maximise germination. **South African Forestry Journal**, Pretoria, v.149, p.9-15, 1988.

FERREIRA, J. B., ABREU, M. S ., PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.

FERREIRA, J.B.; MARQUES, D.C.; PEREIRA, I.S.; ABREU, M.S. Estudo da incidência de *Colletotrichum* spp. nos estágios de formação do fruto de diferentes cultivares de *Coffea Arabica* L. In: CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO, 12., 2003, Lavras, MG. **Resumos...** Lavras: UFLA/APG, 2003. CD-ROM.

FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; ABREU, M.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, jul./ago. 2005.

FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; FERNANDES, K.D.; ABREU, M.S. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica*

L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. CD-ROM.

FONSECA, J.N.L.; MENDES, M.A.S.; PINHEIRO, F.P.; VIDAL, A.S. Efeito da termo e quimioterapia em sementes de soja contaminadas com *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.19, p.297, 1994. Resumo.

HOCKING, D. Brown blight (*Colletotrichum coffeanum* Noack.) of arabica coffee in East Africa. **Annals of Applied Biology**, London, v.58, p.409-421, 1966.

LEON, C. de; GRUDLOYMA, U. Heat therapy of maize seed and its effect on viability. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.47, p.1, 1994.

LINS, S.R. de. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião.** 2006. 104p. (Metrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LOOMIS, W.; WHEELER, S. Heat shock response of *Dietyotelium*. **Biology**, v.79, p.399-408, 1980.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MEDEIROS, E.M.; BAUDET, L.; PERES, W.B.; PESKE, F.B. Recobrimento de sementes de cenoura com aglomerante em diversas proporções e fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.3, p.94-100, 2006.

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico.** Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1995. 312p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology.** London: The MacMillan, 1979. 1191p.

MUNIZ, M.F.B.; SILVA, L.M.; BLUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.29, n.1, p.140-146, 2007.

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, Lavras, MG.

OROZCO MIRANDA, E.F.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M.S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Anais...** Sete Lagoas, 2002a. p.59.

OROZCO MIRANDA, E.F.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M.S. Transmissão de *Colletotrichum* spp. por sementes de café arábica (*Coffea arábica* L.). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Anais...** Sete Lagoas, 2002b. p.93.

PARADELA FILHO, O.; PARADELA, A.L.; THOMAZIELLO, R.A.; RIBEIRO, I.J.A.; SUGIMORI, M.H.; FAZUOLI, L.C. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. (Boletim técnico IAC, 191). 11p.

PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Antracnose do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, ano 4, n.44, p.82-90, ago. 1978.

PEREIRA, L.A.A.; COUTINHO, W.M.; MACHADO, J.C.; MAGALHÃES, F.H.L.; PENA, R.C.M. Fungitoxicidade *in vitro* de iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam a sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.24, n.1, p.67-70, 2002.

RAJU, U.J.; SIVAPRAKASAM, K. Influence of seed treatment with fungicides, bactericide, hot water and antagonists on the seedling vigour of cabbage. **Madras Agricultural Journal**, v.76, p.26-30, 1989.

RANDHAWA, H.S.; AULAKH, K.S. Efficacy of hot water treatment to control seed-borne fungi of raya (*Brassica juncea* Com.). **Indian Journal of Plant Pathology**, New Delhi, v.4, p.73-76, 1984.

SCHUCH, J.Z.; LUCCA-FILHO, O.A.; PESKE, S.T.; DUTRA, L.M.C.; BRNACÃO, M.F.; ROSENTHAL, M.D. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de arroz com diferentes graus de umidade e tratadas com fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.1, p.45-53, 2006.

SCHWEIZER, P.; VALENTIAN, M.; BINDSCHEDLERN, M. E. Heat: induced resistance in Barley to the Powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. **Physiological and Molecular Pathology**, v.43, p.51-66, 1995.

SITTISROUNG, P. **Deterioration of rice (*Oryza sativa* L.) seed in storage, and its influence on field performance.** 1970. 91p. Thesis (Ph.D.)-Mississippi State University, State College.

STERNER, B.A.; HAMMERSHIDT, R. Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerium* and enhances peroxidase activity in cucumbers. **Physiological Plant Pathology**, v.25, p.239-234, 1984.

VOLTAN, R.B.Q.; CABRAL, L.P.; PARADELA FILHO, O. Avaliação preliminar do efeito do *Colletotrichum* spp. na estrutura de plantas de cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu, MG. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro, 2002. p.364-365.

WALLER, J.M.; BRIDGE, P.D.; BLACK, R.; HAKIZAT, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, n.8, p.989-994, Aug. 1993.

ZACHEO, G.; BLEVE-ZACHEO, T.; PACODA, D.; ORLANDO, C.; DUNBIM, R.D. The association between heat- induced susceptibility of tomato to *M. incognita* and peroxidase activity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.491-507, 1995.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, E.M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.165-180.

CAPÍTULO 2

TRATAMENTO QUÍMICO NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM SEMENTES DE CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)

RESUMO

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Tratamento químico no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Para a cafeicultura, a transmissão de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha manteigosa, pela semente constitui-se num grande problema, uma vez que a maioria das lavouras de café é formada a partir de mudas obtidas de sementes. O tratamento de sementes com fungicidas parece ser alternativa importante no controle do fungo dentre as estratégias de manejo dessa doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de alguns fungicidas no tratamento de sementes de cafeeiro para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides*. Para os testes de laboratório “blotter test” e de germinação, foram utilizadas sementes da cv. Catuaí Vermelho, inoculadas artificialmente. Os produtos testados (g i. a/100 kg de sementes) foram: pencycuron (250), tolyfluanid (500), carbendazim+thiram (150+350), fludioxonil (25), tiram (480) e triadimenol (150). Todos os fungicidas reduziram a incidência do fungo nas sementes, em comparação à testemunha não tratada. Os tratamentos que proporcionaram as maiores porcentagens de plântulas normais germinadas foram: o tolyfluanid (500), o triadimenol (150g) e tiram (480).

¹ **Comitê orientador:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Chemical control of *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee seeds (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 70p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Pathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

For the coffee plantation, the transmission of *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of butterfly spot, by seeds represents a big problem, because the majority of the coffee plantations are formed by seedlings obtained from seeds. The treatment of seeds with fungicides seems to be an important alternative to the control of these fungi among the strategies of controlling of this disease control. The objective of this research was to evaluate the efficiency of some fungicides in the coffee seeds' treatment to control of *Colletotrichum gloeosporioides*. In lab, seeds cv. Catuaí Vermelho, artificially inoculated, were submitted to the "Blotter" and germination tests. The fungicides (g of a. i. /100 kg of seeds) tested were pencycuron (250), tolyfluanid (500), carbendazim+thiram (150+350), fludioxonil (25), tiram (480) e triadimenol (150). All fungicides reduced the fungi of the coffee seeds when compared to the control treatment. The treatments that presented the highest percentage of seeding germination were tolyfluanid (500 of a. i. /100kg of seeds), tiram (480g of a. i. /100kg of seeds), and baytan (150 of a. i. /100kg of seeds).

¹ Advising Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Adviser)

1 INTRODUÇÃO

Em muitas culturas, os fungos fitopatogênicos podem associar-se às sementes em todas as etapas de produção. Esta associação é responsável, muitas vezes, pela redução da qualidade fisiológica das sementes, representando uma das vias mais eficientes de transporte de fitopatógenos a longas distâncias e transmissão desses à planta pela semente.

No patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro, a mancha manteigosa causada por *Colletotrichum gloeosporioides* destaca-se por ser altamente deletéria ocasionando a diminuição progressiva na produtividade devido à morte de hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos, culminando com a morte dos cafeeiros infectados (Ferreira et al., 2005). Para a cafeicultura, a transmissão de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha manteigosa, pela semente (Lins, 2006; Ferreira et al., 2009) constitui-se num grande problema, uma vez que as lavouras de café são formadas a partir de mudas obtidas de sementes. A obtenção de sementes de café de alta qualidade fisiológica e sanitária é fundamental (Ferreira et al., 2004), sendo imprescindível a aplicação de métodos de controle de fitopatógenos. Por “qualidade” de sementes refere-se às características relativas às propriedades genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias (Carvalho & Nakagawa, 2000).

Diante do exposto, a eliminação ou redução do inóculo infectivo de fungos em sementes é fundamental, podendo ser eficientemente alcançados pelo manejo e tratamento das sementes por métodos biológicos, físicos ou químicos (Machado, 2000). O tratamento químico constitui-se numa das medidas mais antigas e eficientes de controle de doenças de plantas, apresentando, normalmente, ação direta sobre a fonte de inóculo do patógeno (Menten, 1995). Entretanto, para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes, na cultura do cafeeiro, não existem produtos registrados (Agrofit, 2009).

Para avaliação da eficiência dos métodos de controle aplicados, na manutenção da qualidade de sementes, são estabelecidos testes de avaliação de qualidade como os testes de sanidade e germinação. O teste de sanidade de sementes que tem como objetivo determinar a condição sanitária de um lote de sementes fornece informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, melhoramento de plantas e outros (Machado, 2000). Já o teste de germinação consiste em determinar o potencial germinativo de um dado lote de forma a avaliar a qualidade fisiológica das sementes para fins de semeadura e produção de mudas (Brasil, 1992; Carvalho & Nakagawa, 2000).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do tratamento químico na condição sanitária e na qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro visando o controle de *Colletotrichum gloeosporioides*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas e Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

2.1 Obtenção de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de cafeeiros

Para a obtenção de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foram realizadas coletas de sementes de plantas sem sintomas de mancha manteigosa na cultivar Catuaí Vermelho. Fragmentos dos tecidos do endosperma foram desinfestados com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1%, transferidos para placas de Petri contendo meio MEA (extrato de malte-ágar) a 2% e incubadas por 7 dias em câmara de crescimento, à temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias purificadas foram utilizadas para a obtenção de culturas monospóricas. A partir de colônias puras de *Colletotrichum gloeosporioides* cultivadas em meio MEA a 2%, foi feita uma suspensão de esporos pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada em placas de Petri. Essa suspensão foi vertida em placas de Petri contendo meio ágar- água a 2%. Após 24 horas, em câmara de fluxo laminar, sob microscópio estereoscópico, os esporos germinados foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo meio MEA a 2%, tendo-se assim o isolado para posterior inoculação das sementes.

2. 2 Origem do lote de sementes

As sementes da variedade Catuaí Vermelho/safra 2008, foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) do Município de Lavras-MG.

2. 3 Inoculação das sementes

Os isolados do fungo obtidos de sementes de cafeeiro foram transferidos, separadamente, para placas de Petri contendo meio MEA a 2% e incubados em BOD com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Uma suspensão de conídios do isolado obtido anteriormente foi preparada adicionando-se 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa e quantificada em Câmara de Neubauer, sendo 1 mL dessa, na concentração de conídios de 2×10^6 conídios. mL^{-1} , colocado em cada placa de Petri contendo meio MEA 2% e novamente incubadas nas condições anteriormente citadas.

Após um período de 7 dias de crescimento das colônias, as sementes (com pergaminho), já desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por um minuto e secas em papel Germitest esterilizado por 24 horas foram colocadas em contato direto com o micélio do fungo, por um período de 144h.

2. 4 Teste de sanidade

A qualidade sanitária das sementes foi determinada por meio da avaliação em “Blotter test”, que consistiu da distribuição de oito repetições de 25 sementes em placa de Petri, de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em meio ágar- água a 0,5%. As placas foram incubadas a temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias. Cada semente foi examinada individualmente em microscópio estereoscópico, para

verificação da ocorrência de *C. gloeosporioides* e outros fungos associados às mesmas.

2. 5 Teste de germinação em laboratório

No teste de germinação em rolo de papel (tipo Germitest) foram utilizados quatro repetições de 50 sementes (com pergaminho). O papel Germitest foi umedecido com água destilada e com 2,5 vezes o peso do papel de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os rolos de papel foram colocados em germinador com temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de 60 dias. Após esse período, realizou-se contagem de sementes germinadas (plântulas normais).

2. 6 Tratamento químico de sementes no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*

Para o tratamento químico utilizou-se a recomendação dos produtos por 100 kg de semente, sendo fracionados conforme a quantidade das amostras a serem tratadas.

Os fungicidas e as sementes foram colocados em sacos plásticos de 2,0 L e agitados alguns minutos até cobertura total das sementes pelos fungicidas. Em seguida, foram colocadas em temperatura ambiente para secagem durante 24 horas. Após esse período, foram realizados os testes de germinação e sanidade, como descritos nos itens 2.4 e 2.5. No tratamento controle foi utilizada uma testemunha apenas inoculada.

TABELA 1. Fungicidas utilizados no controle químico de *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de cafeeiro. UFLA, Lavras, MG, 2009.

Marca comercial	Nome Técnico	(g de i.a.)*	Ação
Monceren PM	pencycuron	250	protetor
Euparen M 500 WP	tolyfluanid	500	contato
Derosal Plus	carbendazim+ tiram	150+ 350	contato e sistêmico
Baytan SC	triadimenol	150	sistêmico
Thiram 480 TS	tiram	480	protetor
Maxim	fludioxonil	25	protetor

*i.a (ingrediente ativo) – dosagem aplicada por 100 kg de sementes.

2.7 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições de 25 sementes para o teste de sanidade e para porcentagem de germinação das sementes utilizou-se 4 repetições de 50 sementes. Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$), sendo que os dados de sanidade foram transformados em $(X + 1)^{0.5}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tratamento químico de sementes no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*

Todos os fungicidas testados reduziram a incidência de *C. gloeosporioides* nas sementes de cafeeiro, diferindo estatisticamente da testemunha inoculada (Tabela 2). Destacam-se os fungicidas triadimenol, tiram e fludioxinil por erradicarem esse patógeno das sementes. Resultado referente ao fungicida triadimenol neste trabalho, discorda do encontrado por Tatagiba et al. (2002) em ensaio visando controle de *C. gloeosporioides* em mamoeiro no campo, no qual o triadimenol se igualou à testemunha. Já Goulart (1991) evidencia redução na incidência de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* nas sementes de soja, tratadas com os fungicidas tolyfluanid e thiram.

TABELA 2. Incidência de *C. gloeosporioides* e percentual de germinação de sementes de café inoculadas, submetidas a tratamento com fungicidas, aos 7 dias após incubação. UFLA, Lavras, MG, 2009¹.

Nome Técnico*	<i>C. gloeosporioides</i> (%)**	Germinação (%)
Pencycuron	2,0 a	38,0 b
Tolyfluanid	0,5 a	43,0 a
Carbendazin+ thiram	0,5 a	24,0 b
Triadimenol	0,0 a	53,0 a
Tiram	0,0 a	53,0 a
Fludioxonil	0,0 a	31,0 b
Test. Inoculada	21,0 b	31,0 b

*p.a – princípio ativo

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. **Dados transformados $(X + 1)^{0,5}$.

Entre os tratamentos, o maior valor de incidência do fungo foi encontrado nas sementes tratadas com fungicida pencycuron (2,0 %), apesar desse não ter diferido significativamente dos demais tratamentos.

Na análise de germinação, as maiores porcentagens ocorreram nas sementes tratadas com triadimenol (53%) e tiram (53%) e tolyfluanid (43%), diferindo estatisticamente da testemunha inoculada. Vedoato et al. (1980), tratando sementes de soja com fungicidas, observaram que esses proporcionaram um aumento no "stand" da cultura, ressaltando ainda a eficiência do fungicida Tiram.

Já os fungicidas carbendazim+thiram (24%), fludioxonil (31%), pencycuron (38%) apresentaram os menores valores de plântulas normais germinadas, igualando-se estatisticamente a testemunha inoculada (31%) (Tabela 2). Embora Menten (1995) tenha afirmado que o vigor das sementes influi na resposta ao tratamento fungicida, Casa et al. (1998) observaram que o controle de *S. maydis* em milho, por meio de tratamento químico de sementes não proporcionou valores mais elevados de germinação, mas manteve o potencial fisiológico da semente e, reduziu ao mesmo tempo, a transmissão do patógeno, como os resultados observados no presente trabalho.

Observou-se que todos os tratamentos apresentaram germinação inferior ao limite estabelecido para a cultura do café (70%). Fato este, atribuído ao baixo poder germinativo das sementes de café do lote utilizado (42,0%) observado na testemunha absoluta, sem aplicação de nenhum tratamento. A baixa germinação das sementes mesmo tratadas com os fungicidas pencycuron e fludioxonil comparados estatisticamente a testemunha inoculada, além do baixo vigor apresentado pelas sementes desse lote, também pode ser explicada pela alta infecção das sementes pelo fungo *Fusarium* spp. (Tabela 3) que pode ter mascarado a avaliação dos efeitos de *C. gloeosporioides*. Esses tratamentos apresentaram níveis de infecção de (69,5 %), (39,5 %) e (41 %) respectivamente. Além disso, a testemunha inoculada apresentou 21 % de infecção por *C. gloeosporioides*, demonstrando a possível interferência desses dois fungos na germinação das sementes.

TABELA 3. Incidência de microrganismos (%) em sementes de Catuaí Vermelho submetidas a tratamento com fungicidas, após 7 dias de incubação. UFLA, Lavras, MG, 2009¹.

Tratamentos	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
Pencycuron	39,5 c	0,0 b	0,0 b
Tolyfluand	0,5 a	0,0 b	0,0 b
Carbendazin+ thiram	5,0 b	1,0 b	0,0 b
Triadimenol	4,5 a	0,5 b	0,5 b
Tiram	2,5 a	0,5 b	0,0 b
Fludioxonil	39,5 c	0,0 b	0,0 b
Testemunha Inoculada	41,0 c	5,0 a	2,0 a

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. foram encontrados associados às sementes de café analisadas. Dias & Barros (1993) também observaram a presença dos fungos *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. em sementes de café arábica. O gênero *Fusarium* spp. foi observado em 100% das sementes com pergaminho

Todos os produtos foram eficientes no controle de *Aspergillus* spp. e *Penicillium*, diferindo estatisticamente da testemunha inoculada (Tabela 3). Lasca et al. (2005) ressaltaram a eficiência dos fungicidas Tiram, tolyluanid e carbendazin+thiram, na redução da incidência de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. em sementes de milho.

Em relação à redução na incidência de fungos do gênero *Fusarium* spp. nas sementes, os melhores resultados foram obtidos com fungicidas tolyfluand (0,5%), triadimenol (4,5%), tiram (2,5%) e carbendazin+thiram (5,0%), quando comparados a testemunha (41%). As sementes tratadas com os fungicidas pencycuron e fludioxonil apresentaram as maiores incidência do fungo, ambas (39,5%) e foram estatisticamente iguais a testemunha inoculada ambas. Pinto (2004) resalta eficiência do fungicida thiram no controle de *Fusarium subglutinans* associado às sementes de sorgo.

A inexistência de fungicidas recomendados para o controle de *C.gloeosporioides*, e de vários outros fungos, até a presente data, em

sementes de café, se deve principalmente a quantidade insuficiente de pesquisas sobre a transmissibilidade e interação patógeno x hospedeiro nos patossistemas envolvidos. No entanto, alguns trabalhos sobre a mancha manteigosa no cafeeiro a partir de 1993 (Dorizzoto, 1993; Orozco Miranda, 2003; Ferreira et al., 2004, 2005; Pereira, 2005; Lins, 2006; Martins, 2008; Ferreira et al., 2009) confirmam a necessidade de que a redução de inóculo primário do agente causal nas sementes seja realizada, haja vista que a produção de mudas a partir de sementes infectadas, com toda a certeza esta diretamente relacionada ao aumento de focos a campo.

4 CONCLUSÕES

O tratamento químico foi eficiente na redução da incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* nas sementes de cafeeiro.

Os tratamentos que proporcionaram maior percentagem de plântulas normais germinadas foram: tolyfluanid, triadimenol e tiram.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxico fitossanitário**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 7 fev. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 427p.

CASA, R.T.; ZAMBOLIM, L.; REIS, E.M. Transmissão e controle de diplódia em sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.436-441, 1998.

DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.2, p.197-202, 1993.

DORIZZOTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1993. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FERREIRA, J. B., ABREU, M. S., PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.

FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; ABREU, M.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, jul./ago. 2005.

FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; FERNANDES, K.D.; ABREU, M.S. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. CD-ROM.

GOULART, A.C.P. Eficiência do tratamento químico de sementes de soja no controle de *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.13, n.1, p.1-4, 1991.

LASCA, C.C.; VECHIATO, M.H.; FANTIN, G.M.; KOHARA, E.Y. Efeito do tratamento químico de sementes de milho sobre a emergência e a

produção. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.4, p.461-468, out./dez. 2005.

LINS, S.R. de. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião.** 2006. 104p. (Mestrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MARTINS, F. G. **Aspectos epidemiológicos e fisiológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ X mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)** 2008. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico.** Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1995. 312p.

OROZCO MIRANDA, E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* sp. associados ao cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum karawae*.** 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella- Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos.** 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PINTO, N.F.J. de. Avaliação da eficiência dos fungicidas fludioxonil +Metalaxyl-m no tratamento de sementes de sorgo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.2, p.450-453, mar./abr. 2004.

TATAGIBA, J.S.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A.; COSTA, H. Controle e condições favoráveis à antracnose do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.206-212, 2002.

VEDOATO, R.A.; FERNANDES, N.G.; LAM-SÁNCHEZ, A. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas não sistêmicos sobre várias características da cultura da soja cv. 'Santa rosa'. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.2, n.3, p.45-52, 1980.

CAPÍTULO 3

TRATAMENTO TÉRMICO DE SEMENTES DE CAFEIRO (*Coffea arabica* L.) NO CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides*

RESUMO

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Tratamento térmico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) no controle de *Colletotrichum gloeosporioides***. 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Colletotrichum gloeosporioides pode estar associado às sementes de cafeeiro como contaminante superficial ou colonizador de tecidos internos, causando assim redução na qualidade sanitária e fisiológica das mesmas. O tratamento térmico vem despertando interesse por oferecer eficiência no controle de fungos em sementes infectadas. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da termoterapia no controle de *C.gloeosporioides* em sementes de cafeeiro. O tratamento térmico foi realizado pela imersão das sementes, (sem ou inoculadas com o fungo) em banho-maria, com temperaturas de 50 °C e 60 °C por 1 minuto, 7 minutos e 30 segundos e 15 minutos. Para avaliar a eficiência dos tratamentos foram realizados os testes de germinação das sementes e sanidade pelo método “Blotter test”. Os tratamentos térmicos foram eficientes no controle de *C. gloeosporioides*, sendo que melhor tratamento térmico na redução fungo nas sementes foi 60 ° C por 15 minutos, entretanto, esse tratamento reduziu significativamente a germinação das sementes.

¹ **Comitê orientador:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Thermal treatment of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) for controlling of *Colletotrichum gloeosporioides***. 2009. 70p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Pathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

Colletotrichum gloeosporioides may be associated with coffee seeds as superficial contaminating or colonizing the internal tissues. Thus, this fungus causes reduction in the sanitary and physiological qualities of the seeds. The thermal treatment has been seen as interesting for offering efficiency for the control of fungi in contaminated and infected seeds. Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficiency of the thermotherapy for the control of *C.gloeosporioides* in coffee seeds. The thermal treatment was carried out by immersion of the seeds, (without or inoculated) in water bath, at temperatures of 50 e 60 °C °C per 1 minute, 7 minutes and 30 seconds and 15 minutes. Blotter and germination tests were done in order to evaluate the efficiency of the treatments. The thermal treatments were efficient for the control of *C. gloeosporioides*. The best thermal treatment in the fungus reduction in the seeds was 60 ° C per 15 minutes, however, this treatment reduced, significantly, seeds germination.

¹ Advising Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Adviser)

1 INTRODUÇÃO

A mancha manteigosa destaca-se no patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro por ser altamente deletéria ocasionando a diminuição progressiva na produtividade, culminando com a morte dos cafeeiros infectados (Ferreira et al., 2005). Para a cafeicultura, a transmissão de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha manteigosa, pela semente (Lins, 2006; Ferreira et al., 2009) constitui-se num grande problema, uma vez que as lavouras de café são formadas a partir de mudas obtidas de sementes.

A obtenção de sementes de café de alta qualidade fisiológica e sanitária é fundamental (Ferreira et al., 2004), sendo imprescindível a aplicação de métodos de controle de fitopatógenos.

A termoterapia, que consiste na exposição das sementes à ação do calor em combinação com o tempo de tratamento, tem demonstrado eficiência (Machado, 2000). Dessa forma, a termoterapia que tem se apresentado como uma técnica eficiente de erradicação de patógenos em sementes e frutos, e pode constituir-se numa alternativa para o controle de *C. gloeosporioides* em frutos e sementes de café. Entretanto, tornam-se necessários o estudo e aperfeiçoamento principalmente com relação às temperaturas de exposição das sementes, bem como no seu efeito na qualidade fisiológica das sementes e qualidade dos frutos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do tratamento térmico no controle de *C. gloeosporioides*; avaliando-se a eficiência na qualidade sanitária e os efeitos deletérios na germinação de sementes de cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas e Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

2.1 Obtenção de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de cafeeiros

Os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foram obtidos de sementes (isolado 1) de plantas sem sintomas de mancha manteigosa e de ramos com sintomas de seca de ponteiros (isolado 2) de plantas com mancha manteigosa e na cultivar Catuaí Vermelho. Fragmentos dos tecidos infectados foram desinfestadas com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1%, transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura MEA a 2% (extrato de malte-ágar) e incubadas por 7 dias em câmara de crescimento, à temperatura de 22 \pm 2° C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias purificadas foram utilizadas para a obtenção de culturas monospóricas.

2.2 Origem dos lotes de sementes

As sementes da variedade Catuaí Vermelho, safra 2008, foram fornecidas pela fazenda Laje localizada no Município de Paraguaçu -MG e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) no Município de Lavras-MG.

2.3 Inoculação das sementes

Os isolados do fungo obtidos de sementes (isolado 1) ou da seca de ponteiros (isolado 2) foram transferidos, separadamente, para placas de Petri

contendo meio MEA a 2% e incubados em BOD com temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Após esse período, uma suspensão de conídios foi preparada adicionando-se 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa e quantificada em Câmara de Neubauer, sendo 1 mL dessa, na concentração de conídios de 2×10^6 conídios.mL⁻¹, colocado em cada placa de Petri contendo meio MEA 2% e novamente incubadas nas condições anteriormente citadas.

Após um período de 7 dias de crescimento das colônias, as sementes (com pergaminho), já desinfestadas anteriormente com hipoclorito de sódio a 2%, por um minuto e secas em papel Germitest esterilizado por 24 horas, foram colocadas em contato direto com o micélio dos isolados por um período de 144h.

2. 4 Teste de sanidade

A qualidade sanitária das sementes foi determinada por meio da avaliação em “Blotter test”, que consistiu da distribuição de oito repetições de 25 sementes em placa de Petri, de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em meio ágar- água a 0,5%. As placas foram incubadas a temperatura de 20 °C ± 2 °C e com fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias. Cada semente foi examinada individualmente em microscópio estereoscópico, para verificação da ocorrência de *C. gloeosporioides* e outros fungos associados às mesmas.

2. 5 Teste de germinação em laboratório

No teste de germinação em rolo de papel (tipo Germitest) foram utilizados quatro repetições de 50 sementes (com pergaminho). O papel Germitest foi umedecido com água destilada e com 2,5 vezes o peso do papel de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os

rolos de papel foram colocados em germinador com temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de 30 dias. Após esse período, realizou-se contagem de sementes germinadas (plântulas normais).

2.6 Experimento 1: Influência da termoterapia no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e na qualidade fisiológica de sementes de café inoculadas com isolado 1

As sementes foram inoculadas pelo método do contato direto com a colônia do fungo, descrito no item 2.3. Após inoculação, as sementes foram colocadas para secagem a temperatura ambiente por um período de 24 horas. Após esse período, as sementes foram imersas por 1 minuto, 7 minutos e 30 segundos e 15 minutos em água com temperaturas de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e colocadas para secagem por um período de 24 horas, como também o controle (apenas inoculada).

A qualidade fisiológica foi determinada por meio do teste de germinação, avaliado aos 30 dias e, a sanidade por meio do “Blotter Test”, após 7 dias.

2.6.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$, com oito repetições de 25 sementes para o teste de sanidade e para porcentagem de germinação das sementes utilizou-se 4 repetições de 50 sementes. Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tuckey ($p \leq 0.05$), sendo que os dados de sanidade foram transformados em $(X + 1)^{0.5}$.

2.7 Experimento 2: Influência da termoterapia no controle *Colletotrichum gloeosporioides* e na qualidade fisiológica sementes de café inoculadas com isolado 2

Esse experimento segue a mesma metodologia do anterior. Entretanto, o isolado inoculado é proveniente de plantas de café com sintomas seca de ponteiros.

2.7.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$, com oito repetições de 25 sementes para o teste de sanidade e para porcentagem de germinação das sementes utilizou-se 4 repetições de 50 sementes. Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$), sendo que os dados de germinação foram transformados em $(X + 1)^{0.5}$.

2.8 Experimento 3: Influência da termoterapia no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de café coletadas de plantas com mancha manteigosa

Esse experimento segue a mesma metodologia do anterior. Entretanto, as sementes de café não foram inoculadas.

2.8.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$, com oito repetições de 25 sementes para o teste de sanidade e para porcentagem de germinação das sementes utilizou-se 4 repetições de 50 sementes. Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$),

sendo que os dados de sanidade foram transformados em $(X + 1)^{0.5}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Influência da termoterapia no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e na qualidade fisiológica de sementes de café inoculadas com isolado 1

A interação entre temperatura e tempo de exposição das sementes não foi significativa ($P < 0,05$). Porém, houve diferença significativa para os fatores tempo de exposição das sementes e temperatura isoladamente (Tabela 4).

O tratamento térmico nas temperaturas de 50 °C e 60 °C, e em todos os tempos reduziram significativamente a incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* nas sementes, quando comparados a testemunha inoculada. A temperatura de 50 °C por 1 minuto apresentou a maior incidência do fungo nas sementes (2%), quanto comparado aos demais tratamentos. Entretanto, esse tratamento diferiu estatisticamente da testemunha inoculada. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Tanaka et al. (2003) que verificaram o controle de espécies do gênero *Colletotrichum* spp. em temperaturas entre 40 e 60° C, bem como, a inativação do inóculo de *C. fragariae* com a temperatura de 45 °C por 30 minutos. Já as espécies *C. acutatum*, e *C. lindemuthianum* foram mais sensíveis ao efeito da temperatura e não sobreviveram ao tratamento térmico acima de 40 °C por 30 minutos.

Analisando as sementes apenas inoculadas (Tabela 4) observa-se que a porcentagem de incidência de *C. gloeosporioides* foi baixa, o que pode ter ocorrido devido à grande variabilidade patogênica apresentada por fungos desse gênero. Segundo Galli et al. (2007), existe diferença entre isolados de *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. O isolado 1 proveniente de plantas com sintomas de antracnose na região de Jaboticabal-SP, foi mais patogênico que o isolado 2 proveniente de Campinas-SP. Observaram também que, no preparo do inóculo, o isolado 2 apresentou maior quantidade

de esporos, no entanto essa maior concentração de esporos não foi suficiente para promover o maior transporte do fungo pelas sementes. Além disso, a maior esporulação do isolado menos patogênico pode ser um mecanismo de sobrevivência do fungo. Em teoria, fungos com maior patogenicidade, necessitam de menor quantidade de esporos para infectar seus hospedeiros.

TABELA 4. Incidência de *C. gloeosporioides* e percentual de germinação de sementes de café inoculadas e tratadas com água quente. UFLA, Lavras, MG, 2009¹.

Tratamentos	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (%) [*]	Germinação (%)
50°C- 1'	2,0 b	54,0 ab
50°C -7'e 30 "	0,0 ab	69,0 a
50°C- 15'	1,0 ab	66,0 a
60°C- 1'	1,0 ab	42,5 bc
60°C - 7' 30"	0,5 ab	21,5 d
60°C- 15'	1,0 ab	22,5 cd
Testemunha inoculada	4,5 a	35,0 bcd
Média	1,43	44,36

' minutos, " segundos

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5 % de probabilidade. *Dados transformados em $(X + 1)^{0,5}$.

Com relação aos resultados de germinação (tabela 4), as maiores porcentagens de germinação foram observadas nas sementes submetidas ao tratamento térmico a 50°C em todos os tempos de exposições analisados, isso mostra que esse tratamento não foi prejudicial à qualidade fisiológica das sementes, diferindo significativamente da testemunha inoculada. Além disso, o tratamento a 50° C por 7 minutos e 30 segundos, erradicou o fungo das sementes de café, e ainda apresentou a melhor porcentagem de germinação. A aplicação do tratamento a 60 °C, em todos os tempos de exposição foi significativamente maior do que na testemunha, reduzindo a incidência de *C. gloeosporioides*, porém reduziram significativamente a germinação das sementes (Tabela 4).

Com o objetivo de verificar a porcentagem de germinação do lote de sementes utilizadas nesse ensaio, foi analisada uma testemunha total, sem

aplicação de nenhum tratamento, e em teste de germinação verificou-se 45,0% de plantas normais germinadas, isso mostra um baixo poder germinativo das sementes de café desse lote. De acordo com Popinigis (1985), a qualidade das sementes é relacionada com a capacidade de desempenhar funções vitais, caracterizadas por germinação, vigor e longevidade.

TABELA 5. Fungos associados a sementes de café, UFLA, Lavras, MG, 2009¹.

Tratamentos	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
50°C- 1'	41,5 b	15,0 c	22,5 bc	3,5 bc
50°C -7'e 30 "	47,5 b	12,0 c	24,5 c	2,0 ab
50°C- 15'	50,0 b	9,5 c	25,5 c	3,0 abc
60°C- 1'	47,0 b	7,0 bc	41,5 d	5,5 c
60°C - 7' 30"	12,0 a	3,0 ab	32,5 cd	0,0 a
60°C- 15'	38,0 b	0,0 a	12,5 a	0,0 a
Média	39,33	7,75	26,50	2,33

' minutos, " segundos,

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5 % de probabilidade. ¹Dados tranformados em $(X + 1)^{0,5}$

A temperatura de 60 °C por 7 minutos e meio, apresentou menor incidência de *Fusarium* spp. nas sementes de cafeeiro (12%), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Entretanto, nenhuma combinação dos tempos de exposição e as temperaturas foi capaz de erradicar fungos do gênero *Fusarium* spp. das sementes. Esses resultados estão de acordo aos encontrados por Tanaka et al. (2003) que verificando a eficiência do tratamento térmico no controle de fitopatógenos, observaram que muitos fungos foram controlados ou erradicados, em várias combinações tempo x temperatura, entretanto, dentre os fungos do gênero *Fusarium* spp., a espécie *F. subglutinans* permaneceu viável após tratamento a 55 °C por 30 minutos, enquanto que *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick &

Snyder (feijoeiro) e *Fusarium* spp. (morangueiro), ainda mostraram crescimento após exposição a 60 °C durante 10 minutos.

Além de *Fusarium* spp., foram observados nas sementes fungos do gênero *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp., com variação na incidência. Entre os tratamentos, destacou-se 60°C por 15 minutos por apresentar melhor eficiência no controle desses fungos (Tabela 5).

3.2 Experimento 2: Influência da termoterapia no controle *Colletotrichum gloeosporioides* e na qualidade fisiológica sementes de café inoculadas com isolado 2

A interação entre temperatura e tempo de exposição das sementes apresentou efeito significativo ($P < 0,05$), para incidência de *C. gloeosporioides* e para a porcentagem de germinação das sementes. Com relação à sanidade (Tabela 6), as sementes que foram submetidas ao tratamento térmico apresentaram diminuição na porcentagem de *C. gloeosporioides* quando comparados com a testemunha (66,5 %). Entre os tratamentos, o maior valor de incidência do fungo ocorreu para a temperatura de 50° C com tempo de exposição de 1 minuto, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

TABELA 6. Incidência de *C. gloeosporioides* e percentual de germinação em sementes de café tratadas com água quente. UFLA, Lavras, MG, 2009¹.

Tratamentos	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (%)**	Germinação (%)
50°C- 1'	*33,0 Bb	52,5 Aa
50°C -7' e 30 "	*5,0 Aa	*56,5 Aa
50°C- 15'	*5,5 Aa	*55,0 Aa
60°C- 1'	*2,5 Aa	*67,5 Aa
60°C - 7' 30"	*2,5 Aa	53,0 Aa
60°C- 15'	*1,0 Aa	*3,5 Bb
Testemunha inoculada	66,5	38,5
Média	16,57	46,64

*Diferentes estatisticamente da testemunha pelo teste Scheffé a 5% de probabilidade ' minutos, " segundos, **Dados transformados $(X + 1)^{0,5}$

¹ Médias seguidas pela mesma letra minúscula ou maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A temperatura de 60 ° C no tempo de exposição de 15 minutos apesar de controlar o fungo, reduziu significativamente a germinação das sementes (tabela 6). Dessa forma, esse tratamento pode ser considerado desfavorável para o crescimento do fungo e da planta. Segundo Machado (2000) embora eficiente no controle de patógenos associados a sementes, a termoterapia pode causar danos à sua qualidade fisiológica, principalmente pelo rompimento das membranas celulares ou desnaturação de proteínas dos tecidos externos, os quais podem ocasionar a perda de metabólitos que podem ser utilizados na germinação e no crescimento da plântula. Além disso, Lopes et al. (1991) e Castellani et al. (1996) observaram que a contaminação das sementes pode afetar, de forma severa, a qualidade fisiológica e, em alguns casos, inibir por completo a capacidade germinativa das sementes.

Apesar das particularidades de cada patossistema, resultados semelhantes foram obtidos por Coutinho et al. (2007), apesar de os tratamentos térmicos na temperatura de 60 °C e nos tempos acima de 10 minutos, serem os mais eficazes no controle dos fungos, principalmente de *F. verticillioides*, afetaram adversamente a qualidade fisiológica das

sementes, colocando o lote em questão fora dos padrões de certificação e comercialização, conforme normas da Comissão de Sementes e Mudas de Minas Gerais (CESM - MG). A termoterapia de sementes, visando ao controle de patógenos, baseia-se no diferencial dos pontos térmicos letais de sementes e patógenos, sendo que o sucesso deste método será maior sempre que esses pontos estiverem bem distanciados um do outro (Machado, 2000). Neste estudo, verificou-se que os pontos térmicos letais de sementes de milho e *F. verticillioides* estão muito próximos, inviabilizando o sucesso da técnica no controle do patógeno.

A termoterapia ou tratamento térmico ou hidroterapia é um método alternativo que tem sido usado há vários anos para controle de doenças fúngicas em pós-colheita (Couey, 1989). Entretanto, as maiores limitações ao seu uso referem-se à falta de proteção residual contra a recontaminação por patógenos oportunistas e às injúrias promovidas no hospedeiro.

A combinação de métodos de controle pode mostrar efeito aditivo ao aumentar a eficiência de controle das podridões e prolongar a vida pós-colheita dos frutos, como no caso da termoterapia, onde o controle é geralmente parcial, necessitando da suplementação de fungicidas durante ou após o tratamento para atingir nível de controle satisfatório (Jacobi et al., 1994).

3.3 Experimento 3: Influência da termoterapia no controle *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de café coletadas de plantas com mancha manteigosa

A interação entre temperatura e tempo de exposição das sementes foi significativa para a porcentagem de germinação das sementes (Tabela 7).

Analisando a incidência de *C. gloeosporioides* em cada temperatura e seus respectivos tempos, observou-se diferença significativa dos tratamentos em relação à testemunha (Tabela 7). A testemunha absoluta apresentou 20 % de

incidência de *C. gloeosporioides*. Estudo realizado por Orozco Miranda et al.(2002a,b,c) com sementes colhidas de plantas doentes com mancha manteigosa verifica-se incidência de 14 % de *Colletotrichum* spp. nos endospermas. Esses autores, também observaram após semear em areia estéril sementes com *Colletotrichum* spp., no teste de sanidade, essas sementes foram plaqueadas em meio de cultura e apresentaram *C. gloeosporioides*, com as mesmas características observadas em isolados de plantas adultas enfermas.

Os resultados obtidos são reforçados por outros descritos anteriormente (Machado, 2000; Orozco Miranda, 2003), nos quais *Colletotrichum* spp. é citado como presente nas sementes de cafeeiro.

De acordo com os resultados, a termoterapia é eficiente na redução do fungo nas sementes, isso foi observado nas duas temperaturas e em todos os tempos utilizados. Além disso, analisando a temperatura de 60 ° C por 7 minutos e 30 segundos e 15 minutos não se observa presença de *C. gloeosporioides*, evidenciando erradicação do fungo das sementes, apesar de não diferirem estatisticamente dos demais tratamentos.

TABELA 7. Incidência de *C. gloeosporioides* e percentual de germinação em sementes de café tratadas com água quente. UFLA, Lavras, MG, 2009¹.

Tratamentos	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (%)**	Germinação (%)
50°C- 1'	6,0 a	37,0 Aa
50°C -7'e 30 "	4,0 a	35,5 Aa
50°C- 15'	4,0 a	*24,5 Aa
60°C- 1'	4,0 a	*43,5 Aa
60°C - 7' 30"	0,0 a	*7,0 Bb
60°C- 15'	0,0 a	*1,0 Bb
Testemunha absoluta	20,0 b	35,0
Média	5,43	26,21

*Diferentes estatisticamente da testemunha pelo teste Scheffé a 5% de probabilidade ' minutos, " segundos, **Dados transformados $(X + 1)^{0,5}$

¹ Médias seguidas pela mesma letra minúscula ou maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A porcentagem de germinação das sementes nos tratamentos com termoterapia e na testemunha inoculada foi baixa (média de 26,21 %). Observa-se que a medida que se aumenta o tempo de exposição das sementes nas duas temperaturas estudadas, ocorre redução na germinação de maneira considerável, com exceção da temperatura de 60 °C por 1 minuto (Tabela 7).

Verifica-se que os tratamentos não foram significativos para 50° C por 1 minuto e por 7 minutos e 30 segundos, quando comparados à testemunha. A testemunha inoculada apresentou 35,0 % o maior valor de infecção do fungo nas sementes.

Na temperatura de 60 ° C por um tempo de exposição de 15 minutos em água quente, verifica-se germinação de apenas 1 %, nesse caso, esse tratamento é inviável para ser utilizado em sementes de café.

Em experimento com termoterapia Mendes et al. (2001) avaliaram tratamentos térmicos úmidos a 50 °C (10 e 20 minutos) e a 40 °C (pré-tratamento) por 10 ou 20 minutos, seguidos de tratamento a 50 °C pelo mesmo período, controlaram significativamente *F. oxysporum* das sementes de alfafa sem afetar significativamente a germinação das sementes. Quando

se utilizou a temperatura de 50 °C no período de 30 minutos, os tratamentos foram eficientes na erradicação do fungo, entretanto afetaram significativamente a germinação das sementes de alfafa. Winter et al. (1997) alcançaram resultados semelhantes, eliminando completamente *F. oxysporum* de sementes de cereais ao utilizarem calor úmido a 60 °C por 20 minutos, com perdas no poder germinativo, no entanto na temperatura de 56-58 °C por 20 minutos, o fungo foi controlado sem prejudicar a germinação.

Nesse sentido, para que o tratamento térmico tenha sucesso é necessário encontrar o binômio temperatura x tempo exato, essa combinação deve controlar patógenos de maneira satisfatória e ao mesmo tempo não prejudicar a qualidade fisiológica das sementes.

Em estudo realizado por Ferreira (2006) verifica-se aumento no número de plântulas mortas ao longo do tempo (aos 28 dias após o transplântio observa-se 74% de morte). Ao final do experimento, sobreviveram do lote de sementes procedentes de plantas com mancha manteigosa, apenas 5,2 % de plântulas. E em algumas das plântulas foram observados sintomas típicos da doença nas folhas dos cotilédones.

Segundo Vargas & González (1972) acredita-se que provavelmente exista um caráter genético que predispõe estas plântulas oriundas de sementes de plantas doentes a uma maior suscetibilidade bem como, na reprodução dos sintomas em folhas de café.

4 CONCLUSÕES

Os tratamentos térmicos foram eficientes na redução da incidência de *C. gloeosporioides* nas sementes.

A temperatura de 60° C por 15 minutos é prejudicial para germinação das sementes de café.

A patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* podem influenciar no aumento de resposta ao tratamento termoterápico em sementes de cafeeiro.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CASTELLANI, E.D.; SILVA, A.; BARRETO, M.; AGUIAR, I.B. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. var *variegata*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, n.1, p.41-44, 1996.
- COUEY, M.H. Heat treatment for control post-harvest disease and insect pest of fruits. **HortScience**, Madison, v.24, p.98-202, 1989.
- COUTINHO, W.M.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, C.F.; MACHADO, J.C. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.458-464, 2007.
- FERREIRA, J. B., ABREU, M. S., PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 24-30, jan./fev. 2009.
- FERREIRA, J.B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; ABREU, M.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, jul./ago. 2005.
- FERREIRA, J.B.; PEREIRA, I.S.; FERNANDES, K.D.; ABREU, M.S. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. CD-ROM.
- GALLI, J.A.; PANIZZI, R. de C.; VIEIRA, R.D. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis* *sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p.40-46, 2007.
- JACOBI, K.; COATES, L.; WONG, L. Heat desinfestation of mangoes: effect on fruit quality and disease control. In: POSTHARVEST HANDLING OF TROPICAL FRUITS, 1994, Sidney. **Proceedings...** Sidney, 1994. p.280-287.

LINS, S.R. de. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião.** 2006. 104p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LOPES, J.C.; JARDIM, I.C.C.; SOBREIRA, D.G.; FORDE, G.H.A.; TATAGIBA, J.S. Associação entre germinação, vigor e sanidade em sementes de milho precoce e normal, produzidos na área experimental do Centro Agropecuário da UFES. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 7., 1991, Campo Grande. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n.4, p.55, 1991. Resumos.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: UFLA, 2000. 138p.

MENDES, M.A.S.; LIMA, P.M.; FONSECA, J.N.L.; SANTOS, M.F. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.2, p.148-152, jun. 2001.

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, Lavras, MG.

OROZCO MIRANDA, E.F.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M.S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arabica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Anais...** Sete Lagoas, 2002a. p.59.

OROZCO MIRANDA, E.F.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M.S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arabica (*Coffea arabica*) no estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras, MG. **Resumos...** Lavras: UFLA/APG, 2002b. CD-ROM.

OROZCO MIRANDA, E.F.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M.S. Transmissão de *Colletotrichum* spp. por sementes de café arabica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Anais...** Sete Lagoas, 2002c. p.93.
POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** 2.ed. Brasília, DF: AGIPLAN, 1985. 289p.

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, F. A. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidas por sementes. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 10, p. 219- 248, 2002

TANAKA, M.A.S.; ITO, M.F.; BRAGA, C.A.S.; ARMOND, G. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.386-393, 2003.

VARGAS, G.E.; GONZALEZ, U.L.C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San José, v.22, n.2, p.129-135, 1972.

WINTER, W.; BANZIGER, I.; KREBS, H.; RUEGGER, A. Water treatments against damping-off diseases of cereals. **Agrarforschung**, v.4, p.467-470, 1997.

CAPÍTULO 4

**Controle e alterações bioquímicas em frutos de cafeeiro inoculados com
Colletotrichum gloeosporioides e submetidos à termoterapia**

RESUMO

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Controle e alterações bioquímicas em frutos de cafeeiro inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* e submetidos à termoterapia.** 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O tratamento térmico é um método de desinfestação de frutos. O calor atua sobre a germinação e o crescimento de estruturas de patógenos e sobre o fruto, aumentando a resistência à infecção. O trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da termoterapia no controle de *C. gloeosporioides* em frutos, visando qualidade sanitária das sementes e as possíveis alterações bioquímicas nos frutos. Os frutos inoculados com isolado obtido de frutos (isolado 3) de plantas sem sintomas de mancha manteigosa, ou sem inoculação foram submetidos à termoterapia por 1 minuto em banho- maria. Amostras dos frutos inoculados e tratados com termoterapia foram coletadas para análises bioquímicas. Foram realizados os testes de sanidade pelo método “Blotter test” para avaliação da sanidade das sementes. A termoterapia demonstrou-se eficiente em frutos controlando *C. gloeosporioides*. Observou-se variação nos teores de proteína total, fenóis solúveis totais, e nas atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase a depender do isolado utilizado na inoculação dos frutos.

¹ **Comitê orientador:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Control and alterations bioquímica de frutos de café inoculados artificialmente com *Colletotrichum gloeosporioides* e submetidos à termoterapia.** 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Plant Pathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The thermal treatment is a method of desinfestation of fruits. The heat acts on the germination and growth of structures of the pathogens and on fruit itself, increasing the resistance to the infection. The present work intends to evaluate the efficiency of the thermotherapy on the control of *C. gloeosporioides* in fruits, and, therefore, increasing the sanitary quality of the seeds and altering fruit substances. The fruits inoculated with isolate from coffee fruits (isolated 3) of plants without of blister spot's symptoms, or without inoculation were submitted to the thermotherapy per 1 minute in water bath. Samples of the fruits inoculated and submitted to the thermotherapy were collected for the biochemical analyses. The blotter test was carried out for the evaluation of the seed's health. The thermotherapy was efficient in controlling *C. gloeosporioides* on fruits. There were variations in total protein, total soluble phenols, and in the activities of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes when different isolates are used in the inoculation of the fruits.

¹ Advising Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Adviser)

1 INTRODUÇÃO

A incidência de microrganismos, em pré ou pós-colheita, apresenta-se como um dos principais fatores determinantes na qualidade do café.

Os frutos de café estão expostos a uma diversidade de microrganismos que em condições favoráveis, desenvolve-se nos grãos de café produzindo enzimas que agem sobre os componentes químicos da mucilagem, principalmente sobre os açúcares fermentando-os e produzindo álcool, desdobrado em ácido acético, láctico, propiônico e butírico e outros ácidos carboxílicos. Com o início da produção de ácido butírico, começa a haver prejuízo na qualidade do café. Qualidade também afetada pela fermentação prolongada, quando os micro-organismos produzem outros compostos responsáveis pelos sabores indesejáveis (Carvalho, 1985).

Bitancourt (1975), visando determinar os microrganismos que constituem a microflora do café cereja em diferentes fases do preparo, no cafezal e no terreiro de secagem, isolou e observou que os fungos mais abundantes foram *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. e bolores verdes (*Penicillium* spp.). Também foram identificados: *Aspergillus niger* v. Tiegh no café seco em terreiro; *Cladosporium* sp., que se desenvolve ainda no pé e não no terreiro durante a secagem, como normalmente ocorre com outros fungos; *Rhizopus nigricans* Ehr.; *Rhizopus* sp.; *Phomopsis* sp. e *Epicoccum* sp.

A presença do gênero *Colletotrichum* sp. verificada por Dickman & Patil (1998), praticamente em todos os estádios de maturação, principalmente nos estádios “verde” e “verde-cana”, pode ser explicada pela habilidade desse microrganismo em colonizar tecidos ainda imaturos, devido a ação da enzima cutinase. Alves & Castro (1998) encontraram *Colletotrichum* spp. em frutos de cafeeiro nas fases verde-cana e cereja.

Para evitar ou restringir o desenvolvimento do patógeno dentro do hospedeiro, os mecanismos de defesa de plantas evoluíram (Resende et al. 2008). Teoricamente, existem duas amplas categorias de defesa: a estrutural,

morfológica ou anatômica e a bioquímica ou fisiológica. Os mecanismos estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto as reações químicas que ocorrem nesses tecidos produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas ao crescimento deste no interior do hospedeiro (Pascholati & Leite, 1995). Didaticamente, essas categorias ou fatores de resistência podem ser subdivididos, considerando se um particular mecanismo é operativo antes da infecção (resistência constitutiva, passiva ou pré-infeccional) ou se desenvolve como uma consequência direta da interação entre a planta e o patógeno em potencial (resistência induzida, ativa ou pós-infeccional). Uma terceira, intermediária e freqüente subdivisão, é a chamada resistência semi-constitutiva ou parcialmente induzida (Resende, 1996).

Dentre os mecanismos bioquímicos de defesa destacam-se os compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (Resende et al., 2008). As enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, assim como, todas as proteínas relacionadas à patogênese, geralmente encontram-se presentes constitutivamente e induzidas e acumuladas após o contato com o patógeno ou outro tipo de estresse incluindo fatores ambientais como seca, salinidade, ferimentos, metais pesados, tratamentos com eliciadores endógenos e exógenos e reguladores de crescimento (Ferreira et al., 2007).

Visando qualidade sanitária das sementes, em considerando que um manejo adequado dos frutos após a colheita pode reduzir ou eliminar o crescimento microbiano e fermentações indesejadas, frutos inoculados foram submetidos ao tratamento térmico, sendo o objetivo do presente trabalho, avaliar a eficiência da termoterapia no controle de *C. gloeosporioides*, bem como, possíveis alterações bioquímicas nos frutos inoculados e tratados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos frutos de cafeeiro

Foram colhidos frutos no estágio cereja e verde-cana, da cultivar Catuaí Vermelho, de plantas sem sintomas de mancha manteigosa, no cafezal experimental da Universidade Federal de Lavras, no Município de Lavras, MG.

2.2 Inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* nos frutos

A inoculação foi realizada por meio da infecção direta dos frutos, nesse caso, os frutos foram colocadas em contato com colônia do fungo, crescidas por cinco dias, por um período de 144 h.

2.3 Experimento 1: Influência da termoterapia em frutos no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*

Os tratamentos foram: tratamento controle- (sem tratamento térmico) e tratamento térmico (50 e 60°C por 1 minuto).

Os frutos maduros de cafeeiro, no estágio cereja, foram lavados com detergente, hipoclorito de sódio a 1% e colocados em um recipiente aberto à temperatura 20 °C ±2° C para secagem. Após esse período, foram imersos inteiramente em água aquecida a 50°C e 60°C por 1 minuto em um aparelho de Banho-Maria. Em seguida, os frutos foram colocados sobre papel filtro esterilizados para secagem.

Os frutos maduros submetidos apenas a termoterapia, sem inoculação foram despulpados para obtenção das sementes.

Os testes de sanidade e germinação foram realizados de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), em “Blotter test” e rolo de papel Germitest umedecidos e avaliados aos 7 e 30 dias, respectivamente.

2.3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições de 25 sementes para o teste de sanidade e para porcentagem de germinação das sementes utilizou-se 4 repetições de 50 sementes. Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$), sendo que os dados de sanidade foram transformados em $(X + 1)^{0.5}$.

2.4 Experimento 2: Alterações bioquímicas em cafeeiros inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* e submetidos a termoterapia

2.4.1 Preparo do extrato bruto de frutos de café para a avaliação de proteínas totais, da atividade de guaiacol peroxidase e da polifenoloxidase

A termoterapia realizada nos frutos verdes e maduros foram: tratamento controle- (sem inoculação e sem tratamento térmico) e inoculação com o isolado 2 e 3 *Colletotrichum gloeosporioides* antes do tratamento térmico (50 e 60°C por 1 minuto)

Após realização dos tratamentos, os frutos foram envolvidos em papel alumínio, identificados, mergulhados em nitrogênio líquido, e, após o congelamento, acondicionados em sacos plásticos e armazenados em Depp freezer, a -80 °C. Os tempos de coleta das amostras foram de 0h, 24 e 48h após os tratamentos térmicos.

As amostras conservadas em Depp freezer foram moídas em moinho refrigerado a 4°C e trituradas em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 1g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual foi adicionado tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 0.1 mM EDTA (5mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizou-se por 10 segundos, em agitação. A suspensão foi

centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos (0 - 4° C) e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática.

2.4.2 Determinação do Conteúdo de Fenóis Solúveis Totais

Fenóis solúveis totais foram determinados colorimetricamente como descrito por Spanos and Wrolstad (1990). Aliquotas de 150µL do extrato enzimático foram misturadas a 150µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N, por 5 minutos, homogeneizadas com 150µL de Na₂CO₃ 1M, por 10 minutos e diluídas com 1 mL de água ultrapura, à temperatura ambiente, por uma hora. Os valores de absorvância desta reação foram determinados, a 725nm, em espectrofotômetro e calculados com base em curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de catecol por miligrama de massa fresca.

2.4.3 Determinação de Proteínas totais

A concentração de proteína total solúvel foi aferida conforme ensaio de Bradford (1976), com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

2.4.4 Determinação da atividade de Guaiacol peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)

A atividade de guaiacol peroxidase foi determinada pela adição de 20µL do extrato enzimático, em uma solução ajustada para 220 µL contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20mM e peróxido de hidrogênio 60mM em microplaca de 96 cavidades, com capacidade de 350 µL por cavidade. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorvância foi medida em um leitor EIA compatível a 480nm (Urbanek et al.,1991). Uma unidade de atividade de POX foi expressa como variação na absorvância a 480nm

por miligrama de proteína solúvel por minuto - UA (mgP min)⁻¹. Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

2.4.5 Determinação da atividade de Polifenoloxidase (PPO; EC 1.10.3.2)

A atividade de polifenoloxidase foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático a 180 µL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,5, e 25 mM de catecol em microplaca de 96 cavidades com capacidade de 350 µL por cavidade. O aumento da absorbância a 410 nm foi medido após 30 min a 30°C em leitor EIA compatível (Gauillard et al.1993). Uma unidade de atividade de PPO foi expressa pela variação na absorbância a 410 nm por mg de proteína solúvel por minuto - UA (mg P min)⁻¹. Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

2.4.6 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizados, com 2 tratamentos (50 e 60 ° C) com 2 repetições de 9 frutos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste de Tuckey a nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Influência da termoterapia em frutos no controle de *C. gloeosporioides* associado à semente de cafeeiro

Mediante os resultados obtidos, admite-se que a termoterapia foi eficiente no controle de *C. gloeosporioides* nos frutos, bem como, na redução da incidência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. associados às sementes (Tabela 10). Entretanto, para que seja comprovada a eficiência do tratamento térmico nos frutos visando erradicação do patógeno na semente, faz-se necessário que as sementes oriundas de frutos tratados sejam plantadas, para verificação de possíveis sintomas nas plântulas. Em considerando que Ferreira et al. (2005), verificaram a presença de *Colletotrichum gloeosporioides* no endocarpo (9,72%) e no endosperma (8,3%) de frutos de cafeeiro.

O tratamento térmico dos frutos ainda pode ser justificado pela incidência observada no exocarpo e no mesocarpo (86,72%) (Ferreira et al., 2005), pois essa mucilagem contaminada espalhada na água durante o processo de despolpa constitui-se numa suspensão de esporos favorável para infecção de um maior número de sementes.

TABELA 10. Incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* e fungos associados às sementes de cafeeiro provenientes de frutos tratados por termoterapia¹.

Tratamentos	Fungos (%)		
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
60 °C	0,0 a	15,0 a	18,0 a
50 °C	0,0 a	17,0 a	35,0 b
Testemunha	4,0 b	40,0 b	38,0 b

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott – Knott a 5 % de probabilidade.

3.2 Experimento 2: Alterações bioquímicas em frutos de cafeeiros inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* e submetidos à termoterapia .

3.2.1 Teores de proteína total, fenóis solúveis totais e atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em frutos verdes e maduros.

Com relação ao teor de proteína total, observou-se que as testemunhas (Test- 24 e Test-48) em frutos verdes e maduros, inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* isolado da seca de ponteiros e isolado de frutos apresentaram os maiores valores diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figuras 1 e 2).

Analisando-se as médias separadamente de frutos verdes (0, 7202 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 1) e (0, 7062 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 2), e também dos frutos maduros (0, 6217 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 1) e (0,6101 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 2), foram observadas diferenças significativas para frutos verdes. Os maiores valores encontrados de proteína total foram encontrados nesses frutos, como verificado por Pimenta (1995), em grãos oriundos de frutos verdes, afirmando que o teor de proteína total varia com o estágio de maturação dos frutos de café.

O tratamento térmico e os tempos de armazenamento não influenciaram o teor de proteína total quando comparados à testemunha (Test-0) inoculada com 144 horas. Entretanto, para Test-24 e Test-48 inoculadas com 144 horas e armazenadas à 24 e 48 horas, respectivamente, foi observado aumento no teor de proteína total (Figuras 1 e 2).

Teores maiores de fenóis solúveis totais foram observados no tratamento térmico de 50 °C com 48 horas de armazenamento, e nas testemunhas diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 1).

As reduções dos teores de proteína total e fenóis solúveis totais observadas pode ter ocorrido devido à eficiência da termoterapia, controlando *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de seca dos ponteiros. A maior atividade desses compostos nas testemunhas pode ter ocorrido devido

a uma resposta ao ataque do patógeno.

Compostos fenólicos, em alta concentração nas células vegetais podem constituir-se em componentes de defesa do vegetal contra fatores externos (Pascholati & Leite, 1995).

Os mesmos resultados em relação aos teores de proteína total foram observados nos tratamentos aplicados nos frutos inoculados com o isolado 3, entretanto, para os teores de fenóis solúveis totais os tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha (Figuras 1 e 2).

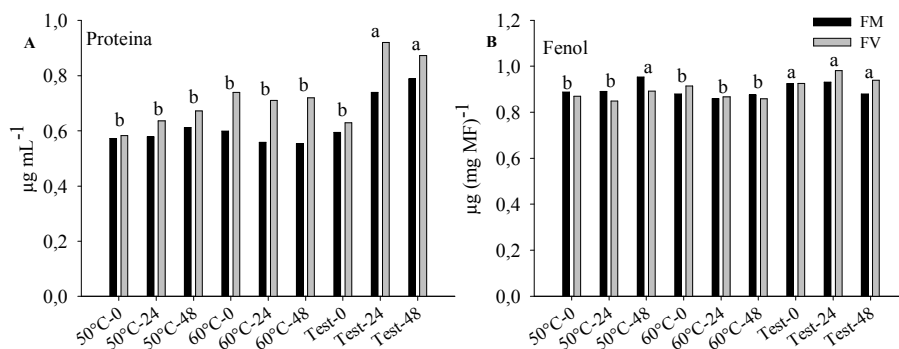


FIGURA 1. Teores de proteína total (A), fenóis solúveis totais (D) e atividade de polifenoxidase (B) e peroxidase (C) em frutos de verdes e maduros, inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* isolado da seca de ponteiros (isolado 1) de cafeeiros, cv. 'Catuai Vermelho', submetidos à termoterapia. Barras com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

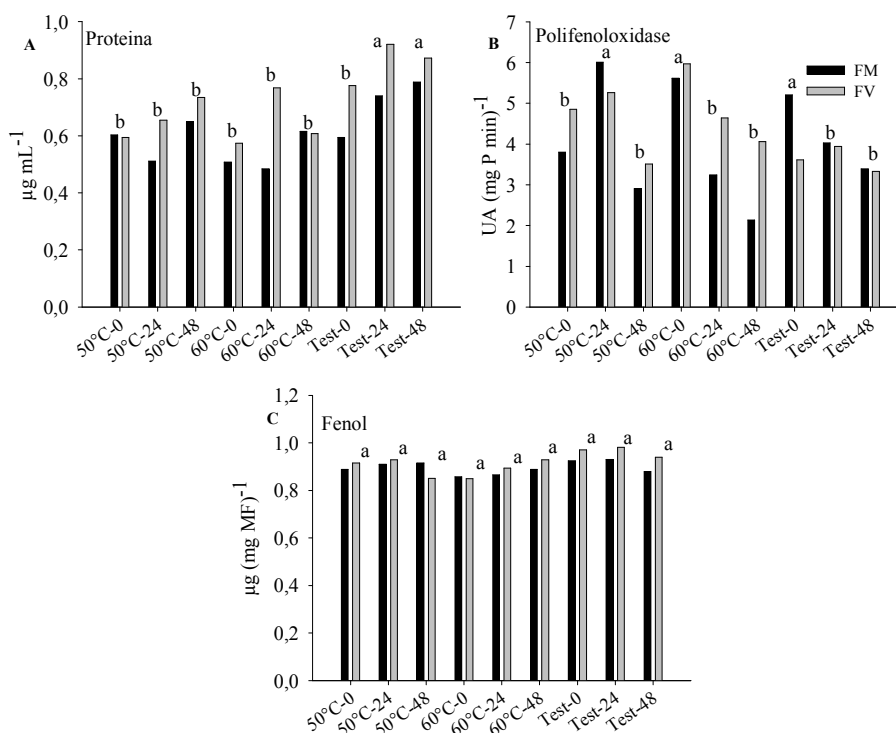


FIGURA 2. Teores de proteína total (A), fenóis solúveis totais (D) e atividade de polifenoloxidase (B) e peroxidase (C) em frutos verdes (FV) e maduros (FM), inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de frutos de cafeeiros (isolado 3), cv. ‘Catuaí Vermelho’, submetidos à termoterapia. Barras com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As atividades de polifenoloxidase nos frutos inoculados com o isolado 2 e para peroxidase nos frutos inoculados com isolado 2 e 3, não apresentaram efeito significativo ($P < 0,05$).

Em relação à atividade da enzima polifenoloxidase, observou-se comportamento semelhante entre as testemunhas e o tratamentos térmicos nos diferentes tempos de armazenamento, ocorrendo uma tendência de decréscimo da atividade dessa enzima em função do aumento do tempo de armazenamento, exceto no tratamento a 50 °C-0.

De acordo com Pimenta et al. (2004), fator ambiental como o ataque de insetos, infecções de microrganismos, alterações fisiológicas e danos mecânicos, provocam uma rápida deterioração dos grãos de café, pois uma vez rompida a membrana celular, ocorre um maior contato entre as enzimas e os compostos químicos presentes intra e extra-celular no grão, provocando dessa forma reações químicas que modificam a composição original do grão.

Neste contexto, acredita-se que a atividade de polifenoloxidase observada tenha ocorrido devido ao dano ocasionado na membrana pelo tratamento térmico (60 °C) ou pelo ataque do patógeno (pico de polifenoloxidase). A tendência de decréscimo dessa atividade, por sua vez, pode ser consequência da quantidade de fenóis solúveis totais.

4 CONCLUSÕES

A termoterapia demonstrou-se eficiente em frutos controlando *C. gloeosporioides* e reduzindo a incidência de outros fungos associado às sementes de cafeeiro.

O tratamento térmico e os tempos de armazenamento reduziram os teores de proteínas total dos frutos verdes e maduros.

Observa-se uma tendência acentuada do decréscimo da atividade da polifenoloxidase nos frutos inoculados (isolado 3), e submetidos à termoterapia em função do aumento do tempo de armazenamento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.; CASTRO, H. A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 4-7, jan./mar, 1998.

BITANCOURT, A.A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v.32, n.359, p.1179-1184, 1975.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S. The role of cutinase from *Colletotrichum gloeosporioides* in the penetration of papaya. In: HESS, W.M.; SINGH, R.S.; SINGH, U.S.; WEBER, D.J. (Ed.). **Experimental and conceptual plant pathology**. Montreux: Gordon and Breach Science, 1988. v.2, p.385-397.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v.8, n.5, p.677-700, 2007.

PARADELA FILHO, O.; PARADELA, A.L.; THOMAZIELLO, R.A.; RIBEIRO, I.J.A.; SUGIMORI, M.H.; FAZUOLI, L.C. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. (Boletim técnico IAC, 191). 11p.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação**. 1995. 94 p. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RESENDE, M.L.V. Mecanismos de resistência de plantas a doenças fúngicas vasculares. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.4, p. 329-35, 1996.

RESENDE, M. L. V. ; ALVES, E. ; CAMPOS M. A. ; ROZWALKA, L. C. ; BOTELHO, L. S. ; UCHOA, C. ; FREIRE E.S. ; KOSHIKUMO, E. S. M. . Mecanismos de defesa de plantas contra doenças. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 16, p.133-144, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao Brasil ser o maior produtor e exportador mundial de café quaisquer ações que visem diminuir as perdas de produções, principalmente as ocasionadas por doenças são pertinentes e devem ser incentivadas. Para que o Brasil mantenha-se como maior produtor e exportador mundial de café, quaisquer ações que visem diminuir as perdas de produções devem ser incentivadas, principalmente, as relacionadas ao manejo fitossanitário para o controle de doenças responsáveis pela redução de produtividade do cafeeiro e qualidade do café.

A severidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha manteigosa, bem como, a transmissão pelas sementes justificam a intensificação e continuidade dos estudos visando o controle da mancha manteigosa.

Para o controle de patógenos em sementes de cafeeiro, o único produto registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é o fungicida Monceren. Para controle de doenças no campo, encontram-se registrados fungicidas protetores do grupo químico inorgânico, sobretudo os cúpricos e o do grupo químico ditiocarbamato para *Colletotrichum coffeanum*, conduzindo-nos erroneamente a afirmação de não existirem produtos então registrados *Colletotrichum gloeosporioides*, omitindo-se o fato de *Colletotrichum coffeanum* ser sinônimo de *Colletotrichum gloeosporioides*.

A busca por métodos alternativos para tratamento de sementes e frutos tornou-se uma necessidade, frente às exigências de um mercado mais rigoroso em sustentabilidade, ou seja, a produção de produtos ecologicamente corretos, economicamente viáveis e socialmente justos. Dentre os métodos propostos, nos últimos anos, destaca-se a termoterapia que se apresenta como uma técnica eficiente de erradicação de patógenos em sementes e frutos.

Neste trabalho, alguns aspectos relativos a alterações bioquímicas foram verificados nos frutos (exocarpo, mesocarpo, endocarpo e endosperma) submetidos à termoterapia. Entretanto, a avaliação do efeito da termoterapia nas sementes com relação às temperaturas de exposição e ao teor de água das sementes, bem como, efeito na qualidade fisiológica e bioquímica das mesmas e dos frutos tratados deve ser objetivo de estudos futuros.

A higienização termoterápica demonstrou eficiência e, se questionamentos relacionados ao tratamento térmico surgirem, caberá exclusivamente ao produtor de mudas a decisão de tratar frutos ou sementes em função do material disponível para formação dessas.

ANEXOS

ANEXO A	Páginas
TABELA 6A: Análise de variância do contraste da incidência de <i>C. gloeosporioides</i> em sementes de café tratadas com água quente, UFLA, Lavras, MG, 2009.....	40.
TABELA 6 B: Análise de variância do contraste da germinação de sementes de café tratadas com água quente, UFLA, Lavras, MG, 2009.....	40.
TABELA 7A: Análise de variância do contraste da germinação de sementes de café tratadas com água quente, UFLA, Lavras, MG, 2009.....	43.

ANEXO

TABELA 6A. Análise de variância do contraste Incidência de *C. gloeosporioides* em sementes de café tratadas com água quente, UFLA, Lavras, MG, 2009.

Tratamento	Média	Contraste	Pr>F
50 °C 1'	33,0	1 VS 7	0,000
50 ° C 7'30''	5,0	2 VS 7	0,000
50 ° C 15'	5,5	3 VS 7	0,000
60 °C 1'	2,5	4 VS 7	0,000
60 ° C 7'30''	2,5	5 VS 7	0,000
60 ° C 15'	1,0	6 VS 7	0,000
Testemunha	66,5	-	-

TABELA 6B. Análise de variância do contraste da germinação de sementes de café tratadas com água quente, UFLA, Lavras, MG, 2009.

Tratamento	Média	Contraste	Pr>F
50 °C 1'	52,5	1 VS 7	0,059
50 ° C 7'30''	56,5	2 VS 7	0,018
50 ° C 15'	55,0	3 VS 7	0,029
60 °C 1'	67,5	4 VS 7	0,000
60 ° C 7'30''	53,0	5 VS 7	0,051
60 ° C 15'	3,5	6 VS 7	0,000
Testemunha	38,5	-	-

TABELA 7A. Análise de variância do contraste da germinação de sementes de café tratadas com água quente, UFLA, Lavras, MG, 2009.

Tratamento	Média	Contraste	Pr>F
50 °C 1'	37,5	1 VS 7	0,561
50 ° C 7'30''	35,5	2 VS 7	0,884
50 ° C 15'	24,5	3 VS 7	0,005
60 °C 1'	43,5	4 VS 7	0,020
60 ° C 7'30''	7,0	5 VS 7	0,000
60 ° C 15'	1,0	6 VS 7	0,000
Testemunha	35,0	-	-