

## NOTA PRÉVIA

NOVA TÉCNICA PARA ISOLAR *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke,  
AGENTE ETIOLÓGICO DA CERCOSPORIOSE DO CAFEIEIROLeandro Alvarenga Santos<sup>1</sup>, Paulo Estevão de Souza<sup>2</sup>, Edson Ampélio Pozza<sup>3</sup>,  
Douglas Massimo Caldeira<sup>4</sup>, Deila Magna dos Santos Botelho<sup>5</sup>

(Recebido: 5 de novembro de 2012; aceito: 29 de julho de 2013)

**RESUMO:** A mancha do olho pardo é uma doença endêmica no Brasil. Poucos são os trabalhos publicados sobre essa doença devido à dificuldade de isolamento e de produção de inóculo do fungo *Cercospora coffeicola*. Objetivou-se, neste trabalho, divulgar a técnica de isolamento desenvolvida e utilizada na Universidade Federal de Lavras, denominada Técnica da Pipeta. Através dela mais de 70 isolados já foram obtidos para estudos futuros do agente etiológico dessa importante doença.

**Termos para indexação:** *Coffea arabica*, isolamento, técnica da pipeta.

NEW TECHNIQUE TO ISOLATE *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke,  
ETIOLOGIC AGENT OF CERCOSPORIA LEAF SPOT OF COFFEE TREE

**ABSTRACT:** The stain brown eye is an endemic disease in Brazil. There are few published studies on this disease because of the difficulty of isolation and production of the fungus *Cercospora coffeicola*. This work aims to publicize this isolation technique developed and used in UFLA called Pipette Technique. Through this already over 70 isolates were obtained for future studies of the etiologic agent of this important disease.

**Index terms:** *Coffea arabica*, isolation, pipette technique.

A cercosporiose é uma das principais doenças do cafeeiro, pode reduzir tanto a produtividade (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010) quanto a qualidade da bebida do café (LIMA; POZZA; SANTOS, 2012). Portanto, torna-se essencial realizar estudos sobre a etiologia, epidemiologia, fisiologia, entre outros, para incrementar o controle da doença. É necessário isolar o patógeno para obter inóculo viável e em quantidade suficiente para proceder à infecção de plantas destinadas à pesquisas diversas. Porém, é difícil tanto isolar quanto obter inóculo de *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, em quantidade suficiente para proceder à inoculação, com os métodos descritos na literatura. Esse é um dos principais motivos da existência de poucos estudos realizados visando esclarecer aspectos da etiologia, epidemiologia e fisiologia dessa doença com o fungo *C. coffeicola*, publicados ao longo dos anos (DELL'ACQUA et al., 2011).

Objetivou-se, portanto, neste trabalho, divulgar nova técnica de isolamento para o fungo *C. coffeicola*.

A metodologia consiste na coleta das folhas com sintomas característicos da doença. Posteriormente, são levadas ao laboratório onde é realizada a desinfestação superficial com solução de álcool 50% (álcool 95 °GL + água destilada) por borrifamento da solução nas faces abaxiais e adaxiais das folhas. As mesmas são colocadas para secar em condições ambiente, em local limpo e arejado sobre papel de filtro esterilizado.

Depois de secas, as folhas são incubadas em câmara úmida, ou seja, em sacos plásticos transparentes com um pedaço de algodão umedecido com água destilada. O saco plástico é lacrado e deixado em local limpo, à temperatura ambiente (média de 23 °C e com iluminação constante (3 lâmpadas fluorescente de 40 watts cada à 3,7 m da bancada), por um período de 48 horas (CUSTÓDIO et al., 2010).

Retiradas da câmara úmida as folhas com sintomas devem ser levadas a um estereomicroscópio binocular onde é realizada a observação das lesões.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - Cx. P. 3037 - 37.200-000 - Lavras - MG leandro.alvarenga.s@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - Cx. P. 3037 - 37.200-000 - Lavras - MG pauleste@ufla.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - Cx. P. 3037 - 37.200-000 - Lavras - MG eapozza@ufla.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - Cx. P. 3037 - 37.200-000 - Lavras - MG douglasmassimo@hotmail.com

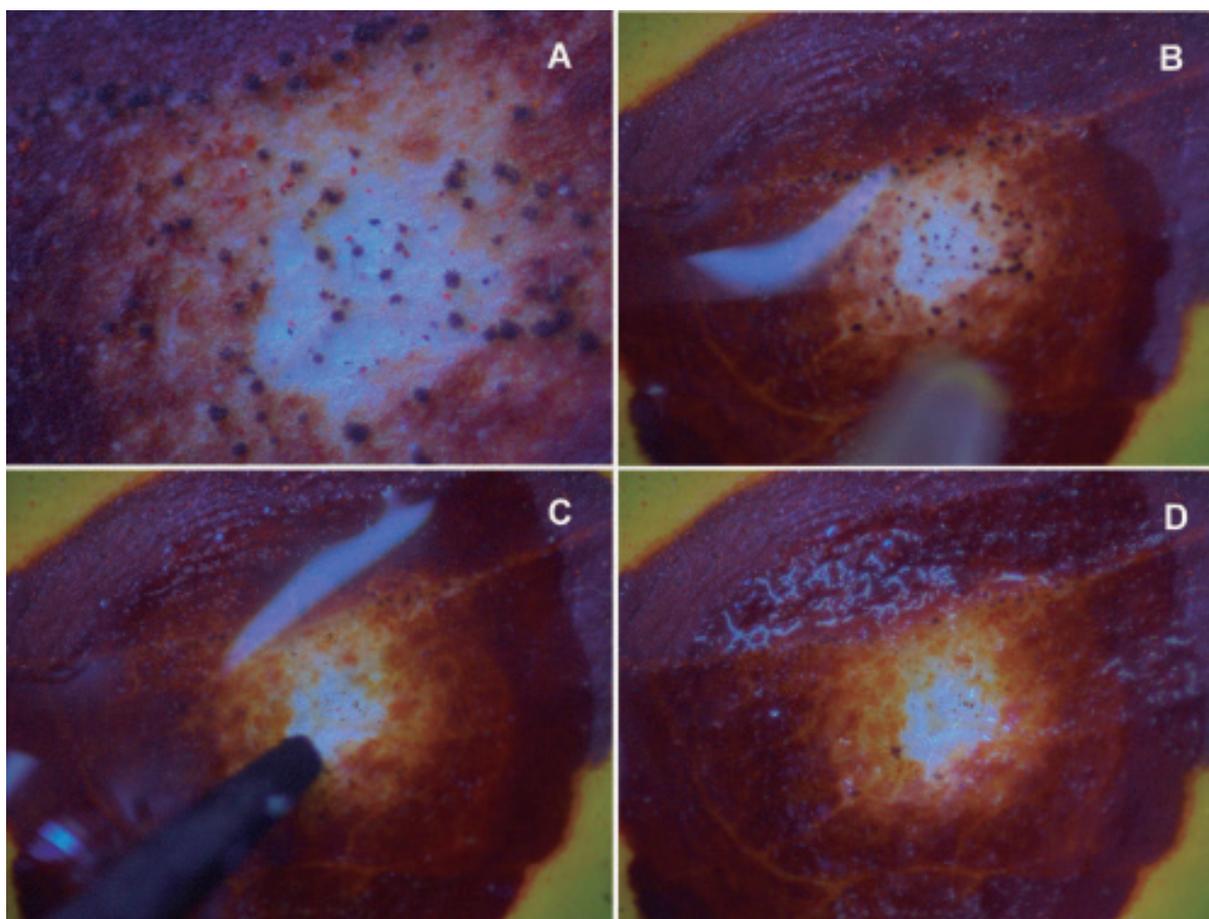
<sup>5</sup>Universidade Federal de Lavras /UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - Cx. P. 3037 - 37.200-000 - Lavras - MG deilamagna@hotmail.com

Selecionam-se as lesões com estruturas de reprodução visíveis, conidióforos e conídios (Fig 1 – A). Com auxílio de uma pipeta coloca-se de 20 a 30  $\mu$ L de água destilada esterilizada sobre a lesão (Fig 1 – B) de modo que a gota d'água cubra as estruturas de reprodução do fungo. Então, com auxílio de estilete ou agulha, realiza-se leve raspagem na superfície foliar com a água, para retirar as estruturas da lesão e deixá-las dispersas na água (Fig 1 – C).

Logo após retira-se a água da superfície da lesão com auxílio da pipeta (Fig 1 – D) e deposita-se a solução em placa de Petri, nesse caso empregou-se o meio Malte (20 g de malte, 20 g de ágar e 1 L de água).

A placa com a suspensão é levada à capela de fluxo, onde a mesma é espalhada sobre toda superfície da placa com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas são incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C por 72 horas, onde é possível identificar as colônias de *C. coffeicola* e repicá-las afim da obter cultura pura.

Esta metodologia foi denominada “Técnica da Pipeta”. Com ela foi possível obter mais de 70 isolados puros e viáveis de *C. coffeicola* de diferentes regiões de Minas Gerais e de outros estados como Bahia, Espírito Santos e São Paulo, no Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Lavras.



**FIGURA 1** - A) Observação das estruturas de reprodução de *Cercospora coffeicola* nas lesões.

B) Deposição da gota de água sobre a lesão com auxílio da pipeta.

C) Obtenção da solução com as estruturas de reprodução.

D) Retirada da solução da superfície foliar.

**REFERÊNCIAS**

- CUSTÓDIO, A. A. P. et al. Intensidade da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro quanto à face de exposição das plantas. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 3, p. 214-228, set./dez. 2010.
- DELL'ACQUA, R. et al. In vitro, in vivo and molecular variability of *Cercospora coffeicola* isolates. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 313-326, 2011.
- LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; SANTOS, F. S. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, p. 209-211, Apr. 2012.
- POZZA, E. A.; CARVALHO, L. V.; CHALFOUN, S. M. Sintomas e injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.