

ÁCIDO HEXANOICO NO CONTROLE DA MANCHA AUREOLADA E CERCOSPORIOSE EM MUDAS DE CAFEIEIRO¹

Bianca Cristina de Deus²; Luís Otávio Saggion Beriam³; Flávia Rodrigues Alves Patrício⁴; Douglas Silva Domingues⁵

¹Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (#16/10896-0) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

²Aluna de Pós-Graduação, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, bianca.c.deus_@hotmail.com

³Pesquisador, Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, Instituto Biológico, Campinas, SP, beriam@biologico.sp.gov.br

⁴Pesquisadora, Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, Instituto Biológico, Campinas, SP, flavia@biologico.sp.gov.br

⁵Pesquisador, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, douglas.domingues@unesp.br

RESUMO: O Brasil é o maior produtor de café arábica e sua cultura pode ser acometida por diversas doenças como a mancha aureolada e a cercosporiose do cafeeiro. A mancha aureolada causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (*Psg*) é uma doença que afeta folhas, ramos e inflorescências com lesões de coloração parda podendo ser acompanhadas por um halo amarelado. Lesões pardo-claras com o centro branco-acinzentado são características da cercosporiose do cafeeiro causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*, esta doença pode afetar tanto as folhas como os frutos comprometendo a qualidade da bebida. O ácido hexanoico (Hx) ou caproico, um ácido orgânico com odor característico semelhante a animais de curral, tem demonstrado ser eficiente no controle de patógenos em plantas, como foi observado em citros e em tomate. Este trabalho teve como objetivo verificar o controle exercido pelo ácido hexanoico sobre *Psg* e *Cercospora*. Foram preparadas placas de Petri contendo meio nutriente ágar (NA) onde o Hx foi adicionado em seis concentrações e alíquotas das suspensões de *Psg* foram distribuídas nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28°C por 48h e posteriormente avaliado o número de colônias viáveis da bactéria. Placas de microcultura de 24 poços foram preparadas com o meio de cultura V8 acrescido do ácido hexanoico em seis concentrações e 50 µL das suspensões de *C. coffeicola* foram adicionados a cada poço da placa. As placas permaneceram por 48h no escuro a 25°C e após este período foi avaliada a germinação do patógeno através do número de colônias características. Mudanças de cafeeiro das cultivares Catuaí Vermelho e Obatã foram tratadas com ácido hexanoico (2mM) e acibenzolar-S-metil (1mM) e inoculadas com *Psg* ou *C. coffeicola*. As avaliações foram iniciadas aos 12 dias após inoculação para *Psg* e aos 30 dias após inoculação para *C. coffeicola*. Nos experimentos *in vitro* ambos os patógenos tiveram seu crescimento afetado pela presença de Hx no meio havendo redução total de crescimento nas doses mais elevadas utilizadas, enquanto que nos experimentos em casa de vegetação o efeito do Hx sobre *Psg* foi melhor observado na cultivar Catuaí Vermelho e no controle de *C. coffeicola* o Hx mostrou-se semelhante ao tratamento com ASM.

PALAVRAS-CHAVE: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *Cercospora coffeicola*, doença, café

HEXANOIC ACID IN THE CONTROL OF BACTERIAL HALO BLIGHT AND BROWN EYE SPOT IN COFFEE SEEDLINGS

ABSTRACT: Brazil is the largest producer of arabica coffee and its cultivation can be affected by several diseases, such as bacterial halo blight and brown eye spot. The bacterial halo blight, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (*Psg*), is a disease that affects the leaves, branches and inflorescences with brown lesions that may be accompanied by a yellowish halo. Light brown lesions with a gray-white center are characteristic of brown eye spot caused by *Cercospora coffeicola*, this disease can affect leaves and fruits, compromising cup quality. Hexanoic acid (Hx) or caproic acid, an organic acid with characteristic corral-like odor, has been shown to be effective in controlling plant pathogens, as observed in citrus and tomato. The objective of this study was to verify if hexanoic acid can control *Psg* and *Cercospora coffeicola*. We prepared Petri dishes containing agar nutrient medium (NA), adding six concentrations of Hx, and aliquots of prepared suspensions from two *P. syringae* pv. *garcae* strains were distributed on the plates, using a Drigalski handle. Plates were then incubated at 28°C for 48h with subsequent evaluation of the number of bacterial viable colonies. 24-well microculture plates were prepared with culture medium V8, in which we added six concentrations of hexanoic acid and 50 µL of prepared suspensions from three *C. coffeicola* isolates. Plates were maintained for 48h in the dark at 25°C and, subsequently, we evaluated pathogen germination by the number of characteristic colonies. Coffee seedlings of Catuaí Vermelho and Obatã cultivars were treated with hexanoic acid (2mM) and acibenzolar-S-methyl (1mM) and inoculated with *Psg* or *C. coffeicola*. Weekly evaluations were initiated at 12 days after inoculation for *Psg* and at 30 days after inoculation for *C. coffeicola*. In *in vitro* experiments, Hx affected the growth of both pathogens, while in greenhouse experiments the effect of Hx on *Psg* was better observed in Catuaí Vermelho and in the control of *C. coffeicola*, Hx was similar to ASM treatment.

KEY WORDS: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *Cercospora coffeicola*, disease, coffee

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café arábica e exportador mundial de grãos de café sendo também o segundo maior consumidor, destacando-se Estados Unidos, Brasil e Japão. Cultura de grande importância brasileira sendo um dos principais produtos das exportações agropecuárias e gera anualmente bilhões de dólares para a economia (United States Department of Agriculture, 2018; Companhia Nacional de Abastecimento, 2018). A mancha aureolada, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, tornou-se uma doença muito importante nos últimos anos no Brasil, especialmente no sul de Minas Gerais, no Cerrado e nos Estados de São Paulo e Paraná (Patrício; Oliveira, 2014; Almeida *et al.*, 2012). Ela é mais relevante em lavouras jovens de até 4 anos de idade sujeitas a ventos frios e em temperaturas amenas com umidade elevada (Patrício; Oliveira, 2014). As lesões nas folhas são de coloração parda e podem ser acompanhadas por um halo amarelado, também são encontradas lesões nas rosetas, inflorescências e frutos novos, que podem comprometer parte da produção (Hinkosa *et al.*, 2017; Mattiello; Dias; Franco, 2017). A cercosporiose causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* está presente durante o ano todo na lavoura, mas é mais prejudicial durante o ciclo produtivo da cultura, quando pode estar relacionada à queda de frutos, que reduz a produção, e a prejuízos na qualidade da bebida. A doença forma lesões pardo-claras com o centro branco-acinzentado nas folhas, que caem rapidamente, ocorrendo desfolha e seca dos ramos. A cercosporiose pode afetar diretamente a produção da cultura, derrubando os frutinhos em expansão, especialmente quando incide no período de quatro a seis meses após o florescimento (Patrício; Oliveira, 2014). Estudos têm demonstrado que o uso do ácido hexanoico em plantas funciona como uma eficiente maneira de controle contra patógenos e leva a uma indução de resistência em plantas. Ele funciona como um agente de preparo para que a planta reconheça a entrada de patógenos, como observado em plantas de tomate, *Arabidopsis* e citros no controle de *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* respectivamente (Leyva *et al.*, 2008; Vicedo *et al.*, 2009; Llorens *et al.*, 2013). O objetivo deste estudo foi verificar o controle de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *Cercospora coffeicola* *in vitro* e *in vivo* com a aplicação de ácido hexanoico.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento *in vitro* - Foram preparadas placas contendo meio nutriente ágar (NA) onde o ácido hexanoico (Hx) foi adicionado nas concentrações de 0, 0,8, 2, 3,2, 4 e 5 mM de Hx por litro de meio. Foi preparada uma suspensão aquosa contendo duas linhagens de *Psg* (IBSBF 1664 e IBSBF 2840), mantidas durante 48h em meio NA, com concentração aproximada de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹. Alíquotas de 10µL dessa suspensão foram adicionadas às placas contendo meio NA com as cinco diferentes concentrações de Hx e distribuídas com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas permaneceram a 28°C por 48 horas e foi avaliado o número de colônias viáveis da bactéria. Também foi avaliado o efeito do Hx no crescimento de *C. coffeicola*, onde placas de microcultura de 24 células contendo o meio de cultura de oito vegetais (V8) foram preparadas, nas quais o Hx foi adicionado nas concentrações de 0, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10mM por 100mL de meio. Foi preparada uma suspensão contendo 10^3 conídios dos isolados de *C. coffeicola* (IBLF 841, IBLF 1179 e IBLF 1309) e 50 µL da suspensão foram depositados em cada célula da placa de microcultura. As placas foram incubadas a 25°C, no escuro, por 48 horas. Após este período as placas foram observadas em microscópio estereoscópico contando-se os conídios germinados pela formação de colônias características do patógeno. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, e cada repetição foi constituída por uma placa de Petri ou célula da placa de microcultura. Os resultados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

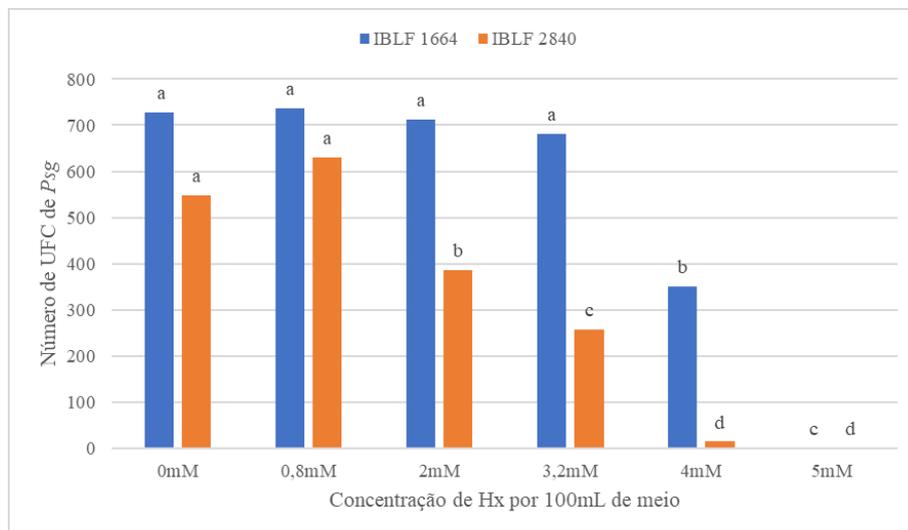
Experimento em casa de vegetação - Mudanças de cafeeiro das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144 e Obatã IAC 1669-20, com cinco a seis pares de folhas foram tratadas com Hx na concentração de 2mM e acibenzolar-S-metil (ASM) na concentração de 1mM. Foram aspergidos o segundo, terceiro e quarto par de folhas, a partir do ápice das plantas cerca de 100mL de solução por planta nas superfícies abaxiais e adaxiais, com um atomizador de plástico. Plantas controle foram aspergidas com água destilada esterilizada. As mudas foram inoculadas com uma suspensão contendo 3×10^8 UFC dos dois isolados de *Psg* ou 10^5 conídios por mL, provenientes de colônias de *C. coffeicola* utilizados nos experimentos *in vitro*. As mudas foram colocadas em câmara úmida por 72 horas. Após a retirada da câmara úmida as mudas foram transferidas para uma casa de vegetação com irrigação por nebulização. As avaliações foram iniciadas aos 12 dias após inoculação para *Psg* e aos 30 dias após inoculação para *C. coffeicola* totalizando quatro avaliações realizadas semanalmente segundo Rodrigues *et al.* (2015). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 16 repetições, sendo cada repetição representada por uma muda de cafeeiro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento de *P. syringae* pv. *garcae* (Fig.1) apresentou a redução no número de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir da dose de 2mM, demonstrando severa redução na dose de 4mM e inibição total de crescimento na dose 5mM para a cepa IBSF 2840. A cepa IBSF 1664 apresentou redução de seu crescimento apenas na dose de 4mM com a inibição total de crescimento na dose mais alta de 5mM. No estudo de Llorens *et al.* (2015), para verificar a eficácia do Hx contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* adicionaram o Hx ao meio de cultura em diferentes concentrações e perceberam que a menor dose (0,06mM) não afetou o crescimento da bactéria em comparação com as placas que não

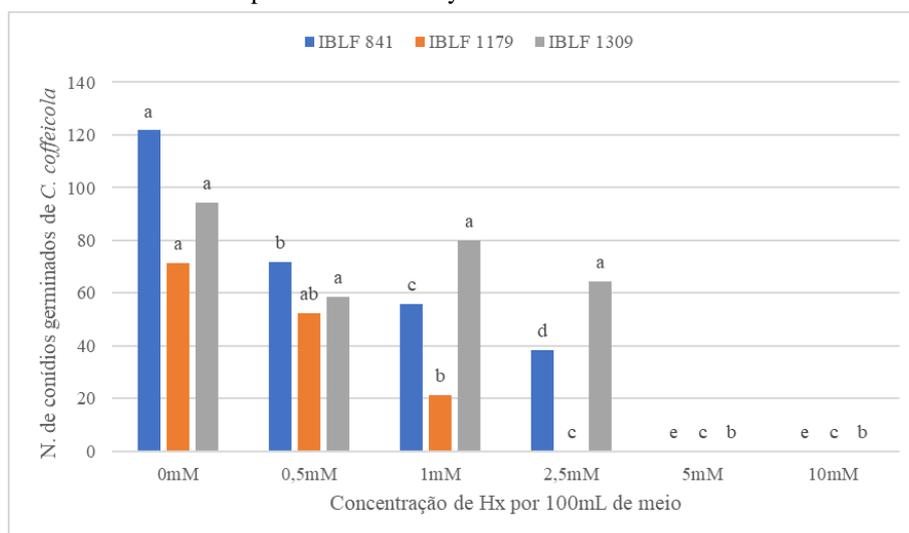
foram tratadas, os tratamentos de 0,6, 1,5 e 3mM apresentaram redução de 8%, 11% e 16% respectivamente e as concentrações acima de 3mM inibiram completamente o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Figura 1 - Número de unidades formadoras de colônias de *P. syringae* pv. *garcae* em meio de cultura NA acrescido de Ácido Hexanoico em diferentes concentrações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.



A germinação de conídios em meio de cultura V8 apresentou que o isolado IBLF 1309 diferiu estatisticamente entre os tratamentos de 0 – 2,5mM e 5 – 10mM, sendo que a partir de 5mM a germinação foi reduzida a 0. O isolado IBLF 1179 mostrou-se semelhante de 0 a 1mM e nas demais concentrações sua germinação foi reduzida a 0. O isolado IBLF 841 teve a maior germinação em 0mM que foi reduzindo ao longo dos tratamentos até chegar em 0 nas concentrações 5 e 10mM (Fig.2). No controle de *Alternaria alternata*, Llorens *et al.* (2013) perceberam que além da adição de Hx ao meio, o pH do meio também influenciava na germinação do fungo. A redução da germinação independente do pH foi observada quando a concentração foi aumentada para 30mM e a inibição da germinação era 50% maior em pH baixo nas concentrações entre 6 e 12mM. Leyva *et al.* (2008) verificaram que a germinação de *Botrytis cinerea* também era afetada pela presença de Hx e a variação de pH. Observaram a completa inibição da germinação na concentração de 16mM em qualquer dos pH utilizados (3,6 a 5,5), nas baixas concentrações de Hx (1,5 – 6mM) a inibição da germinação era dependente do pH. A concentração mínima para inibição foi estimada no pH 5,5 e foi de 16mM, porém a concentração de 3mM apresentou uma redução significativa na germinação.

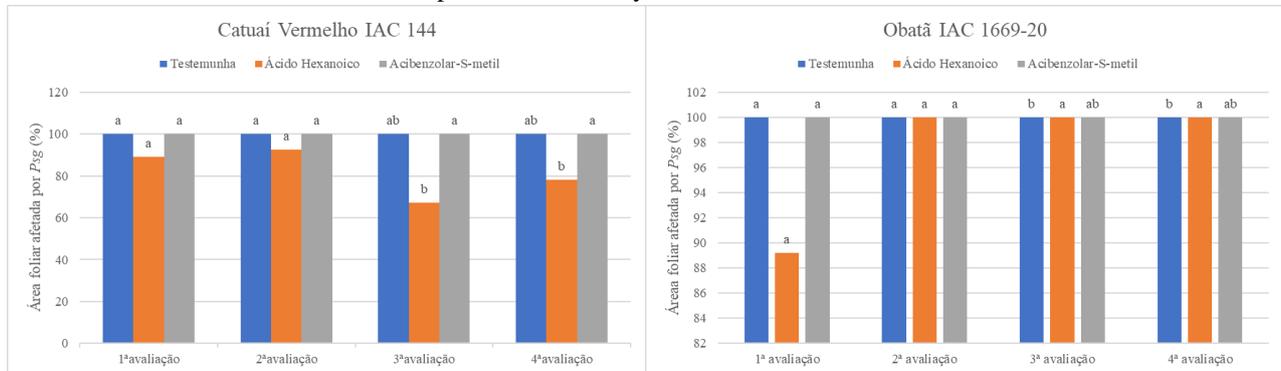
Figura 2 - Germinação de conídios de isolados de *C. coffeicola* em microplacas contendo o meio de cultura V8 acrescido de Ácido Hexanoico em diferentes concentrações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.



No controle de *Psg*, para a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 o Hx apresentou um controle da doença que pôde ser melhor observado nas terceira e quarta avaliações sendo mais efetivo no controle comparado ao ASM. Já para a cultivar

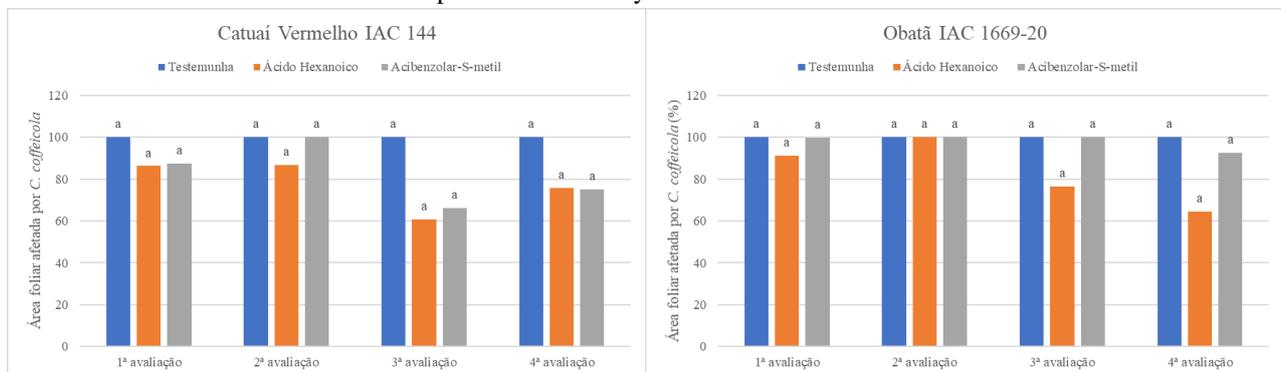
Obatã IAC 1669-20 todos os tratamentos foram semelhantes entre si onde os tratamentos com ASM e Hx obtiveram as maiores médias de severidade da doença nas últimas avaliações, sendo o Hx com maior média em relação ao ASM (Fig.3).

Figura 3 - Severidade da mancha aureolada, avaliada pela porcentagem de área foliar afetada pela doença, em mudas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho IAC 144 e Obatã IAC 1669-20. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.



Para o controle de *C. coffeicola* tanto na cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 quanto na cultivar Obatã IAC 1669-20 (Fig.4) os tratamentos apresentaram ação semelhante do controle da doença nos tratamentos com Hx e ASM apresentando as menores médias de severidade da doença para a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 e o tratamento com Hx com a menor média de severidade para a cultivar Obatã IAC 1669-20.

Figura 4 - Severidade da cercosporiose, avaliada pela porcentagem de área foliar afetada pela doença, em mudas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho IAC 144 e Obatã IAC 1669-20. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.



CONCLUSÕES

1. O ácido hexanoico teve efeito sobre *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e *Cercospora coffeicola* quando adicionado ao meio de cultura levando a total redução de crescimento nas doses mais altas utilizadas.
2. Quando aplicado nas mudas, na cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 o ácido hexanoico apresenta melhor desempenho no controle de *P. syringae* pv. *garcae* quando comparado ao tratamento com acibenzolar-s-metil.
3. No controle de *C. coffeicola* tanto o tratamento com ácido hexanoico quanto o tratamento com acibenzolar-s-metil obtiveram resultado semelhante em ambas as cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I. M. G.; MACIEL, K. W.; BERIAM, L. O. S.; RODRIGUES, L. M. R., DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES-NETO, J.; PATRÍCIO, F. R. A. Increase in Incidence of Bacterial Halo Blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Coffee Producing Areas in Brazil. ASIC – Costa Rica, ANAIS, CD-ROM. p.1080-1084, 2012.
ANUÁRIO BRASILEIRO DO CAFÉ. Mais à frente. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz do Sul, 2015. 104p.
COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira Café. V. 5 – Safra 2018. N. 4 – Quarto levantamento. Dezembro 2018.

- HINKOSA, G.G.; LENCHO, A.; SELVARAJ, T.; SADESSA, K. Pathogenicity and molecular characterization of coffee bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* van Hall) isolates from Sidama and Gedeo Zones, SNNP Regional State, Ethiopia. *International Journal of Life Sciences*. Vol. 5, p. 35-45. 2017.
- KRAVCHUK, Z.; VICEDO, B.; FLORS, V.; CAMAÑES, G.; GONZÁLEZ-BOSCH, C.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect Arabidopsis against *B. cinerea*. *Journal of Plant Physiology*. n. 168. p. 359-366. 2011.
- LEYVA, M. O.; VICEDO, B.; FINITI, I.; FLORS, V.; DEL AMO, G.; REAL, M.D.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; GONZÁLEZ-BOSCH, C. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant pathology*, v. 57, n. 6, p. 1038-1046, 2008.
- LLORENS, E.; FERNÁNDEZ-CRESPO, E.; VICEDO, B.; LAPEÑA, L.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Enhancement of the citrus immune system provides effective resistance against Alternaria brown spot disease. *Journal of Plant Physiology*. n. 170, p. 146– 154. 2013.
- LLORENS, E.; VICEDO, B.; LÓPEZ, M.M.; LAPEÑA, L.; GRAHAM, J.F.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Induced resistance in sweet Orange against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by hexanoic acid. *Crop protection*. v. 74. p. 77-84. 2015.
- MATTIELO, J.B.; DIAS, J.R.; FRANCO, L. Mancha aureolada em cafeeiros ataca mais plantas deficientes. 43º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas – MG. 2017. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/9316>>
- PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BARROS, B.C.; SANTOS, A.S.; FRARE, P.M. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. *Annals of Applied Biology*, n. 152, p. 29-39, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7348.2007.00187.x/abstract>>
- PATRÍCIO, F.R.A.; OLIVEIRA, E.G. Desafios no manejo de doenças do café. *Visão Agrícola*, v.12, p.51-54, 2014.
- RODRIGUES, L.M.R.; QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; GUERREIRO-FILHO, O. Anatomical changes on coffee leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* *Summa Phytopathologica*, v.41, n.4, p.256-261, 2015.
- VICEDO, B.; FLORS, V.; LEYVA, M. O.; FINITI, I.; KRAVCHUK, Z.; REAL, M. D.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; GONZÁLEZ-BOSCH, C. Hexanoic Acid-Induced Resistance Against *Botrytis cinerea* in Tomato Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. V. 22, n. 11, p. 1455-1465. 2009. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-22-11-1455>>