



CECILIA ARMESTO

**VARIABILIDADE BIOLÓGICA E MOLECULAR
DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM
CAFEEIROS**

**LAVRAS – MG
2013**

CECILIA ARMESTO

**VARIABILIDADE BIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Colletotrichum*
gloeosporioides EM CAFEEIROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dr. Mario Sobral de Abreu

**LAVRAS – MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Armesto, Cecília.

Variabilidade biológica e molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* em cafeeiros / Cecília Armesto. – Lavras : UFLA, 2013.

101 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.

Bibliografia.

1. *Colletotrichum gloeosporioides* - Agressividade. 2. AFLP. 3. Café - Doenças fúngicas. 4. *Colletotrichum gloeosporioides* – Patogenicidade. 5. Enzimas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.44

CECILIA ARMESTO

**VARIABILIDADE BIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Colletotrichum
gloeosporioides* EM CAFEEIROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de Setembro de 2013.

| | |
|--|--------|
| Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza | EPAMIG |
| Dra. Sandra Marisa Mathioni | UFLA |
| Dr. Edson Ampélio Pozza | UFLA |
| Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros | UFLA |



Dr. Mário Sobral de Abreu
Orientador

**LAVRAS - MG
2013**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pelo financiamento do projeto.

Ao professor Mario Sobral de Abreu, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, ensinamentos e orientação.

As minhas queridas Fernanda e Gil por toda colaboração, convivência, ótimas e longas conversas que tornaram o período de doutoramento mais leve e divertido.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal Priscilla e Suellen, e Laboratório de Patologia de Sementes Carolina e Carla, pela paciência e por toda a ajuda concedida.

Aos colegas Igor e Quélen (Depto. Biologia - Setor de Genética e melhoramento de Plantas) por todo o material bibliográfico, tempo e ajuda concedida, pois sem eles parte deste trabalho não existira.

Ao Piero pelo carinho, apoio e por estar ao meu lado sempre.

Aos meus pais Juan e Joana, pelo amor e todo esforço para que eu chegasse até aqui. A minha irmã Mariana e ao meu cunhado Bráulio pela companhia.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e auxílio e a todos que indiretamente me ajudaram a concluir este trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

Fungos do gênero *Colletotrichum* são cosmopolitas, sendo responsáveis por doenças em diversas plantas de importância agrônômica. Na cultura do Café, três espécies foram descritas: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum kahawae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. No Brasil ocorrem somente as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, as quais são atribuídos sintomas como: antracnoses, seca de ponteiro, mancha manteigosa, entre outros. Devido à vasta gama de sintomas observados e ao grande número de isolados encontrados nas plantas, acredita-se na existência de possíveis cepas patogênicas do patógeno, ou até mesmo uma espécie específica ao cafeeiro. Desse modo, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a variabilidade dos isolados de *Colletotrichum spp.* através de características morfo-fisiológicas, patogênicas, enzimáticas e genéticas. Foram coletados 33 isolados de *Colletotrichum spp.* em diversas lavouras cafeeiras do estado de Minas Gerais. Todos os isolados apresentaram características morfo-fisiológicas semelhantes, sendo identificados como da espécie *C. gloeosporioides*. Os isolados quando inoculados em frutos apresentaram-se todos patogênicos, com níveis de agressividade variáveis, porém quando inoculados em hipocótilos verificou-se que apenas 57% destes foram patogênicos. Os 33 isolados foram capazes de produzir as enzimas hidrolíticas: amilase, lacase, lipase, proteinase e pectinase, assim como pectinases específicas (polimetilgalacturonase, poligalacturonase e pectinase), os quais obtiveram correlação positiva quando avaliados em conjunto com os índices de agressividade. Por meio da análise de AFLP, observou-se a formação de três grupos distintos: isolados provenientes de plantas com sintomas de mancha manteigosa, provenientes de sintomas de seca de ponteiro e antracnose.

Palavras-chave: *C. gloeosporioides*. Agressividade. Enzimas. AFLP.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Colletotrichum* are cosmopolitan, are responsible for several diseases in plants of agronomic importance. In the culture of coffee, three species have been described: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum kahawae*. In Brazil there are only the species *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, which are attributed symptoms such as: antracnoses, die back, blister spot, among others. Due to the wide range of observed symptoms and the large number of isolates found in plants, it is believed the existence of possible pathogenic strains of the pathogen, or even a coffee species-specific. Thus, the present study evaluated the variability of isolates *Colletotrichum* spp. through morpho-physiological, pathogenic, enzymatic and genetic characteristics. Was collected 33 isolates of *Colletotrichum* spp. in several coffee plantations in the state of Minas Gerais. All isolates had similar morpho-physiological characteristics, and identified as the species *C. gloeosporioides*. When inoculated in fruits, all isolates presented variable pathogenic levels of aggressiveness, but when inoculated in hypocotyls, only 57% were pathogenic. The 33 isolates were able to produce hydrolytic enzymes: amylase, laccase, lipase, protease and pectinase, and specific pectinases (polymethylgalacturonase, polygalacturonase and pectinase), which had a positive correlation when evaluated in conjunction with results of aggression. AFLP analysis provided the formation of three major groups, where, was possible the distinction between isolates from plants with symptoms of blister spot and from symptoms of dry pointer and anthracnose,

Keywords: *C. gloeosporioides*. Aggressivity. Enzymes. AFLP.

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 | A cultura do café no Brasil | 11 |
| 2.2 | O gênero <i>Colletotrichum</i> | 12 |
| 2.3 | <i>Colletotrichum</i> spp. e o cafeeiro | 15 |
| 2.4 | Fatores de patogenicidade em fungos | 16 |
| 2.5 | Enzimas relacionadas a patogênese | 19 |
| 2.6 | A variabilidade genética e os marcadores moleculares | 23 |
| 2.7 | As proteínas fluorescentes e os estudos de colonização por fitopatógenos | 26 |
| 3 | HIPÓTESE | 28 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| | Coleta e preservação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp | 29 |
| | Obtenção das culturas monospóricas | 31 |
| | Produção de hipocótilos e mudas | 31 |
| 4.1 | Caracterização fisiomorfológica, molecular e patogênica dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp associados ao cafeeiro | 32 |
| 4.2 | Colonização de <i>Colletotrichum</i> spp. transformado com <i>gfp</i> em plântulas de cafeeiro | 38 |
| 4.3 | Atividade enzimática dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp associados ao cafeeiro | 40 |
| 4.4 | Variabilidade genética dos isolados dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp associados ao cafeeiro por AFLP | 45 |
| 4.5 | Sistematização e análise dos resultados..... | 46 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 6 | CONCLUSÕES | 82 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 83 |
| | REFERÊNCIAS | 84 |

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma das atividades mais importantes do país e de grande representatividade na economia mundial. O desenvolvimento de uma cafeicultura sustentável no Brasil passa pelo aumento da rentabilidade do produtor, como forma de garantir sua permanência na atividade. Isso depende de sistemas de cultivo estáveis, que proporcionem maior longevidade para as lavouras e rentabilidade frequente. Cultivares produtivas, adaptadas a cada condição edafoclimática e sistema de cultivo e resistentes a pragas e doenças estão entre os principais componentes da sustentabilidade da cafeicultura.

A incidência de microorganismos entre as fases de pré e pós-colheita tem se apresentado como um fator limitante a uma produção de qualidade, sendo os fungos filamentosos o maior fator responsável pelos danos causados à cultura cafeeira.

Dentre as doenças de etiologia fúngica que acometem a cultura destacam-se: ferrugem (*Hemileia vastatrix*), cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), mancha-de-phoma (*Phoma spp*), antracnose e mancha-manteigosa, sendo estas duas últimas atribuídas ao complexo *Colletotrichum*.

Espécies do gênero *Colletotrichum* ocorrem em cafeeiros em todas as regiões produtoras do mundo. No Brasil existem duas espécies relacionadas a cultura do café: *C. gloeosporioidese* e *C. acutatum*. Segundo Abreu et al (2008), a ocorrência de *Colletotrichum* é grave em regiões cafeeiras no Brasil, determinando perdas significativas nas produções.

Segundo Orozco (2003), este patossistema é composto por populações de espécies de *Colletotrichum* que causam diversos sintomas, havendo indícios da existência de raças patogênicas. Este fato pode estar associado à existência de alta variabilidade genética dentro do gênero, sendo este um dos fatores que têm

dificultado o estabelecimento de estratégias específicas para o manejo da doença.

A falta de dados em relação aos isolados de *Colletotrichum* spp. que incidem sobre o cafeeiro no Brasil e dos danos diretos que este fungo pode causar, geram dúvidas a respeito de sua patogenicidade (PARESQUI, 2003), e conseqüentemente sobre as estratégias de controle. Para este fim, a caracterização e a determinação taxonômica do gênero *Colletotrichum* têm dependido de critérios morfogenéticos e sua afinidade por hospedeiros (MARQUES-MARÇAL et al., 2009).

Neste contexto, se faz necessário elucidar a relação do fungo com a cultura do café no Brasil, determinando a espécie de *Colletotrichum* normalmente associada ao cafeeiro, e despertando-se também, a necessidade da realização de pesquisas em relação ao estudo da variabilidade destes, os quais apontam para a existência de grupos de especialização patogênica.

Deste modo o presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre a identidade e características de *Colletotrichum* spp., por meio de estudos de caracterização genético-fisiológica dos isolados, os quais, possam estar associados a patogenicidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do Cafeeiro no Brasil

A cultura do café chegou ao norte do Brasil, mais precisamente em Belém, em 1727, trazido da Guiana Francesa pelo Sargento-Mor Francisco de Mello Palheta a pedido do governador do Maranhão e Grão Pará. Já naquela época a cultura do café possuía grande valor comercial. Devido às nossas condições climáticas, favoráveis para seu desenvolvimento, a cultura se propagou-se rapidamente, com a produção voltada para o mercado doméstico. Em sua trajetória pelo Brasil a cultura do café passou pelo Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Num espaço de tempo relativamente curto, a produção do café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira (ABIC, 2010).

Desde sua chegada ao país, a cultura cafeeira foi o maior gerador de riquezas e seu produto o mais importante da história nacional (CAMPOS, 2005). As primeiras exportações expressivas ocorreram em 1802. Entre 1925 e 1929, o café chegou a contribuir isoladamente com 70% do valor das exportações brasileiras. A partir da década de 70, a produção ganhou um grande impulso com a conquista das regiões do cerrado (MAPA, 2013).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, e segundo maior consumidor do produto e apresenta atualmente, um parque cafeeiro estimado em 2,3 milhões de hectares. São cerca de 287mil produtores, que distribuem-se em 15 estados: Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo (MAPA, 2013).

A produção brasileira de café esta a frente do Vietnã (20 milhões de sacas), da Indonésia (8,25 milhões de sacas), Colômbia (7,8 milhões de sacas) e

Etiópia (6,5 milhões de sacas) (OIC, 2012). Em de 2011 a safra do grão alcançou 50,8 milhões de sacas, sendo responsável por 6,7% da participação nas exportações do agronegócio, gerando US\$ 6,5 bilhões para a economia do Brasil. Os principais países importadores do café brasileiro são Estados Unidos, Alemanha, Itália, Japão – café verde; e Rússia, Estados Unidos, Ucrânia e Japão – Café torrado e moído (MAPA, 2013).

O agronegócio do café emprega direta e indiretamente, mundialmente, cerca de meio bilhão de pessoas, ou seja, 8% da população mundial, desde a sua produção até o seu consumo final. No Brasil, este setor do agronegócio é o que mais emprega, gerando mais de 8 milhões de empregos diretos e indiretos no país (CAMPOS, 2005). No período compreendido entre Novembro/2011 e Outubro/2012, a ABIC registrou o consumo de 20,33 milhões de sacas, representando um acréscimo e 3,09% em relação ao período anterior correspondente (Novembro/2010 a Outubro/2011), que havia sido de 19,72 milhões de sacas (ABIC, 2013). Neste ano, a segunda estimativa de produção de café (arábica e robusta) para a safra 2013 indica que o país deverá colher 48,59 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado (CONAB, 2013).

Minas Gerais é o maior produtor brasileiro e colheu em 2012, cerca de 22,2 mil de sacas de café, o que representou 51% do total da safra nacional (CONAB, 2013). A região Sul e Centro-Oeste de Minas Gerais respondeu por 50% da produção do Estado em 2012 (CONAB, 2013).

2.2 O gênero *Colletotrichum*

Fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* são conhecidos por serem patógenos agressivos que ocasionam doenças e acarretam perdas em diversas culturas por todo o mundo (HYDE et al, 2009). São de grande importância principalmente em áreas tropicais e subtropicais, tendo sido também

reportado espécies que ocorrem em culturas de clima temperado (CANNON et al., 2012).

Espécies de *Colletotrichum* estão principalmente relacionadas a sintomas de antracnose, as quais são caracterizadas por lesões necróticas de centro depressivo em folhas, caules, flores e fruto. A produção de frutas é especialmente afetada, porém o patógeno também tem causado perdas devastadoras na cultura do café e afeta seriamente a produção de cereais (CANNON et al., 2012). O gênero foi recentemente eleito como o oitavo maior grupo fúngico de patógenos de plantas no mundo, baseado em perspectivas científicas e econômicas (DEAN et al., 2012).

Além de ocasionar doenças com sintomas muito bem definidos, espécies de *Colletotrichum* podem ser encontradas tanto em plantas de mata nativa, como em plantas cultivadas sem a manifestação de sintomas (PFENNING; SALGADO; LIMA, 2007).

Desde a primeira tentativa de classificação do gênero, feita por Arx em 1957, na qual foram estimadas 11 espécies, o gênero tem sido re-classificado ao longo dos anos, evoluindo juntamente com as técnicas de identificação de fitopatógenos, passando a 40 espécies por Sutton (1992), a 60 pelo *Dictionary of the Fungi* (KIRK et al., 2008), sendo sugeridas 66 de *Colletotrichum* no ano de 2009 por Hyde et al.

O gênero *Colletotrichum* é pertencente à classe Coelomycetes, da ordem Melanconiales, sendo caracterizado por frutificações setosas, denominadas acérvulos, nas quais conídios hialinos são produzidos em massa alaranjada ou creme (MENEZES, 2002).

O patógeno é favorecido por temperaturas entre 22 e 25 °C, além de necessitar de alta umidade. As temperaturas ótimas para germinação de conídios e formação de apressórios estão entre 22 e 23 °C. Os conídios somente são liberados dos acérvulos quando estes encontram abundância de umidade.

O gênero *Colletotrichum* apresenta colônia de tonalidade muito variada, de coloração branco-gelo a cinza escuro, com quantidade variável de micélio aéreo, escleródios presentes em algumas espécies do gênero (SUTTON, 1992). As células conidiogênicas do gênero geralmente são agregadas em conidiomatas (acérvulos), mas também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio (MENEZES, 2002). Os acérvulos variam em forma e tamanho dentro de uma mesma espécie e sobre uma mesma planta suscetível. Geralmente são rasos com formato de crosta, lentilha ou pústula e alcançam um diâmetro de 40 μm a 1 mm, instalam-se na epiderme do tecido do hospedeiro, e menos freqüentemente, sob a epiderme (SUTTON, 1992).

No material vegetal, observa-se com freqüência a presença de setas. O micélio é apocítico (septado) e denso, cresce nas células epidérmicas ou em células mais profundas. As hifas se orientam no sentido perpendicular à superfície do substrato. Dessa forma, fazem pressão sobre as camadas superficiais, forçando-as a se romperem e liberarem os propágulos reprodutivos do fungo (SUTTON, 1992). De acordo com Menezes (2002), as setas e células conidiogênicas parecem ser homólogas e, em determinadas condições do ambiente, as setas podem produzir conídios na extremidade.

Espécies do gênero *Colletotrichum* podem apresentar diversas estratégias de colonização dos tecidos, que vão de hemibiotrofia intracelular na qual, as células são colonizadas por um período curto mantendo-as para a sua nutrição, e então se convertem, para a fase necrotrófica matando a célula; a colonização intramural subcuticular, na qual o fungo cresce sob a cutícula e na parede das células epidérmicas e subjacentes (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2005).

2.3 *Colletotrichum* spp. e o Cafeeiro

O gênero *Colletotrichum* encontra-se amplamente distribuído por todas as regiões produtoras cafeeiras pelo mundo, ora ocorre como saprófita, ora causando doenças (PARESQUI et al, 2003). Atualmente na cultura do café, são conhecidas três espécies de *Colletotrichum*: *C. kahawae* - espécie geograficamente restrita ao continente africano, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Nas lavouras cafeeiras do Brasil predomina a espécie conhecida como *Colletotrichum gloeosporioides*, o qual está associado a um complexo de sintomas: antracnose de folhas e frutos, seca ou morte de ponteiros (*die-back*), queima-castanha (*brown blight*) e a mancha manteigosa (OROZCO et al., 2002). Apesar de ser considerado um patógeno secundário, devido as várias formas endofíticas e não patogênicas do mesmo, a gama de sintomas relacionados anteriormente associadas a provável variabilidade genética, justificam a relevância do mesmo na classificação das doenças do cafeeiro quanto a importância.

A antracnose do cafeeiro apresenta-se como manchas irregulares, grandes, de coloração castanha a castanho-acinzentada, ocorrendo comumente nas margens das folhas (OROZCO, 2003; PARADELA FILHO et al., 2001). Segundo Paradela Filho et al. (2001), as lesões mais críticas e prejudiciais para o cafeeiro são aquelas em que o fungo incide sobre gemas, flores e chumbinho, provocando sua morte e queda; e enegrecimento e morte de ramos. Os autores relatam, ainda, que os sintomas não estão relacionados com plantas injuriadas ou culturas mal manejadas; pelo contrário, eles são mais intensos e evidentes em culturas novas e muito bem desenvolvidas.

Mansk e Matiello (1977) descreveram como sintomas característicos da mancha manteigosa, manchas verde-claras de aspecto oleoso menos brilhante

que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm. Em estágios mais avançados essas manchas adquirem a coloração verde-pálida a amarela e bordos irregulares, as quais coalescem e ocasionam a queda prematura das folhas. Em ramos e frutos, as lesões apresentam-se menores, com diâmetros entre 2 a 3 mm, deprimidas, necróticas de cor marrom-clara e bordas irregulares. Ataques intensos geralmente são observados em folhas e ramos novos de plantas adultas, ocorrendo necrose e seca dos ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente (FERREIRA, 2006)

No Estado do Paraná, Silva et al. (2005) relataram a presença de *Colletotrichum* spp. em cafeeiros, e destacaram três morfotipos entre os isolados investigados, apontando para variabilidade cultural e morfológica. Julliaty et al. (2006) utilizando o método de RAPD relataram a diversidade entre 22 isolados de *C. gloeosporioides* com distância genética máxima de 23,6% sugerindo uma associação da análise molecular com resultados de patogenicidade de oito dos isolados, também indicando indícios da presença de espécies e/ou raças de *C. gloeosporioides* em cafeeiros no Estado de Minas Gerais.

Pereira (2005), estudando a variabilidade do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro por meio da técnica que utiliza mutantes nit, caracterizou grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) para isolados de *C. gloeosporioides*. Este autor relata que a variabilidade encontrada entre os isolados deve-se ao alto número de grupos de VCG, concluindo sobre a complexidade dos estudos envolvendo espécies de *Colletotrichum*, já que a alta variabilidade pode interferir nos resultados.

2.4 Fatores de patogenicidade em fungos

No reino Fungi, a capacidade de causar doenças em plantas parece ter se originado múltiplas vezes durante a evolução. Cada espécie tem evoluído de

maneira específica para invadir plantas e causar doença (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006).

Um aspecto importante é que, a evolução da patogenicidade pode estar relacionada à expansão de certas famílias de genes, provavelmente associadas a processos patogênicos tais como: degradação da parede celular vegetal; biossíntese de toxinas e metabólitos secundários; formação e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (SOANES et al., 2008).

Desde o contato inicial entre o patógeno e o seu hospedeiro, até a expressão de sintomas, existem diversos passos: 1) fixação do patógeno; 2) germinação e formação de estruturas sobre a superfície do hospedeiro; 3) penetração no hospedeiro; 4) e por fim a colonização do tecido (Schäfer, 1994). Em cada uma dessas etapas o patógeno regula a expressão de genes essenciais de patogenicidade ou virulência, que os possibilita a superação dos obstáculos apresentados pela planta.

Segundo Idnurm e Howlett (2001) genes de patogenicidade são aqueles necessários para o desenvolvimento da doença, mas não essenciais para completar o ciclo de vida do patógeno. Baseado nesta observação, Wassenaar e Gaastra (2001) propuseram uma definição para os chamados “fatores de virulência”, com base em sua função durante o processo infeccioso. Estes dividiram os fatores de virulência em três classes:

Classe I - são os verdadeiros fatores de virulência, estão associados à patogenicidade e não estão presentes em cepas não patogênicas, sendo alvos frequentes de desenvolvimento de resistência. Os fatores de virulência codificados pelos genes da classe I incluem as toxinas de baixa e de elevado peso molecular, enzimas que atacam a integridade estrutural do tecido hospedeiro, e algumas proteínas.

Classe II - codificam fatores que regulam a expressão de genes de virulência verdadeiros, por meio de modificações na tradução, processamento ou secreção das proteínas codificadas por genes da classe I.

Classe III - codificam fatores necessários ao patógeno para enfrentar efetivamente o ambiente hostil encontrado no hospedeiro, como por exemplo sensores osmóticos, degradadores ou transportadores xenobióticos, reguladores de pH, entre outros.

Tais fatores relacionados à patogenicidade irão depender exclusivamente da estratégia de invasão e colonização utilizada pelo patógeno. Dentre os fungos fitopatogênicos as toxinas, hormônios e enzimas estão amplamente distribuídos pela classe, e seus danos podem ser facilmente observados.

As toxinas são produtos fúngicos de baixo peso molecular e moléculas ativas em concentrações fisiológicas (BERESTETSKIY, 2008). Estas podem agir em diferentes sítios em nível celular, alterando a permeabilidade ou equilíbrio iônico, perda de eletrólitos, inibição ou estimulação de enzimas específicas, aumento na respiração e na biossíntese de etileno, podendo também atuar como antimetabólito, induzindo deficiências nutricionais nas plantas (PASCHOLATI, 2011).

As toxinas ainda podem ser classificadas como seletivas, a qual somente é produzida em espécies de plantas que irão servir como hospedeiro para o fungo. A toxina seletiva é denominada como fator primário de patogenicidade, visto que são essenciais para o estabelecimento do patógeno. Já as toxinas não seletivas, aquelas que mostram-se tóxicas a quaisquer planta independente desta ser ou não hospedeiras, são considerados determinantes secundários de patogenicidade (PASCHOLATI, 2011), devido a sua inespecificidade.

Como exemplos de toxinas produzidas por fungos tem-se: a toxina HC em milho (*Heminthosporium carborum* raça 1), a toxina AL em tomate (*Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*), o ácido fusárico (várias espécies de

Fusarium) e ácido fumárico (*Rhizopus spp.*), no qual os dois últimos possuem uma diversa gama de hospedeiros (STANGARLIN; LEITE, 2008).

Alguns fungos, como por exemplo, *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*), *Verticillium dahliae*, *Phytophthora infestans*, *Ustilago maydis*, *Taphrina deformans*, entre outros são capazes de sintetizar, uma vez já no hospedeiro, compostos que ocorrem naturalmente nas plantas, os hormônios ou substâncias de crescimento. Embora essas substâncias não se mostrem geralmente tóxicas ao hospedeiro, quando produzidas por si só, o desequilíbrio hormonal criado devido a síntese de um fitohormônio produzido por um fungo invasor, mostra-se como a verdadeira expressão da virulência, levando a alterações no crescimento e aceleração da senescência (PASCOLATI, 2011).

A maior parte dos fungos também pode produzir um grande número de enzimas capazes de degradar os polímeros estruturais das paredes e membranas celulares (FARIA et al., 2003). Deste modo as enzimas degradadoras estão provavelmente envolvidas na maioria das doenças de plantas conhecidas.

A degradação dos tecidos por estas enzimas esta relacionada a extensiva destruição dos tecidos vegetais por patógenos necrotróficos, bem como a alterações específicas e localizadas nas paredes celulares por patógenos biotróficos (PASCHOLATI, 2011), *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici*, *Rhizoctonia solani* e *Verticillium albo-atrum*, são exemplos de fungos produtores de enzimas relacionadas à patogênese.

2.5 Enzimas relacionadas a patogênese

Enzimas são proteínas de alto peso molecular, constituídas de longas cadeias de aminoácidos, responsáveis pela catalise das reações anabólicas e

catabólicas nas células dos seres vivos. Deste modo, para cada reação existe uma enzima específica catalisando o substrato envolvido.

Acredita-se que a capacidade de degradação de microorganismos seja consequência da evolução dos sistemas enzimáticos de células procariotas e eucariotas, que coexistiram com uma grande variedade de substâncias de origens diversas (VASCONCELOS et al., 2003). Esta diversidade de substratos, potenciais para o crescimento microbiano resulta no aparecimento de diversas enzimas capazes de transformar moléculas orgânicas em distintas estruturas. Esta resposta do metabolismo de certos microorganismos confere vantagens para as células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes de energia (ONOFRE et al., 2011).

Hancock e Millar (1996) afirmam que os fungos ao encontrar um substrato insolúvel, sintetizam e secretam enzimas apropriadas que produzirão metabólitos solúveis, os quais serão absorvidos enzimaticamente. A caracterização enzimática também pode possibilitar a diferenciação de isolados por meio da determinação da produção de enzimas (PATERSON; BRIDGE, 1994), uma vez que os fungos apresentam diferenças quanto à quantidade de enzimas produzidas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Durante a penetração e colonização, os fitopatógenos encontram e atravessam as paredes do hospedeiro. Fungos fitopatogênicos são capazes de secretar uma variedade de enzimas, as quais os tornam capazes de penetrar e infectar o tecido do hospedeiro, estas enzimas são chamadas de: “*Enzimas Degradadoras da Parede Celular* (EDPCs)”, estas irão atuar na degradação de ceras, cutícula e das paredes celulares, auxiliando a invasão tecidual e a disseminação do patógeno (KIKOT; HOURS; ALCONADA, 2009). A capacidade de um agente patogênico em produzir enzimas, irá determinar o grau de degradação da parede celular durante patogênese, podendo sua inibição afetar o desenvolvimento da doença (ANAND et al., 2008).

Dentre as enzimas degradadoras de parede, as pectinases ou enzimas pectolíticas, são as mais estudadas em relação à patogênese. De modo geral, o patógeno possui uma ou mais pectinases pré-formadas, que quando em contato com polímeros de ácido galacturônico na lamela média e parede primária, liberam monômeros ou oligômeros desses polímeros, os quais irão funcionar como sinais para a formação de novas pectinases. Como a pectina é o componente mais abundante da parede celular as pectinases são consideradas o mais importante grupo de enzimas degradadoras de paredes produzido por fungos (LEBEDA et al., 2001)

As pectinases podem ser classificadas em hidrolases, liases e esterases de acordo com o substrato e mecanismo de ação. Nas duas principais classes, hidrolases e liases, encontram-se enzimas específicas como as pectinaliases, poligalacturonases, polimetilgalacturonases, pectinamitilesterases e pectatliases (BENEN et al., 2000).

Nos últimos anos tem se constatado um grande número de evidências de que diferentes espécies de *Colletotrichum* utilizam enzimas pecticas como fatores de patogenicidade, demonstrados em espécies de *C. acutatum* (FERNANDO; JAYASINGHE; WIJESUNDERA, 2001), *C. gloeosporioides* f.sp. *malvae* (LI; GOODWIN, 2002) e *C. lindemuthianum* (HERBERT et al., 2004). Em estudos nos quais se trabalharam com a regulação de genes relacionados a produção destas enzimas, verificou-se que a patogenicidade dos isolados foi alterada, como em *Colletotrichum gloeosporioides* no qual a inativação do gene *pelB* reduzia a patogenicidade dos isolados em frutos de abacate (Yakoby, et al. 2001). Torres (2010) detectou a atividade de poligalacturonases (PG) em isolados de *C. acutatum* e observou que quanto maior os níveis desta enzima, maior eram as lesões causadas por este em plantas de tamarilho.

Outra enzima que atua na parede celular são as lacases que atuam na degradação da lignina, e geralmente estão associados a fungos causadores de podridões brancas (LI, 2003), mas não estão restritas a estes. As lacases estão envolvidas em diferentes processos biológicos como na esporulação, na produção de pigmentos durante o desenvolvimento do corpo de frutificação e na patogênese, entre outros (MARTINEZ et al., 2009; COLL et al., 1993). Anderson e Nicholson (1996) demonstraram pela primeira vez, a atividade de lacase na mucilagem extracelular de *C. graminicola*. Recentemente, Levin et al. (2007) selecionaram o *C. truncatum* como o melhor produtor de lacases entre 10 cepas de *Colletotrichum* estudadas.

Dentre os outros grupos de enzimas que podem ser produzidas por fitopatógenos, têm-se aquelas que atuam na membrana plasmática e no protoplasto das células, nos quais fazem parte da sua constituição amido, proteínas e lipídios.

Diferentes tipos de lipídios são encontrados nas células vegetais, óleos e gorduras principalmente em sementes, ceras, cutícula, fosfolipídios e glicolipídios estes nas membranas, os quais podem ser degradados através de enzimas lipolíticas, secretadas por fungos, liberando ácidos graxos que podem ser diretamente utilizados por estes fitopatógenos.

A maioria dos fitopatógenos possui a capacidade de produzir amilases, as quais atuam nas moléculas de amido, polissacarídeo que constituem a principal fonte de reserva nas células vegetais, degradando este polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas (PASCHOLATI, 2011).

Os fungos são, de maneira geral, capazes de produzir a maior variedade de proteases entre os microrganismos. Entre os microrganismos fitopatogênicos, muitos produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectolases e xilanases, exercem um

importante papel na patogênese (VALUEVA; MOSOLOV, 2004), resultando em profundas alterações na organização e função celular do hospedeiro.

Couto, Menezes e Coelho (2002), estudando as características de isolados de *C. musae*, verificaram que todos isolados produziram enzimas extracelulares com atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica em meio sólido, permitindo dessa forma comparar a variabilidade entre isolados. Assis et al. (2010) observaram que *Colletotrichum* spp. isolados de manga, produziram enzimas extracelulares com atividades amilolítica, lipolítica e proteolítica, mas não celulolítica, podendo deste modo, diferenciar os isolados com base na atividade amilolítica e proteolítica.

2.6 A variabilidade genética e os marcadores moleculares

O componente genético da biodiversidade é fundamental para estudos de diversidade, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (ALLCOCK et al., 1995). A atuação das forças evolutivas no processo de coevolução gera variabilidade tanto nas populações de plantas como de fungos. Por meio de mutações surgem novos alelos nas populações, os quais sofrem seleção e são rearranjados, graças à recombinação genética, havendo dispersão destes alelos quando ocorrem migrações de indivíduos de um local para outro (BARBIERI; CARVALHO, 2001).

Segundo Burdon e Silk (1997), a combinação de mecanismos como seleção, deriva genética, migração e mutação definem a estrutura genética e a diversidade de todas as populações patogênicas, sendo que o papel relativo de cada um destes fatores pode variar intensamente entre diferentes associações planta-patógeno, entre os estádios do ciclo epidemiológico.

Durante muito tempo, características morfológicas e fisiológicas foram às únicas ferramentas utilizadas para a definição das filogenias. Estas, associadas aos sinais e sintomas observados, por muito tempo foram os primeiros passos para constituir estudos de identificação e diagnóstico de fitopatógenos (BENALI et al., 2011). Segundo Cannon, Bridge e Monte (2000) conceito morfológico no gênero *Colletotrichum* é difícil de definir, e as espécies são delimitadas usando poucos caracteres, como tamanho e forma de conídios, tipos de apressórios, coloração de colônias, entre outros.

Com o desenvolvimento de técnicas de genotipagem, marcadores moleculares, os estudos de variação genética foram facilitados, no entanto, critérios morfológicos, culturais e fisiológicos não podem ser abandonados, uma vez que, estes dados são complementares e importantes para a melhor compreensão de uma população (ARRIEL et al., 2006).

Nas últimas décadas, as tecnologias relacionadas aos marcadores de DNA tem revolucionado o estudo entre a relação patógeno-hospedeiro, e tem sido extensivamente empregada no campo da fitopatologia, tornando a identificação dos fitopatógenos mais rápida e eficiente (BRIDGE et al., 2003).

As técnicas baseadas em genotipagem permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores cobrindo todo o genoma do organismo. Marcadores moleculares são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade e que podem ser associadas com o problema a ser estudado. Essa variabilidade permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes.

Os marcadores de DNA podem ser classificados em duas categorias de acordo com a metodologia a ser aplicada: do tipo I, cujos marcadores estão associados a genes ou sequências de DNA conhecidas, as quais serão visualizadas por hibridização. O RFLPs são os exemplo de marcadores do tipo I mais conhecidos. Já os marcadores do tipo II geralmente estão associados a uma

sequência desconhecida. Como exemplo tem-se os RAPDs, AFLPs, microsattelites (SSRs), ITSs e SNPs (BENALI et al., 2011).

Nos últimos anos diferentes técnicas foram utilizadas para caracterizar diferentes espécies de *Colletotrichum*: análises moleculares incluindo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA ribossomal (rDNA) e mitocondrial (mDNA), seqüenciamento de regiões conservadas como as denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Internal Spacer Region*) do rDNA, AFLP (*Amplified fragment Length Polymorphism*) e microssatélites (MARQUES-MARÇAL et al., 2010). Estas informações têm possibilitado acessar a diversidade existente entre populações, além de distinguir espécies muito próximas como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, caracterizar a especificidade por hospedeiro, caracterizar isolados patogênicos de não patogênicos, caracterizar a produção de metabólitos e em alguns casos possibilitam a construção direta de primers específicos para estas características (MARQUES, 2009).

Dentre as inúmeras técnicas existentes, a técnica de AFLP tem ganhado popularidade na análise da diversidade genética em inúmeros fitopatógenos, devido ao elevado polimorfismo gerado, ou seja, ao grande número de loci que podem ser considerados simultaneamente.

Esta técnica desenvolvida por Vos et al. (1995) está baseada na amplificação do DNA via PCR, para detectar diferenças em um conjunto de fragmentos selecionados e digeridos com enzimas de restrição, na qual após a digestão do DNA pelas enzimas de restrição, os fragmentos gerados são ligados a adaptadores com sequencias conhecidas nas duas extremidades de cada fragmento, estes fragmentos então, são submetidos a uma amplificação seletiva, utilizando primers com sequência complementar à sequência dos adaptadores,

seguida da sequência específica do sítio de restrição da enzima e uma extensão de nucleotídeos seletivos na extremidade 3' (CAIXETA et al., 2009).

Ao longo dos anos, a técnica de AFLP tem se destacado por conseguir revelar diferenças entre espécies próximas, e na detecção de raças ou cepas de fitopatógenos.

2.7 As proteínas fluorescentes e o estudo da colonização por fitopatógenos

As proteínas fluorescentes são ferramentas importantes que têm revolucionado a biologia celular na última década, principalmente no estudo de células vivas (FREITAG et al., 2004). Os genes que codificam essas proteínas são excelentes marcadores moleculares, pois a visualização dos seus produtos não requer substratos ou cofatores e podem ser empregadas em qualquer organismo que possa ser geneticamente modificado (CZYMMEK; BOURETT; HOWARD, 2005). Atualmente, na literatura, são descritos vários plasmídeos contendo genes que codificam diferentes proteínas fluorescentes, que fluorescem em diferentes comprimentos de onda, podendo ser observadas em diferentes colorações, como: verde-*gfp*, azul-*cfp*, amarelo-*yfp* e vermelho-*rfp*.

A green fluorescent protein ou GFP é uma proteína com 238 aminoácidos, que é intrinsecamente fluorescente e emite uma luz verde quando exposta à irradiação com ultravioleta (CHALFIE et al., 1994). Este gene é originário do cnidário *Aequorea victoria* e tem sido utilizado como repórter em vários sistemas heterólogos, tornando-se uma ferramenta muito utilizada em biologia molecular.

A principal característica da GFP é a fluorescência proporcionada por sua estrutura terciária, chamada de *beta-can*, a qual possui, em seu interior, a região cromofórica responsável pela fluorescência. Tal propriedade permite que essa proteína, de detecção não invasiva, seja utilizada como um eficiente gene

marcador *in vivo*. Desse modo, o gene *gfp* pode ser facilmente clonado em diferentes vetores (plasmídios, cosmídios e bacteriófagos) e expresso nos mais variados tipos celulares, como procariotos, eucariotos inferiores e superiores (TSIEN, 1998).

A GFP não interfere nas atividades celulares. Seu ensaio é simples e sua atividade pode ser detectada por vários métodos, inclusive usando microscopia de fluorescência, microscopia confocal ou medindo intensidade de fluorescência em células individualmente (WELSH & KAY, 1997).

Sua expressão pode ser visualizada em observações *in vivo* de células individuais, populações de células ou em organismos interagindo com simbiontes ou com o ambiente em tempo real. Possui baixa toxicidade, é extremamente estável, além de manter a atividade, quando associada a muitas proteínas celulares e extracelulares (LAGOPODI et al., 2002).

Outro importante fato relacionado a utilização de patógenos marcados com GFP, e que esta permite diferenciar o fungo inoculado de outros possíveis fungos parasitas presentes na planta, visto que sua visualização é feita por microscopia de fluorescência em um comprimento de onda determinado, de forma que apenas os isolados marcados possam ser observados.

O gene *gfp* tem sido amplamente utilizado no estudo da interação entre a planta hospedeira e fungos, fitopatogênicos ou não, visando estudar a sua penetração, colonização e disseminação, como: *Fusarium virguliforme* em soja (MANSOURI et al., 2009), *Phomopsis viticola* em videira (ANCO et al., 2009), *Rosellinia necatrix* em abacate (PLIEGO et al., 2009), fungos ectomicorrízicos (*Pisolithus tinctorius*) e endomicorrízicos (*Oidiodendron maius*) em angiospermas (RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005; MARTINO et al., 2007) e em isolados de *Colletotrichum acutatum*, os quais permaneceram infectivos após a inserção do gene, e puderam ser detectados nos tecidos infectados, observando-se o rápido desenvolvimento do fungo preenchendo o mesofilo com

denso micélio que invadiu as células, causando necrose (HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002).

3 HIPÓTESE

Acredita-se que existam diferentes níveis de agressividade entre os isolados de *Colletotrichum* spp. que colonizam o cafeeiro, os quais possam estar relacionados: a maior ou menor atividade fisiológica, ao aparato enzimático relacionado a patogênese e a regulação de genes específicos, a variabilidade genética, bem como a diferentes sintomas observados nas plantas relacionados a germoplasmas particulares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia e Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Coleta e preservação dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Foram coletados folhas, ramos e frutos de plantas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa, antracnose e seca de ponteiros, em diversas cidades do estado de Minas Gerais. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e então levadas ao Laboratório de Diagnóstico de Enfermidades em Plantas, do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Foram feitas secções do tecido infectado, em locais de lesões jovens, superficialmente desinfetadas com álcool 50% (1 minuto) e hipoclorito de sódio 1% (1 minuto) e lavadas em água destilada por duas vezes; em seguida, transferidas para placa de Petri contendo meio de cultura MEA (Extrato de malte - Ágar) e incubadas por sete dias em câmara de crescimento à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após a constatação de crescimento fúngico, foram retirados fragmentos de meio com micélio e levados ao microscópio de luz para a identificação do patógeno pela descrição de Sutton (1992).

Após a identificação, fragmentos das colônias foram transferidas para novas placas, para purificação dos isolados, obtenção de culturas monospóricas e preservação do inóculo em microtubos sob refrigeração.

Tabela 1 Identificação dos isolados de *Colletotrichum spp.* em Minas Gerais

| Isolado | Órgão Planta | Sintoma | Origem |
|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| I-1 | Folha | Mancha Manteigosa | Lavras |
| I-2 | Folha | Mancha Manteigosa | Piumbi |
| I-3 | Haste | Seca Ponteiro | Santo Antonio do Amparo |
| I-4 | Fruto | Antracnose | Santo Antonio do Amparo |
| I-5 | Haste | Seca Ponteiro | Ouro Fino |
| I-6 | Haste | Seca Ponteiro | Lavras |
| I-7 | Haste | Seca Ponteiro | Boa Esperança |
| I-9 | Folha | Mancha Manteigosa | Poço Fundo |
| I-10 | Fruto | Antracnose | Poço Fundo |
| I-11 | Fruto | Mancha Manteigosa | Poço Fundo |
| I-12 | Folha | Mancha Manteigosa | Turvolândia |
| I-13 | Haste | Seca Ponteiro | Patrocínio |
| I-14 | Fruto | Mancha Manteigosa | Araguari |
| I-15 | Fruto | Antracnose | Araguari |
| I-16 | Fruto | Antracnose | Araguari |
| I-17 | Fruto | Antracnose | Teixeira |
| I-18 | Haste | Seca Ponteiro | Capelinha |
| I-19 | Haste | Seca Ponteiro | Cristais |
| I-20 | Haste | Seca Ponteiro | Campo Belo |
| I-21 | Fruto | Antracnose | Paracatu |
| I-22 | Haste | Seca Ponteiro | Paracatu |
| I-23 | Haste | Seca Ponteiro | Paracatu |
| I-24 | Haste | Seca Ponteiro | Lavras |
| I-25 | Haste | Mancha Manteigosa | Lavras |
| I-26 | Fruto | Mancha Manteigosa | Paraguaçu |
| I-27 | Haste | Mancha Manteigosa | Paraguaçu |
| I-28 | Haste | Mancha Manteigosa | Paraguaçu |
| I-29 | Folha | Mancha Manteigosa | Paraguaçu |
| I-30 | Haste | Seca Ponteiro | Ribeirão Vermelho |
| I-31 | Folha | Mancha Manteigosa | Ribeirão Vermelho |
| I-32 | Fruto | Mancha Manteigosa | Ribeirão Vermelho |
| I-33 | Haste | Mancha Manteigosa | Ribeirão Vermelho |
| I-34 | Haste | Seca Ponteiro | Lavras |

Obtenção de culturas monospóricas

Para obtenção das culturas monospóricas dos diferentes isolados, os esporos foram suspensos em 5 mL de água esterilizada e, diluídos por 5 vezes. Em seguida, alíquotas de 10 μ L da suspensão foram colocadas em placas de Petri com meio ágar-água e incubadas a 25°C. Após 6 horas os conídios que apresentavam tubos germinativos foram marcados e cortados pequenos blocos de meio, e transferidos para meio MEA para crescimento das culturas e preservação.

Produção de hipocótilos e mudas

As sementes foram obtidas a partir de frutos da cultivar Catuaí Vermelho com sintomas de mancha manteigosa e sem sintomas de mancha manteigosa. Os frutos foram despulpados, e as sementes lavadas em água corrente. Após foram imersas em álcool 70% por 3 minutos e transferidas para recipiente contendo hipoclorito de sódio 2,5%, onde permaneceram em agitação por 5 minutos e em seguida lavadas por duas vezes em água destilada-esterelizada e então secas em capela de fluxo a 25°C.

Para a produção dos hipocótilos e mudas, as sementes foram acondicionadas em bandejas com areia como substrato, e incubadas em câmara de crescimento a 30°C sob fotoperíodo de 12 horas, até a emissão da radícula, quando então estas foram transferidas para bandejas de polipropileno com 48 células de 11x5x5cm, contendo substrato esterilizado e mantido em casa de vegetação até a emergência dos hipocótilos, sob temperatura ambiente.

4.1 Caracterização morfo-fisiológica, molecular e patogênica dos Isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro

a) Coloração das colônias, dimensões dos conídios e formação de acérvulos

A coloração das colônias foi avaliada por meio da expressão da tonalidade observada durante dez dias, assim como a formação de acérvulo nos seguintes meios de cultura: MEA (20g extrato de malte; 20g ágar; 1000 mL água destilada); BDA (250g batata; dextrose; 20g ágar; 1000 mL água destilada); GYA (10g glicose; 5g extrato de levedura; 20g ágar; 1000 mL água destilada); OA (30g Aveia; 20g ágar; 1000 mL água destilada), e incubados a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, no qual os fatores avaliados foram: isolados e meio de cultivo, com três repetições.

O formato e a dimensão dos conídios para cada conídio foi obtida pela medição do comprimento e largura de 50 conídios escolhidos ao acaso. Os conídios foram obtidos de colônias de dez dias. As medições foram realizadas em microscópio Zeiss acoplado a uma câmera, e mensurado por meio do programa AxionVision 4.8.

b) Crescimento micelial em diferentes meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: MEA, BDA, GYA e OA. Das culturas puras dos diferentes isolados, com sete dias de idade, foram removidos discos de micélio com 6 mm de diâmetro e depositados no centro de cada placa de Petri contendo os diferentes meios. Em seguida, estas foram incubadas à 25°C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

O crescimento micelial foi avaliado por meio do Índice de velocidade de crescimento médio (IVCM), segundo descrito por Oliveira (1991) das colônias, conforme equação 1.

$$IVCM = \frac{\sum(D - Da)}{N} \quad (1)$$

No qual:

D= Diâmetro atual

Da= Diâmetro anterior

N= Número de dias após inoculação

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, no qual os fatores avaliados foram: isolados e meio de cultivo, com três repetições.

c) Esporulação de isolados de Colletotrichum em diferentes meios de cultura

Os discos de micélio com sete dias de idade foram depositados no centro de placas de Petri, contendo os diferentes meios. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C nas condições de escuro contínuo, claro contínuo, e luz alternada (12 horas de claro e 12 horas de escuro). Aos oito dias de incubação avaliou-se a produção de conídios. Para o preparo da suspensão de esporos, foi adicionado 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, para facilitar a remoção do micélio, então este foi filtrado em gaze estéril, e a concentração ajustada para 10^6 em câmara de Neubauer, com microscópio óptico, obtendo-se uma média de cinco leituras para cada repetição dos tratamentos.

O delineamento experimental utilizado, foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, no qual os fatores avaliados foram: isolados e meio de cultivo, com três repetições.

d) *Crescimento e esporulação de Colletotrichum em diferentes níveis de pH*

O meios de culturas utilizados para os ensaios foram aqueles que promoveram o melhor ÍVCM e produção de esporos das culturas. A partir deste, foram testados três níveis de pH: 4,5, 5,5, 6,5 e 7,0. Nestas placas, foram depositados discos de micélio das culturas, e então, estas foram incubadas à 25°C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. O crescimento micelial foi avaliado por meio do Índice de velocidade de crescimento médio (ÍVCM) das colônias, por dez dias, conforme descrito no item 3.1.b., assim como a esporulação.

O delineamento experimental utilizado, foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, no qual os fatores avaliados foram: isolados e pH, com três repetições.

e) *Extração do DNA*

A extração do DNA foi realizada a partir de colônias com dez dias de crescimento, conforme protocolo fornecido pelo kit de extração Promega® - Wizard Genomic DNA Purification Kit (#A1120). Após a extração foi feita a quantificação deste DNA e então as amostras foram diluídas para a concentração de 10ng.µL⁻¹.

f) *Identificação molecular*

Para a identificação molecular pela técnica de PCR, primeiramente utilizou-se oligonucleotídeos específicos para o gênero *Colletotrichum*, para confirmar se todos os isolados pertenciam a esse gênero. Em seguida, foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*.

A identificação do gênero *Colletotrichum* foi realizada utilizando-se os pares de oligonucleotídeos Cc1F1 (5'-ACCTAACTGTTGCTTCGGCG-3') e Cc2R1 (5'-AAATTTGGGGGTTTTACGGC-3') conforme Cullen et al. (2002). A reação foi realizada segundo protocolo fornecido pelo kit Gotaq Green Master Mix - Promega® (#M7122). O programa utilizado junto ao termociclador foi de um ciclo de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 65 °C e 2 minutos a 72 °C, seguido de um ciclo de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 63°C e 2 minutos a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 61 °C e 2 minutos a 72 °C.

Para a detecção de *C. gloeosporioides* foi utilizado o oligonucleotídeo CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3'') em conjunto com ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') descritos por Mills, Sreenivasaprasad e Brown (1993). A reação foi realizada segundo protocolo fornecido pelo kit Gotaq Green Master Mix - Promega® (#M7122). O programa utilizado foi: um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

A identificação de *C. acutatum* foi realizada com os oligonucleotídeos CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC--3') conforme descrito por Sreenivasaprasad et al. (1996). A reação foi realizada segundo protocolo fornecido pelo kit Gotaq Green Master Mix - Promega® (#M7122). O programa utilizado foi: um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Após a amplificação, 10 µL dos produtos das reações de PCRs foram aplicados em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi realizada em

corrente constante de 80 volts por 1 h. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta e fotografadas. Como controle para as reações foi utilizado um isolado *Cercospora spp.* e a água estéril.

g) *Teste de patogenicidade em frutos verdes*

Após a coleta, os frutos verdes café da cultivar Catuaí vermelho, oriundos de plantas com mancha manteigosa (plantas sintomáticas) e sem mancha manteigosa (plantas assintomáticas), foram lavados em água corrente com sabão neutro por três vezes e enxaguados em água destilada. Após estes foram imersos em álcool 70% por 5 minutos, transferidos para recipiente contendo hipoclorito de sódio 2,5%, onde permaneceram em agitação por 5 minutos, e em seguida lavados por duas vezes em água destilada-esterelizada e então secos em capela de fluxo a 25°C.

Os frutos secos foram acondicionados em caixas gerbox, com areia estéril para sustentação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, no qual os fatores avaliados foram: isolados e frutos (sintomáticos e assintomáticos). O ensaio foi composto de três repetições, o qual uma caixa gerbox foi considerada uma repetição com e 20 frutos por repetição.

Para inoculação, os frutos foram perfurados com agulha esterilizada e inoculados com 10µl de suspensão de 10^6 conídios.mL⁻¹. Como controle, utilizou-se água destilada autoclavada. As placas foram mantidas em câmara climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os frutos foram avaliados durante 15 dias, sendo as avaliações feitas a cada cinco dias. Os frutos foram caracterizados de acordo com a ausência ou presença de sintomas. Ausência de sintomas: frutos sem lesão necrótica no ponto de inoculação; Presença de sintomas: frutos com lesões iniciais secas e necróticas, com aspecto circular e o centro deprimido.

h) Teste de patogenicidade e agressividade em hipocótilos

Para o teste de patogenicidade e agressividade dos isolados de *Colletotrichum spp*, foram utilizados hipocótilos, na fase palito de fósforo, de café da cultivar Catuaí vermelho, oriundos de plantas com mancha manteigosa (plantas sintomáticas) e sem mancha manteigosa (plantas assintomáticas).

As suspensões de conídios foram preparadas pela raspagem de conídios de colônias de 7 dias, com auxílio de uma alça de Drigalsky e água destilada esterilizada, seguida pela filtragem em gaze esterilizada. A inoculação foi efetuada por meio da aspersão de suspensões na concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹. Como testemunha utilizou-se hipocótilos inoculados com água destilada esterilizada. Os hipocótilos acondicionados em bandejas com substrato permaneceram em câmara úmida por 48 horas. Após o período, estas foram retiradas, e os hipocótilos transferidos para câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas a 25°C por 20 dias.

Os sintomas foram avaliados conforme escala descrita por Varzea (1995) (Tabela 1), a cada cinco dias após a inoculação, e a interpretação dos resultados efetuada conforme sugerido por Orozco (2003), pó meio do cálculo do Índice de Intensidade da Doença, demonstrado pela equação 2.

$$IID = \frac{\sum(np * vn)}{npc * 4}$$

(2)

np: número de plantas em cada classe

vn: valor numérico equivalente a cada classe

npc: número total de plantas

Tabela 2 Grau de sintoma observado em plântulas

| Classe | Sintoma / Severidade |
|--------|--|
| 1 | Ausência de reação visível |
| 2 | Lesões superficiais castanhas |
| 3 | Lesões profundas e escuras |
| 4 | Lesões escuras com início de estrangulamento |
| 5 | Estrangulamento pronunciado |
| 6 | Plântula morta |

Fonte: Varzea (1995)

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, no qual os fatores avaliados foram: isolados e hipocótilos (sintomáticos e assintomáticos), com 10 repetições.

4.2 Colonização de *Colletotrichum spp.* transformado com *gfp* em plântulas de cafeeiro

Após análise comparativa em relação à patogenicidade, um isolado obtido a partir de sintomas de mancha manteigosa foi utilizado para o ensaio a seguir.

a) Inserção do gene *gfp*

O plasmídeo utilizado no processo de transformação foi pCT74 (pSC001), contendo o fragmento *sgfp*, com o gene promotor PtOx (*Aspergillus nidulans*) e o gene de resistência (HPR) ao antibiótico higromicina-B.

Como procedimento padrão utilizou-se o método de transformação química mediada por polietilenoglicol (PEG), no qual primeiramente deve-se obter os protoplastos do fungo (ARMESTO et al. 2011). Após a obtenção, os protoplastos foram ressuspensos em tampão de armazenamento, contendo

quatro partes de STC (0,8 M sorbitol, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂) e uma parte de SPTC (0,8 M sorbitol, 40% PEG 4000, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂). Após a adição de 10µl de DNA plasmidial (pSC001) na concentração de 0,35-1,66 µg.µL⁻¹, essa suspensão foi incubada em gelo, por 30 minutos. Como controle foi utilizado água destilada autoclavada em lugar de DNA. Em seguida adicionou-se à suspensão 1mL de SPTC, incubando-se, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Depois foi vertido em 100 mL de meio de regeneração (0,1% extrato de levedura, 0,1% caseína hidrolisada, 34,2% sacarose, 1% ágar granulado), previamente autoclavado, e adicionado de 100µg.mL⁻¹ de higromicina-B.

Após três dias de crescimento as placas contendo os transformantes foram observados em microscópio estereoscópico (Leica DFC 310FX). As colônias que apresentavam fluorescência foram transferidas para novas placas contendo meio MEA (ágar-extrato de malte) acrescidos de 100µg.mL⁻¹ de higromicina-B, e incubadas a 25°C no escuro.

b) Inoculação e observação de Colletotrichum transformado com gfp

Foram inoculados por aspersão 10 plântulas de café do cultivar Catuaí Vermelho, com dois pares de folhas, por tratamento, com suspensões de conídios na concentração de 10⁶ conídios.mL⁻¹. Os tratamentos consistiram em: a) inoculação com isolado mutante; b) inoculação com o isolado selvagem patogênico; c) inoculação com isolado não patogênico; d) inoculação com água destilada estéril (ADE). As plântulas permaneceram em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas a 25°C, por 15 dias. Os sintomas foram avaliados conforme o descrito no item 3.1.h.

Após a manifestação dos sintomas, coletou-se o material, retirando finas secções do tecido infectado para a elaboração de lâminas, as quais foram levadas

para observação em microscopia de epifluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) com filtro 470 a 490 nm e pico de transmissão em 510 a 560 nm.

4.3 Atividade enzimática dos isolados de *Colletotrichum spp.* associados ao cafeeiro

A determinação das atividades das enzimas hidrolíticas extracelulares em meios de cultura específicos, foram preparados de acordo com Hankin e Anagnostakis (1975) e Paterson e Bridge (1994).

a) Atividade amilolítica in vitro

Os isolados foram cultivados em meio mínimo, (6g de NaNO₃; 1,5g de KH₂PO₄; 0,5g de KCl; 0,5g de MgSO₄.7H₂O; 0,01g de FeSO₄; 0,01 g de ZnSO₄ ; 10g de amido; 15g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH 6,8), os quais permaneceram a 25° C sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Decorridos o período de cultivo dos isolados no meio, a revelação do halo de degradação do amido ocorreu por meio da adição de 2 mL de solução lugol (5g de KI; 1g de iodo; 100 mL de água destilada) sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, o excesso da solução lugol foi descartada e a atividade amilolítica detectada pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada.

A avaliação dos resultados foi realizada por meio da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia e da colônia mais o halo decorrente da atividade enzimática, obtendo-se as respectivas áreas. A área do halo de degradação oriundo da atividade da enzima foi obtida subtraindo a área da colônia.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, no qual os fatores avaliados foram: isolados e enzimas, com três repetições. O experimento foi efetuado em duplicata.

b) Atividade lipolítica in vitro

Para a avaliação da atividade lipolítica, os isolados foram cultivados em meio de cultura acrescido de Tween-20 como substrato (10 ml de Tween-20, 10g de peptona, 5g de NaCl, 0,01 g de CaCl₂, 20g de ágar, 1000 mL de água destilada; pH 6,0), os quais permaneceram a 25° C sob fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Após a incubação, as placas foram resfriadas a 4°C por 48 horas. A atividade das enzimas lipolíticas das colônias foi observada por meio da formação um precipitado, visível devido a formação de cristais de sais de cálcio, como um halo claro deste precipitado ao redor das colônias. A avaliação da área de degradação de lipídio e o delineamento experimento foi realizado conforme o item 3.3.a.

c) Atividade proteolítica in vitro

Para detectar a atividade proteolítica, os isolados foram cultivados em meio nutriente ágar, contendo gelatina como substrato (5g de peptona; 3g de extrato de carne; 15g de ágar; 40g de gelatina; 1000 mL de água destilada; pH 6,0), os quais permaneceram 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Decorridos o período de cultivo dos isolados no meio, a revelação do halo de degradação ocorreu por meio da adição de 2 mL de solução saturada de sulfato de amônio (77g de (NH₄)₂SO₄; 100 mL de água destilada). A avaliação da área de degradação da proteína foi realizada como no item 3.3.a.

d) Atividade de lacases in vitro

Para detectar a atividade de lacases, os isolados foram cultivados em meio MEA acrescido de ácido gálico (20g de ágar; 1g de ácido gálico; 15g de extrato de malte; 1g de peptona; 1000 mL de água destilada; pH 7,0), os quais permaneceram 25 °C sob escuro contínuo, durante cinco dias. A atividade das lacases foi detectada por meio da formação de um halo marrom ao redor das colônias. A avaliação da área de degradação da proteína foi realizada como no item 3.3.a.

e) Atividade celulolítica in vitro

Os isolados foram cultivados em ágar carboximetilcelulose (1g de KH_2PO_4 ; 0,5g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5g de asparagina; 0,5g de KCl; 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g de CaCl_2 ; 0,5g de extrato de leveduras; 10g de carboximetilcelulose; 20g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH=7,0), os quais permaneceram a 25°C sob escuro contínuo por cinco dias, e logo em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50°C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante vermelho congo (2,5 g; 1000 mL) tampão Tris HCl 0,1M; pH 8,0). Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas lavadas com 5 mL de solução de NaCl (0,5 M). A atividade das celulases foi detectada através da revelação do halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia. A avaliação da área de degradação da proteína foi realizada como no item 3.3.a.

f) Atividade pectinolítica in vitro

A atividade pectinolítica foi avaliada em meio mineral tamponado - MMT (2g de KH_2PO_4 ; 7g de K_2HPO_4 ; 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3g de pectina; 1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6g de extrato de levedura; 13g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH 7,2), nos quais os isolados foram cultivados a 25°C sob

fotoperíodo de 12 horas, durante quatro dias. Em seguida, para cada isolado cultivado em MMT, foi transferido um disco, para nova placa de Petri com meio MacIlvaine (7,74g de ácido cítrico; 17,93g de Na_2HPO_4 ; 2,5g de pectina cítrica; 13g de ágar; 1000 mL de água destilada; pH 6,0), mantidos a 40°C por 48 horas. Decorrido o período de incubação, para a revelação do halo de difusão das pectinases foi adicionado 2 mL de solução lugol (5g de KI; 1g de iodo; 100 mL de água destilada) sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos o excesso da solução foi descartado. As zonas de substrato degradado foram visualizadas, por meio de um halo claro ao redor da colônia desenvolvido no meio de cultura. A avaliação da área de degradação da proteína foi realizada como no item 3.3.a.

g) *Ensaio para determinação da atividade de enzimas degradadoras da parede celular (EDPC) - Pectinases*

Os ensaios para a determinação das polissacaridases foram determinados pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959).

i. *Obtenção do sobrenadante das culturas*

Os isolados foram cultivados durante sete dias a 30°C, em meio mineral tamponado - MMT (6,98g K_2HPO_4 ; 5,44g KH_2PO_4 ; 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,1g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3g pectina; 0,6g extrato de levedura; 1000 mL água destilada; pH 6,3), e meio mineral não tamponado - MMNT (2g K_2HPO_4 ; 0,64g KH_2PO_4 ; 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,1g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3g pectina; 0,6g extrato de levedura; 1000 mL água destilada; pH 6,8). Após decorrido o período de incubação, as culturas foram centrifugadas e conservadas a - 4°C. Para cada isolado foram realizados três repetições.

ii. *Atividade Poligalacturonase (PG)*

Como substrato para a reação foi utilizado uma solução de 300 μL de ácido poligalacturônico (30mM) a 100 μL das culturas crescidas em MMNT, o qual foi incubado por 20 minutos a 40°C. Após, foi retirada uma alíquota de 25 μL da reação e adicionado 75 μL de água destilada e 100 μL da solução de DNS (10g DNS; 300 mL NaOH 2N; 300g de tartarato duplo de Na/K; 1000 mL água destilada; acrescido de 1,4 mL solução de metabissulfito de sódio 35% e 4 mL solução de Fenol 50%). As culturas foram fervidas por 4 minutos e então o volume foi completo para 1 mL. Como controle foi utilizado o meio de cultura puro. A atividade da PG foi detectada pela leitura da absorbância a 540 nm. Cada amostra foi realizada em três replicatas.

A curva padrão para PG consistiu na substituição das amostras das culturas por ácido poligalacturônico, seguindo-se o mesmo procedimento.

iii. Atividade da Polimetilgalacturonase (PMG)

Como substrato para a reação foi utilizada uma solução de 40 μL de pectina cítrica a 20 μL das culturas crescidas em MMNT, o qual foi incubado por três horas a temperatura ambiente. Após, foi adicionada a solução 60 μL da solução de DNS puro (10g DNS; 300 mL NaOH 2N; 300g de tartarato duplo de Na/K; 1000 mL água destilada), então as amostras foram fervidas durante 10 minutos. Após decorrido o tempo foi adicionada a solução 140 μL de água destilada e homogeneizada. Como controle foi utilizado o meio de cultura puro. A atividade da PMG foi detectada pela leitura da absorbância a 575 nm. Cada amostra foi realizada em três replicatas.

A curva padrão para PMG consistiu na substituição das amostras das culturas por maltose, seguindo-se o mesmo procedimento.

iv. Atividade da Pectinase (PNL)

Como substrato para a reação foi utilizado uma solução de 200 μL de pectina cítrica 2,5% a 300 μL das culturas crescidas em MMT, estas foram agitadas em vortex e então incubadas por 30 minutos a 40°C. Após, foi retirada

uma alíquota de 100 µL da reação e adicionado 900 µL de HCl (0,01M), homogeneizando as amostras. Como controle foi utilizado o meio de cultura puro. A atividade da PL foi detectada pela leitura da absorbância a 235 nm. Cada amostra foi realizada em três replicatas.

4.4 Variabilidade genética dos isolados de *Colletotrichum spp.* associados ao cafeeiro por Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

A análise por AFLP foi realizada conforme metodologia descrita por Vos et al. (1995), utilizando o kit de reagentes fornecido pela Invitrogen – AFLP Core Reagent Kit (#10482-016), seguindo o protocolo descrito pelo Fabricante. A extração do DNA fungico foi efetuada conforme descrito no item 3.1.d.

Os primers utilizados na reação foram fornecidos pela Invitrogen na concentração 10ng. As combinações de primers, utilizados no *EcoRI* GACTGCGTACCAATTC + x (onde x = AG, AT, AC), e *MseI* GATGAGTCCTGAGTAA + y (onde y = AT, AA, AC), foram utilizadas na geração dos padrões das bandas. Os fragmentos gerados foram ligados com adaptadores de AFLP em um único passo, por 2 horas a 20°C, e então diluídos em tampão TE. As amostras foram pré-amplificadas utilizando o seguinte ciclo de PCR: 20 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 60 segundos, e 72°C por 60 segundos; seguido por 72°C por 60 segundos e então estes foram mantidos a 4°C. As reações pré-amplificadas foram diluídas em tampão TE (1:50) antes da amplificação final específica de AFLP.

Para reação final foram utilizados 15µL da reação de pré-amplificação diluída. O programa da PCR para amplificação de AFLP será: 10 ciclo a 94° por 60 segundos, 65° por 60 segundos; 72°C por 90 segundos, no qual a temperatura de anelamento será reduzida a cada ciclo em 1°C, de 65°C até 56°C;

seguido de 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, e 72°C por 60 segundos; seguido por um passo final, e então mantido a 4°C. Posteriormente, os fragmentos de AFLP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%, com tampão TBE 1x (100 mM de Tris base, 100 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA pH 8,0) no gel e tampão de corrida, conforme Lima (2006).

Os fragmentos foram analisados visualmente, sendo gerada uma matriz binária, em que 1 corresponde a presença de banda e 0 a ausência de banda. O método de agrupamento utilizado foi Neighbor Joining, com o auxílio do programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

4.5 Sistematização e análise dos resultados

Os dados foram inicialmente avaliados pela análise de variância e teste F, com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000). A comparação entre as médias, quando o valor de F foi significativo, foi feita pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5%. A construção de gráficos e a estimativa da correlação de Pearson (patogenicidade/agressividade e a atividade enzimática) foram realizadas por meio da versão demonstrativa do aplicativo Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fisiomorfológica, molecular e patogênica dos isolados de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro

Trinta e três isolados foram obtidos a partir de lesões típicas de mancha manteigosa, seca de ponteiros e antracnose em cafeeiros, originários de diversas cidades do sul do estado de Minas Gerais.

Destes isolados verificou-se que todos mostraram crescimento homogêneo a 25°C, no qual a coloração micelial predominante das colônias foi o branco-cinza, com exceção do isolado I-14 o qual exibiu a coloração salmão, quando cultivados em MEA, BDA e GYA (Tabela 3). Quando crescidos em meio OA, todos os isolados apresentaram crescimento raso e na cor branca. Apenas os isolados I-5, I-14 e I-25 apresentaram crescimento micelial superficial, quando cultivados em MEA, BDA e GYA, sendo os demais isolados classificados como crescimento cotonoso. Ainda em relação aos isolados I-5 e I-25 não foram observadas durante os dez dias de avaliação a formação de acérvulos, distinguindo-se dos demais isolados avaliados.

Tabela 3 Médias apresentada pelos isolados de *Colletotrichum* spp. referente as características culturais e morfológicas

| Isolado | Coloração | Dimensões dos conídios (µm) | | Presença de Acérvulo | Formato |
|---------|--------------|-----------------------------|--------|----------------------|------------|
| I-1 | Cinza | 12,92 | x 4,77 | + | Cilíndrico |
| I-2 | Branco Cinza | 12,60 | x 4,80 | + | Cilíndrico |
| I-3 | Branco Cinza | 13,65 | x 4,80 | + | Cilíndrico |
| I-4 | Branco Cinza | 11,19 | x 4,80 | + | Cilíndrico |
| I-5 | Branco | 12,63 | x 4,58 | - | Cilíndrico |
| I-6 | Branco Cinza | 12,93 | x 5,05 | + | Cilíndrico |

| | | | | | | |
|------|--------------|-------|---|------|---|------------|
| I-7 | Cinza | 12,81 | x | 5,00 | + | Cilíndrico |
| I-9 | Branco Cinza | 7,42 | x | 3,10 | + | Cilíndrico |
| I-10 | Branco Cinza | 15,73 | x | 5,00 | + | Cilíndrico |
| I-11 | Branco Cinza | 17,13 | x | 5,01 | + | Cilíndrico |
| I-12 | Branco | 16,32 | x | 4,46 | + | Cilíndrico |
| I-13 | Cinza | 10,82 | x | 4,00 | + | Cilíndrico |
| I-14 | Salmão | 3,03 | x | 1,17 | + | Cilíndrico |
| I-15 | Branco | 13,57 | x | 5,00 | + | Cilíndrico |
| I-16 | Branco | 11,55 | x | 4,82 | + | Cilíndrico |
| I-17 | Branco Cinza | 15,02 | x | 5,00 | + | Cilíndrico |
| I-18 | Branco Cinza | 16,68 | x | 4,99 | + | Cilíndrico |
| I-19 | Branco Cinza | 11,93 | x | 4,84 | + | Cilíndrico |
| I-20 | Branco | 14,45 | x | 4,94 | + | Cilíndrico |
| I-21 | Branco Cinza | 7,42 | x | 3,10 | + | Cilíndrico |
| I-22 | Branco Cinza | 10,73 | x | 4,64 | + | Cilíndrico |
| I-23 | Branco | 7,42 | x | 3,10 | + | Cilíndrico |
| I-24 | Branco Cinza | 4,06 | x | 1,54 | + | Cilíndrico |
| I-25 | Branco | 5,54 | x | 2,66 | - | Cilíndrico |
| I-26 | Branco Cinza | 16,36 | x | 4,31 | + | Cilíndrico |
| I-27 | Branco Cinza | 12,96 | x | 5,28 | + | Cilíndrico |
| I-28 | Branco Cinza | 10,32 | x | 3,57 | + | Cilíndrico |
| I-29 | Branco Cinza | 12,99 | x | 3,58 | + | Cilíndrico |
| I-30 | Branco Cinza | 12,45 | x | 4,08 | + | Cilíndrico |
| I-31 | Branco Cinza | 13,38 | x | 3,17 | + | Cilíndrico |
| I-32 | Branco Cinza | 12,08 | x | 4,07 | + | Cilíndrico |
| I-33 | Branco Cinza | 3,36 | x | 1,71 | + | Cilíndrico |
| I-34 | Branco Cinza | 11,49 | x | 2,59 | + | Cilíndrico |

Os conídios dos isolados analisados exibiram o formato reto, cilíndrico e de ápices arredondados, com média, de comprimento 11,621 μm e largura 4,05 μm (Tabela 3). Estes dados estão de acordo com os obtidos por Feitosa et al. (1977) para isolados de *Colletotrichum spp.* associados ao cafeeiro. Entre os 33 isolados avaliados neste estudo, 68% apresentaram conídios entre 12,0 a 17,0 μm de comprimento e 3,5 a 6,0 μm de largura. Estes valores são propostos para

C. gloeosporioides segundo Sutton (1992). Neste trabalho, observou-se a diferenciação de dois tipos de conídios, aqueles no qual há predominância de isolados com conídios de comprimento superiores a 10 µm, e no qual há a predominância de isolados com conídios de comprimento inferior a 7 µm.

Em relação ao índice de velocidade de crescimento micelial, pode ser observado que os meios que apresentavam maior fonte de carbono a serem metabolizados pelos fungos foram os que promoveram maior crescimento destes, sendo que o melhor desempenho observado foi o meio de cultura MEA com média de crescimento 2,85 mm, seguido pelo meio BDA 2,15 mm (Tabela 4). No geral muitos fungos utilizam glicose, porém outros açúcares podem servir como fonte de carbono com finalidades biossintéticas.

Conforme análise de variância, a interação foi significativa para isolado x meio de cultura, apresentado um coeficiente de variação de 7,7. Na comparação das médias sobre o IVCm, de acordo com o teste de Scott Knott (0,05), dentre o desenvolvimento dos isolados, pode-se observar a formação de 4 agrupamentos para os meios BDA e GYA, e de 5 agrupamentos para os meios MEA e OA. De acordo com a composição do meio, os isolados se diferenciaram quanto à taxa de crescimento micelial e de esporulação, sendo que o meio que favoreceu a melhor taxa de crescimento micelial para um determinado isolado não necessariamente foi o melhor meio para a produção de conídios.

Tabela 4 Índice de velocidade de crescimento micelial (mm.dia⁻¹) dos diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. relacionados ao cafeeiro em quatro meios de cultura

| Isolados | IVCM (mm.dia ⁻¹) | | | |
|----------|------------------------------|---------|---------|---------|
| | Meios de Cultivo | | | |
| | MEA | BDA | OA | GYA |
| I-1 | 2,72 Ad | 2,29 Ba | 1,63 Cb | 1,65 Cc |
| I-2 | 3,02 Ac | 2,12 Bc | 1,80 Ca | 1,85 Cc |
| I-3 | 2,65 Ad | 2,05 Bc | 1,71 Cb | 1,71 Cc |
| I-4 | 3,08 Ac | 2,36 Ba | 2,05 Ca | 2,02 Ca |

| | | | | |
|------|---------|---------|---------|---------|
| I-5 | 2,59 Ad | 1,72 Bd | 1,76 Bb | 1,61 Bc |
| I-6 | 3,02 Ac | 2,20 Bb | 1,94 Ba | 2,07 Bb |
| I-7 | 3,04 Ac | 2,24 Bb | 1,91 Ca | 2,04 Cb |
| I-9 | 2,34 Ae | 2,16 Ab | 1,81 Ba | 1,86 Bc |
| I-10 | 2,50 Ae | 2,26 Bb | 1,72 Cb | 1,81 Cc |
| I-11 | 2,75 Ad | 2,38 Ba | 1,81 Ca | 1,87 Cc |
| I-12 | 2,66 Ad | 1,84 Bd | 1,62 Bb | 1,75 Bc |
| I-13 | 2,66 Ad | 1,99 Bc | 1,77 Cb | 1,71 Cc |
| I-14 | 2,44 Ae | 1,84 Bd | 1,87 Ba | 1,89 Bb |
| I-15 | 3,15 Ac | 2,19 Bb | 2,15 Ba | 2,02 Ba |
| I-16 | 2,82 Ad | 2,36 Ba | 1,70 Ca | 1,91 Cc |
| I-17 | 2,71 Ad | 2,06 Bc | 1,78 Ca | 1,84 Cc |
| I-18 | 2,80 Ad | 2,13 Bb | 0,92 Dd | 0,17 Ce |
| I-19 | 2,84 Ad | 2,29 Ba | 1,71 Ca | 1,94 Dc |
| I-20 | 2,94 Ac | 2,12 Bb | 1,70 Cc | 1,48 Cc |
| I-21 | 2,65 Ad | 2,03 Bc | 1,86 Cb | 1,73 Cb |
| I-22 | 3,09 Ac | 2,43 Ba | 0,98 Ca | 1,86 Dd |
| I-23 | 2,95 Ac | 2,45 Ba | 1,87 Ca | 2,08 Cb |
| I-24 | 2,74 Ad | 1,66 Bd | 1,70 Bb | 1,69 Bc |
| I-25 | 2,34 Ac | 1,82 Bb | 0,32 Ca | 0,16 Ca |
| I-26 | 2,49 Ae | 2,25 Bd | 1,66 Bb | 1,60 Bc |
| I-27 | 3,02 Ac | 2,16 Bb | 1,81 Ca | 1,94 Cc |
| I-28 | 3,06 Ac | 2,23 Bb | 1,76 Ba | 1,92 Cc |
| I-29 | 3,23 Ab | 2,35 Ba | 1,63 Cb | 1,63 Cc |
| I-30 | 2,82 Ad | 2,26 Bb | 1,73 Ca | 1,99 Dc |
| I-31 | 3,07 Ac | 2,25 Bb | 1,77 Ca | 1,89 Cc |
| I-32 | 2,28 Ae | 1,76 Bd | 1,53 Cc | 1,35 Cc |
| I-33 | 3,50 Aa | 2,34 Ba | 1,93 Ca | 2,00 Cb |
| I-34 | 2,72 Ad | 2,22 Bb | 1,89 Cb | 1,79 Cb |

Letras minúsculas comparam isolados dentro de cada meio de cultura e letras maiúsculas comparam meios de cultura dentro de cada isolado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Verificou-se que a produção de conídios foi favorecida quando os isolados foram cultivados em meio OA, observando-se também que cada isolado apresenta um padrão de esporulação distinto (Tabela 5). Os meios de cultura ricos em carbono e nitrogênio podem proporcionar um maior crescimento vegetativo de fungos, enquanto que, aqueles deficientes em nitrogênio podem aumentar a conidiogênese (LOUREIRO et al., 2003). Segundo Couto e Menezes

(2004) a nutrição de C/N exerce efeito nos processos fisiológicos de fungos, principalmente aqueles relacionados ao crescimento, produção de conídios, germinação e peso seco, permitindo também, estabelecer diferenças entre os isolados de *Colletotrichum* segundo sua habilidade em usar determinada fonte de carbono e nitrogênio.

Tabela 5 Produção de esporos dos diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em quatro meios de cultivo

| Isolados | Esporulação | | | |
|----------|------------------|----------|----------|----------|
| | Meios de Cultivo | | | |
| | MEA | BDA | AO | GYA |
| I-1 | 12,00 Cf | 16,30 Bb | 34,50 Ac | 7,90 Cd |
| I-2 | 4,90 Bg | 7,80 Bd | 13,11 Af | 4,50 Be |
| I-3 | 11,10 Bf | 12,40 Bc | 17,30 Ae | 4,40 Ce |
| I-4 | 11,60 Af | 12,70 Ac | 9,10 Ag | 8,10 Ad |
| I-5 | 10,80 Af | 8,30 Bd | 13,60 Af | 6,00 Bd |
| I-6 | 41,0 Ab | 20,60 Bb | 23,50 Bd | 3,60 Ce |
| I-7 | 3,89 Bg | 8,70 Bd | 18,30 Ae | 4,80 Be |
| I-9 | 36,30 Ac | 15,30 Bc | 40,60 Bb | 8,40 Bd |
| I-10 | 11,10 Af | 8,30 Bd | 13,30 Af | 4,50 Be |
| I-11 | 1,61 Ae | 7,80 Bd | 20,80 Ad | 8,30 Bd |
| I-12 | 7,30 Ag | 5,70 Bd | 7,10 Ag | 4,30 Ae |
| I-13 | 6,19 Ag | 6,00 Ad | 7,50 Ag | 2,50 Ae |
| I-14 | 50,00 Aa | 50,00 Aa | 50,00 Aa | 50,00 Aa |
| I-15 | 1,78 Ae | 7,00 Bd | 13,91 Af | 6,90 Bd |
| I-16 | 45,00 Ab | 17,60 Cb | 24,00 Bd | 13,20 Cc |
| I-17 | 9,50 Bf | 4,30 Ce | 9,80 Bg | 15,30 Ab |
| I-18 | 19,90 Ae | 15,00 Ac | 16,50 Ae | 13,80 Ac |
| I-19 | 24,80 Ad | 7,30 Cd | 24,60 Ad | 15,10 Bb |
| I-20 | 1,00 Ag | 1,00 Ae | 1,00 Ah | 1,00 Ae |
| I-21 | 4,00 Ag | 2,60 Ae | 4,50 Ah | 2,30 Ae |
| I-22 | 3,90 Ag | 7,00 Bd | 11,40 Af | 12,80 Ac |
| I-23 | 14,00 Bg | 9,00 Ad | 11,00 Af | 10,60 Ac |
| I-24 | 14,60 Ae | 9,60 Bd | 22,90 Ad | 12,30 Bc |
| I-25 | 1,00 Bg | 1,00 Ae | 1,00 Af | 1,00 Ae |
| I-26 | 13,80 Af | 8,00 Bd | 5,10 Bh | 12,60 Ac |
| I-27 | 15,90 Ae | 5,00 Be | 12,70 Af | 5,00 Be |
| I-28 | 5,79 Ag | 5,90 Ad | 4,90 Ah | 4,00 Ae |

| | | | | |
|------|----------|----------|----------|----------|
| I-29 | 3,69 Cg | 8,70 Bd | 3,70 Ah | 20,30 Ab |
| I-30 | 10,60 Bf | 18,00 Ab | 19,13Ce | 9,00 Bd |
| I-31 | 8,49 Ag | 12,40 Ac | 14,51 Af | 9,80 Ac |
| I-32 | 12,90 Bf | 12,50 Bc | 18,83 Ae | 11,50 Bc |
| I-33 | 5,50 Ag | 3,40 Ae | 8,50 Ag | 3,10 Ae |
| I-34 | 32,00 Ac | 11,60 Cc | 24,10 Cd | 16,30 Cb |

Letras minúsculas comparam isolados dentro de cada meio de cultura e letras maiúsculas comparam meios de cultura dentro de cada isolado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

O pH seja do tecido ou do meio de cultivo é um parâmetro importante no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, uma vez que este pode afetar as atividades fisiológicas, como por exemplo a produção de enzimas, e esta, por sua vez, pode determinar a eficiência da virulência ou agressividade.

Neste trabalho, foi possível observar que todos os isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram melhor desempenho em relação ao crescimento micelial quando cultivados em pH 5,5, enquanto que para a esporulação, o melhor resultado foi observado em pH 6,5, sendo capaz de desenvolver-se nas outras faixas de pH, porém apresentaram menores índices nestes (Figura 1).

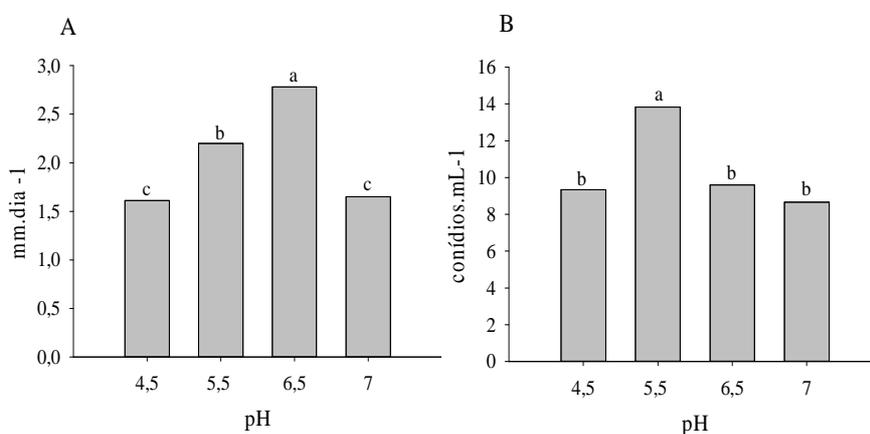


Figura 1 Médias do crescimento micelial (A) e esporulação (B) dos 33 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes níveis de pH

Deshmukh et al. (2012) observou que esporulação de *C. gloeosporioides* ocorreu em maior número quando estes foram cultivados em pH 5,0, pH 5,5 e pH 6,0, e que para crescimento micelial o melhor fora pH 5,5 e 6,0. Este também verificou que os piores índices de esporulação e crescimento foram obtidos quando cultivados em pH 7,0 e 8,0. Kumara e Rawal (2010) em seu estudos sobre isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de frutos de mamão também verificaram que a faixa de pH favorável para a esporulação e crescimento foi ente 5,0 e 6,0.

Muitos patógenos podem prosperar em uma ampla gama de pH, e são conhecidos por possuírem um sistema regulatório que garanta que enzimas e outros produtos sejam gerados apenas com níveis de pH em que as suas funções sejam eficientes, sendo capazes de modificar seu ambiente, tornando-o favorável a seu desenvolvimento.

Prusky et al. (2001) relataram que durante o crescimento de *C.gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. coccodes* em meio de extrato de levedura acidificado, estes fungos foram capazes de secretar amônia, aumentando o pH do meio. Yakoby et al. (2000) verificou que a expressão do gene *pelB* de *C. gloeosporioides* acontece em valores de pH superiores 5,1 e que a secreção da enzimas transcritas por este ocorre apenas em pH superior a 5,8.

Tradicionalmente, a identificação de fungos filamentosos está baseada principalmente em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. Métodos de rápida identificação de fungos, baseados em biologia molecular, vêm sendo cada vez mais utilizados, como os métodos imunológicos, tecnologia de sonda de DNA/RNA e a tecnologia da PCR (ATKINS; CLARK, 2004), sendo que a PCR tem se demonstrado uma importante ferramenta na detecção,

identificação e na taxonomia molecular de muitos microrganismos patogênicos (BEZUIDENHOUT; PRINSLOO; VAN DER WALT, 2006)

A confirmação do gênero *Colletotrichum* foi efetuada por meio do par de oligonucleotídeo CcF1/Cc2R1, específicos para o gênero, amplificando um fragmento de 447 pb para todos os isolados (Figura 2). Para os oligonucleotídeos CanIt2/ITS4, o qual identifica a espécie *C. acutatum*, não foi observada nenhuma amplificação. Todos isolados foram positivos para os oligonucleotídeos CgInt/ITS4, os quais amplificaram fragmentos de 450 pb, sugerindo, deste modo, que os isolados avaliados pertenciam a espécie *C. gloeosporioides* (Tabela 6). Freitas et al. (2011) também realizaram a identificação molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos do cafeeiro, utilizando os mesmos primers.

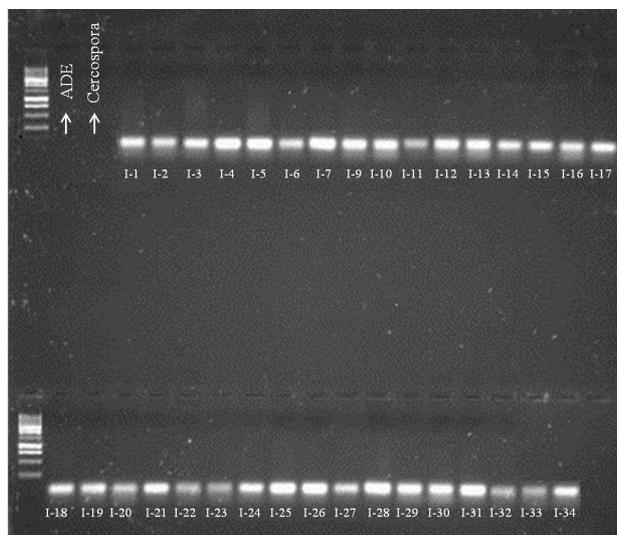


Figura 2 Confirmação do gênero *Colletotrichum* via PCR. Ausência de bandas corresponde a Água estéril e fungo de gênero *Cercospora*. Presença de bandas corresponde aos isolados obtidos de cafeeiro de MG. Marcador molecular 1kKb

Tabela 6 Identificação da espécie dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de cafeeiros por meio de PCR

| Isolado | Oligonucleotídeos | | Isolado | Oligonucleotídeos | |
|---------|-------------------------------------|------------------------------|---------|-------------------------------------|------------------------------|
| | <i>C.</i> <i>gloeosporioides</i> | <i>C.</i> <i>acutatum</i> | | <i>C.</i> <i>gloeosporioides</i> | <i>C.</i> <i>acutatum</i> |
| | <u>CgInt</u> ITS4 | <u>CaInt2</u> ITS4 | | <u>CgInt</u> ITS4 | <u>CaInt2</u> ITS4 |
| I-1 | + | - | I-18 | + | - |
| I-2 | + | - | I-19 | + | - |
| I-3 | + | - | I-20 | + | - |
| I-4 | + | - | I-21 | + | - |
| I-5 | + | - | I-22 | + | - |
| I-6 | + | - | I-23 | + | - |
| I-7 | + | - | I-24 | + | - |
| I-9 | + | - | I-25 | + | - |
| I-10 | + | - | I-26 | + | - |
| I-11 | + | - | I-27 | + | - |
| I-12 | + | - | I-28 | + | - |
| I-13 | + | - | I-29 | + | - |
| I-14 | + | - | I-30 | + | - |
| I-15 | + | - | I-31 | + | - |
| I-16 | + | - | I-32 | + | - |
| I-17 | + | - | I-33 | + | - |
| I-18 | + | - | I-34 | + | - |

Mesmo pertencendo ao mesma espécie, foi possível constatar nos ensaios a alta variabilidade da amostra por meio apenas de caracteres fisiológicos e morfológicos, percebendo-se a complexidade do patossistema em questão. Dias et al (2004) também observou grande variabilidade entre os isolados e as variáveis: IVCm, capacidade de esporulação e germinação conidial, observando que os isolados não se comportaram da mesma maneira em relação às três variáveis estudadas, existindo temperaturas ótimas diferentes para

crescimento, germinação e produção de conídios para os isolados, sendo a temperatura uma das principais variáveis climáticas responsáveis pela infecção e posterior colonização do patógeno. Essa variabilidade observada pode estar relacionada com a alta capacidade de adaptação climática desses isolados.

Os isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cafeeiro foram capazes de induzir sintomas em frutos assim como nos hipocótilos avaliados (Tabela 7). Em ambos foi possível observar a variabilidade na indução dos sintomas, tanto em função do material utilizado (fruto / hipocótilo), quanto dos isolados testados.

Quando inoculados em material sintomático, verificou-se que os índices da doença foram superiores aos dos materiais assintomáticos. Este fato, talvez possa ser devido à presença do patógeno no tecido, visto que estes são originários de plantas que apresentavam sintoma de mancha manteigosa. Ferreira et al. (2009) relataram a presença de *C. gloeosporioides* em folhas, pecíolos, nervuras, ramos, hipocótilos e frutos de cafeeiro com mancha manteigosa, observando que o mesmo ocorre sistemicamente em todos os tecidos avaliados. Estes também verificaram a não ocorrência do patógeno em frutos e hipocótilos considerados “sadios”.

Tabela 7 Patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos e hipocótilos de café durante 20 dias, oriundos de plantas com mancha manteigosa (sintomático) e sem mancha manteigosa (assintomático).

| Índice de Intensidade da Doença (%) | | | | |
|--|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| Isolado | Frutos | | Hipocótilos | |
| | Assintomático | Sintomático | Assintomático | Sintomático |
| I-1 | 23,33 Bc | 98,00 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-2 | 28,33 Bb | 95,00 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |

| | | | | |
|------|----------|-----------|----------|-----------|
| I-3 | 18,33 Bc | 93,00 Ab | 0,00 Bb | 22,00 Ac |
| I-4 | 21,66 Bc | 91,66 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-5 | 28,33 Bb | 76,66 Ac | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-6 | 28,33 Bb | 91,66 Ab | 2,33 Ab | 8,33 Ac |
| I-7 | 30,00 Bb | 88,33 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-9 | 53,33 Ba | 100,00 Aa | 24,00 Ba | 100,00 Aa |
| I-10 | 38,33 Bb | 96,00 Ab | 0,00 Bb | 72,67 Ab |
| I-11 | 35,00 Ba | 95,00 Ab | 0,00 Bb | 16,33 Ac |
| I-12 | 25,00 Bc | 95,00 Ab | 0,00 Ab | 10,33 Ac |
| I-13 | 20,00 Bc | 96,00 Ab | 0,00 Bb | 14,00 Ac |
| I-14 | 18,33Bc | 100,00 Aa | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-15 | 35,00 Ba | 96,00 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-16 | 35,00 Bb | 93,33 Ab | 0,00 Ab | 3,33 Ad |
| I-17 | 21,66 Bc | 90,00 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-18 | 20,00 Bc | 83,33 Ac | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-19 | 35,00 Bb | 85,00 Ac | 0,00 Bb | 20,33 Ac |
| I-20 | 25,00 Bc | 70,00 Ac | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-21 | 33,33 Bb | 95,00 Ab | 0,00 Ab | 5,67 Ad |
| I-22 | 23,33 Bc | 88,33 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-23 | 31,66 Bb | 93,33 Ab | 0,00 Ab | 10,66 Ac |
| I-24 | 61,66 Ba | 100,00 Aa | 23,33 Ba | 100,00 Aa |
| I-25 | 25,00 Bc | 83,33 Ac | 0,00 Bb | 14,66 Ac |
| I-26 | 53,33 Ba | 100,00 Aa | 3,67 Bb | 100,00 Aa |
| I-27 | 20,00 Bc | 91,66 Ab | 0,00 Ab | 11,67 Ac |
| I-28 | 18,33 Bc | 91,66 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-29 | 28,33 Bb | 98,00 Ab | 0,00 Ab | 10,66 Ac |
| I-30 | 23,33 Bc | 96,00 Ab | 0,00 Ab | 5,00 Ad |
| I-31 | 23,33 Bc | 100,00 Aa | 0,00 Ab | 11,00 Ac |
| I-32 | 30,00 Bb | 96,00 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-33 | 16,66 Bc | 93,33 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Ad |
| I-34 | 38,33 Bb | 93,33 Ab | 0,00 Bb | 13,33 Ac |
| Test | 0,00 Ad | 0,00 Ad | 0,00 Ab | 0,00 Ac |

Letras minúsculas comparam isolados dentro de cada meio de material avaliado e letras maiúsculas comparam patogenicidade dentro de cada isolado, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Ferreira et al (2010) observaram, a partir do desenvolvimento das plântulas, que quando estas foram oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa, altos índices de morte de plântulas ocorriam, tendo apenas 5,2% de sobrevivência, verificando ainda com a abertura dos primeiros folíolos nestas

plântulas, sintomas típicos da doença, com posterior morte das mesmas, enquanto que, a partir de sementes sadias, as plântulas apresentam-se vigorosas e em pleno crescimento, tendo evidências da transmissão do patógeno via sementes.

Um dos mecanismos de infecção utilizado por espécies de *Colletotrichum* é a estratégia hemibiotrófica, na qual, o fungo se mantém no hospedeiro em estado latente, aguardando fatores externos favoráveis para ativação de sua patogenicidade, como por exemplo, fatores que modulam o nível intracelular e geralmente são afetados por nível nutricional ou pH do espaço intracelular (PRUSKY; LICHTER, 2007).

Acredita-se que a presença de um "novo isolado" no tecido previamente infectado possa ter acelerado ou potencializado os sintomas a serem exteriorizados, o qual justificaria o fato destes terem apresentados índices de doenças superiores. Chen, Liang e Rodrigues (2005), verificaram que isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de cafeeiro em países como Quênia e China não foram capazes de induzir sintomas quando inoculados isoladamente em frutos de café, no entanto, quando inoculados sobre ferimentos ou em associação com *C. kahawae*, estes isolados induziram sintomas e/ou promoveram aumento das lesões provocadas por *Colletotrichum kahawae*.

Os primeiros sintomas de necrose em frutos verdes de café ocasionado pelos isolados de *C. gloeosporioides*, puderam ser observados a partir da primeira avaliação, ou seja, cinco dias após a inoculação em frutos sintomáticos assim como em frutos assintomáticos, ocasionando lesões necróticas úmidas deprimidas, que progrediram com o tempo. Em alguns frutos foi possível observar a formação de massa de esporos sobre as lesões. Os frutos provenientes de plantas com mancha manteigosa apresentaram os níveis mais elevados de patogenicidade, chegando a 100% de frutos necrosados. Todos os isolados

inoculados em frutos diferiram estatisticamente ao nível de significância de 5% da testemunha.

Pequenas lesões acastanhadas no caule dos hipocótilos puderam ser vista a partir do quinto dia após a inoculação, as quais evoluíram rapidamente por todo o caule, promovendo o estrangulamento da plântula, com 12 dias de avaliação. Somente os isolados I-6, I-9, I-24 e I-26 apresentaram necroses em plantas sintomáticas e assintomáticas. Em plantas sintomáticas, além dos citados anteriormente, os isolados I-3, I-10, I-11, I-12, I-13, I-16, I-19, I-21, I-23, I-25, I-27, I-29, I-30, I-31 e I-34 apresentaram sintomas de necrose em hipocótilos. Já em plantas assintomáticas. Os demais isolados não mencionados comportaram-se igual à testemunha, não havendo diferenças estatísticas entre estes.

Os isolados avaliados neste trabalho apresentaram-se mais agressivos quando inoculados em frutos verdes. Nestes, foi possível observar que todos os isolados manifestaram sintomas de necrose. Já em hipocótilos observou-se que número de isolados a apresentar sintomas foi menor. Deste modo, frutos podem ser considerados mais suscetíveis a *C. gloeosporioides* do que plântulas. Tal diferença em relação ao tipo de material, talvez se deva a própria composição do material. Frutos possuem altos teores de amido (LAVIOLA et al., 2007) que pode consistir em uma fonte nutricional para patógenos.

Os isolados I-9, I-24 e I-26 apresentaram índices de intensidade de doença de 100% quando inoculados em plantas sintomáticas, tanto para frutos como em hipocótilos. Quando em material assintomático, estes também apresentaram os maiores índices de doença. Em frutos apresentaram 53, 61 e 53%, respectivamente, destacando-se dos demais isolados. Em hipocótilos estes apresentaram 24, 23 e 3%, respectivamente, sendo os únicos a apresentarem sintomas.

Nenhum dos isolados apresentou índice zero para frutos, porém em hipocótilos foi possível observar o fato para vários isolados (tabela 7). Os

isolados que apresentaram os menores índices de doença foram I-28 e I-33 com 18 e 16% de IID em frutos e 0 em hipocótilos.

A variabilidade na patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides* foi observada por outros autores anteriormente, evidenciando a existência de grande diversidade na indução ou incidência de sintomas com relação aos isolados testados (NECHET; ABREU, 2002; OROZCO, 2003; JULIATTI et al., 2006). Esta variabilidade sugere que, tanto os aspectos genéticos dos isolados de *Colletotrichum*, assim como, os genótipos de *C. arabica* utilizados nos testes de reprodução dos sintomas, podem ser responsáveis pela resposta obtida. Neto (2012) avaliou a resposta de diferentes cultivares de *C. arabica* à *C. gloeosporioides*, e verificou que todas as cultivares utilizadas apresentaram algum nível de susceptibilidade.

Neste trabalho, não foi possível verificar sintomas típicos de mancha manteigosa, devido à rápida evolução da necrose apresentado nos materiais inoculados, que quando muito severos levaram tanto frutos como hipocótilos a necrose geral e morte do tecido. Sintomas de mancha manteigosa são de difícil reprodução em condições controladas, porém manifestam-se com grande intensidade em campo. A manifestação destes sintomas talvez não esteja somente restrita ao patógeno, mas também condicionado a fatores nutricionais e idade da planta. Segundo Nechet e Abreu (2002) há necessidade de estudos que relatem a associação de algum fator que predisponha a planta ao patógeno, ligado às condições de cultivo ou à resistência ou susceptibilidade dessas plantas, já que dentro de um mesmo cafezal são observadas plantas com ataque generalizado da doença e outras que não apresentam incidência da doença.

5.2 Colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* transformado com *gfp* em plântulas de cafeeiro

A transformação do isolado de *C. gloeosporioides* (I-9) foi verificada por meio da resistência ao antibiótico higromicina-B, pela fluorescência verde no isolado transformado (Figura 03.I.a/b), uma vez que os isolados selvagens, quando submetidos à microscopia de epifluorescência, não emitiram fluorescência, e por meio da utilização de primers específicos propostos por Botelho, Barrocas e Machado (2010), com base nas sequências de nucleotídeos do *sGFP*.

Foi possível observar a partir do quinto dia após a inoculação, a manifestação dos primeiros sintomas nas plântulas as quais foram inoculadas com o isolado selvagem (I-9), já o isolado transformado (I-9*gfp*) apresentou sintomas somente no sétimo dia após a inoculação. Para ambos isolados, 15 dias após a inoculação 100% das plântulas apresentavam necrose total do caule (Figura 3.A e 3.B). A testemunha inoculada com água estéril (ADE), assim como o isolado não patogênico (I-33), não exibiram nenhum tipo de sintoma ao longo dos 15 dias de avaliação (Figura 3.C e 3.D).

Neste trabalho, foi possível evidenciar por meio da visualização da fluorescência, que os sintomas exteriorizados nas plântulas de café estavam relacionados à colonização interna do isolado transformado de *C. gloeosporioides* e não por algum outro microorganismo já existente nos tecidos das mudas.

Mesmo apresentando um atraso no aparecimento dos primeiros sintomas, o isolado transformado mostrou índice de doença elevado (Tabela 8), porém notou-se que a agressividade do isolado transformado foi diferente ao do tipo selvagem. Deste modo, verificou-se que mesmo após a inserção de um fragmento exógeno ao DNA do isolado I-9, este ainda manteve sua capacidade de infectar e causar doença, porém a virulência do isolado foi alterada.

Segundo Welsh e Kay (1997) a GFP não provoca interferência nas atividades celulares, deste modo pode-se inferir que esta não interfere na

patogenicidade do patógeno. Horowitz, Freeman e Sharon (2002), verificaram que isolados transformados com *gfp* de *Colletotrichum acutatum* permaneceram infectivos, assim como os isolados selvagens, e puderam ser detectados nos tecidos infectados, três dias após a inoculação, sendo possível observar o rápido desenvolvimento do fungo, preenchendo o mesófilo com denso micélio que invadiu as células e causou necrose do tecido. Isolados de *Colletotrichum graminicola*, modificados com gene *gfp*, também foram capazes de infectar sistemicamente plântulas de milho, sendo que as suas hifas foram encontradas nas raízes, colonizando a superfície, invadindo epiderme, córtex e tecidos vasculares (SUKNO et al., 2008).

A evolução dos sintomas nas mudas inoculadas com o isolado transformado foi semelhante ao produzido pelo isolado selvagem, iniciando-se com o aparecimento de pequenos pontos necróticos no local da inoculação, evoluindo para uma necrose em torno do local e passando a tomar todo o caule, atingindo as gemas apicais, e por fim ocasionando ao estrangulamento do caule, conseqüentemente levando ao tombamento da plântula.

Tabela 8 Média da agressividade apresentada pelos isolados inoculados em plântulas café

| Isolado | Índice de intensidade da doença |
|----------------|---------------------------------|
| I-9 | 1,00 |
| I-9 <i>gfp</i> | 0,76 |
| I-33 | 0,00 |
| ADE | 0,00 |

Em relação ao processo de infecção pode-se observar em amostras coletadas sete dias após a inoculação, através da presença de hifas, a colonização interna do tecido iniciado pelo parênquima cortical, e aparentemente atingindo os tecidos vasculares, visto que os sintomas foram progredindo em direção ao

ápice das plântulas. Resultados semelhantes no patossistema *C. gloeosporioides* x Cafeeiro, foram observados por Pereira et al. (2009), através de microscopia eletrônica de varredura, sendo por meio desta possível visualizar a colonização de vasos e parênquima do xilema de ramos de cafeeiro, e ainda diferenciá-los dos tecidos não afetados. Ferreira et al. (2009) também verificaram a presença do micélio de *C. gloeosporioides* em todos os órgãos do cafeeiro, colonizando sistemicamente os tecidos do xilema, do floema, do córtex e as células de endosperma, conseqüentemente provocando morte de ramos, mumificações de frutos e queda de folhas. Neste trabalho não foi possível à observação da colonização do córtex, devido a forte emissão de auto-fluorescência do tecido, não sendo possível diferenciar a fluorescência do micélio fúngico.

Aos dez dias após a inoculação foram vistos sob o tecido inoculado com o isolado mutante a formação de acérvulos e conseqüente produção de conídios (Figura 3.II.a/b e 3.III.a/b). Os acérvulos encontraram-se situados na epiderme, e romperam a superfície do tecido, sendo possível observar o desenvolvimento de conidióforos e setas. A formação de acérvulos em hipocótilos foi relatada anteriormente por Lins, Abreu e Alves (2007) no qual conidióforos formados sobre uma base estromática subcuticular romperam a cutícula após a inoculação. Ferreira (2009) em estudos sobre inoculação de diferentes isolados de *C. gloeosporioides* em folhas de café, verificou a formação de acérvulos 96 horas após a inoculação, assim como o surgimento de conidióforos através dos estômatos.

Espécies do gênero *Colletotrichum* podem apresentar diversas estratégias de colonização dos tecidos, que vão de hemibiotrofia intracelular em *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *C. orbiculare* e *C. truncatum*; a intramural subcuticular, relatada para *C. capsici*, *C. circinans*, *C. gloeosporioides* e *C. phomoides*; podendo ainda existir espécies que exibem ambas, como *C. gloeosporioides* (LOPEZ, 2001). Os patógenos com estratégia

hemibiotrófica intracelular invadem as células por um período curto mantendo-as, aparentemente, para a sua nutrição, e então convertem, para a fase necrotrófica matando a célula. Na estratégia subcuticular-intramural o fungo cresce sob a cutícula e na parede das células epidérmicas e subjacentes (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al. 2005). No presente trabalho, foi possível avistar tais relações, na qual durante as primeiras 96 horas o patógeno invade os tecidos aparentemente buscando recursos nutricionais, e então 240 horas após, estruturas reprodutivas são exteriorizadas na superfície dos hipocótilos inoculados.

Após 13 dias da inoculação foi possível reisolar os isolados transformado e selvagem, em meio de cultura extrato de malte-ágar, mantidos por dez dias em câmara de crescimento a 25°C.

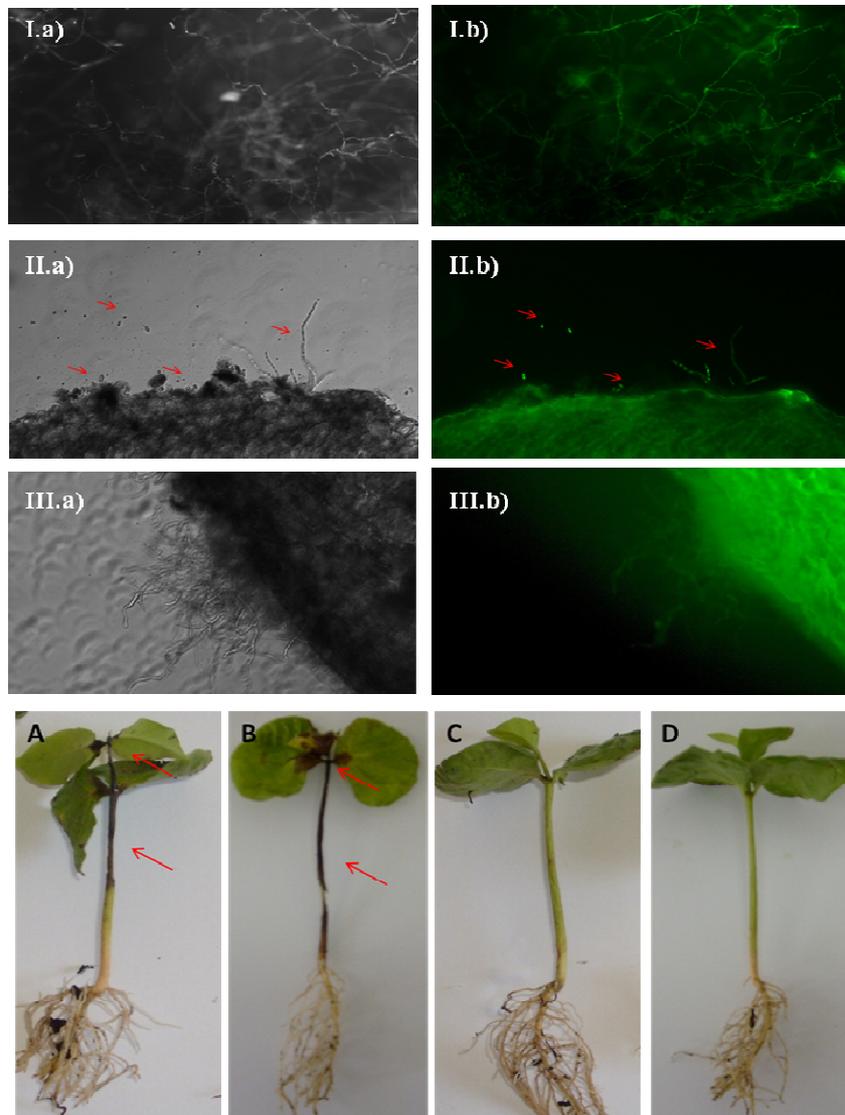


Figura 03 Fotomicrográfia do isolado transformados de *C. gloeosporioides* em meio de cultura (I.a e I.b) e colonizando tecido (II.a e II.b, III.a e III.b). Lado esquerdo da figura: microscopia comum; lado direito: microscopia de epifluorescência. Sintomas em plantulas de café após

inoculação com isolado transformado (A), isolado selvagem (B), isolado não patogênico (C) e água destilada (D)

5.3 Atividade enzimática dos isolados de *Colletotrichum spp.* associados ao cafeeiro

Todos os 33 isolados estudados, foram capazes de produzir as diferentes enzimas extracelulares, em menor ou maior quantidade, constatando-se a variabilidade na produção destas pelos isolados, os quais foram agrupados de acordo com a área do halo de degradação dos substratos, nos respectivos meios específicos.

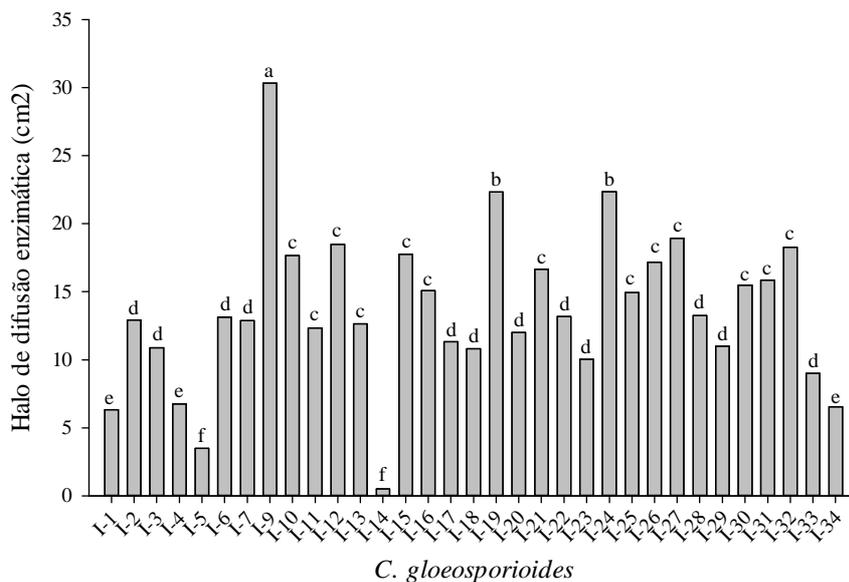


Figura 4 Médias da atividade *in vitro* da enzima extracelular amilase expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio específico

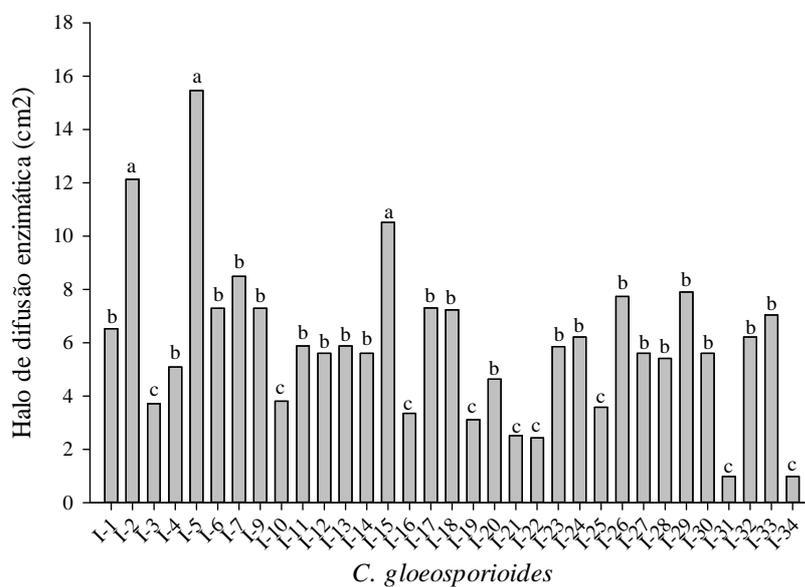


Figura 5 Médias da atividade *in vitro* da enzima extracelular lipase expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio específico

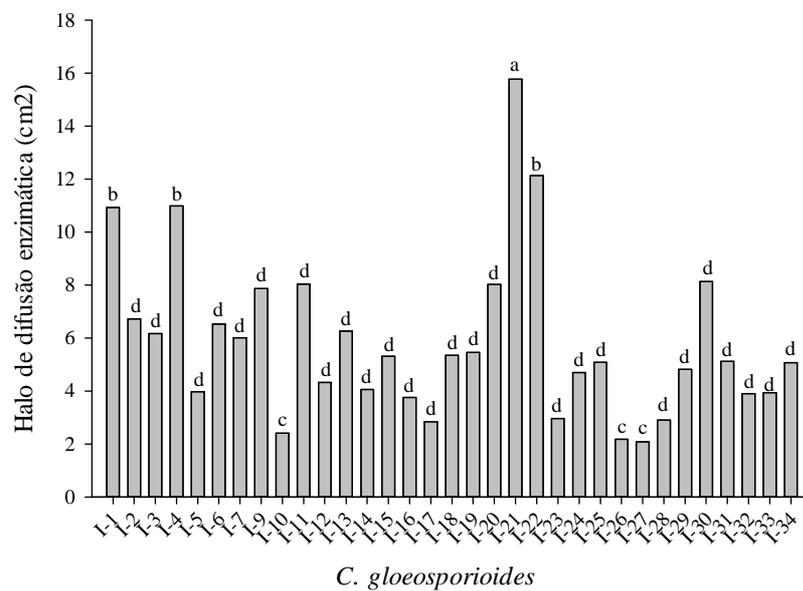


Figura 6 Médias da atividade *in vitro* da enzima extracelular proteinase expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio específico

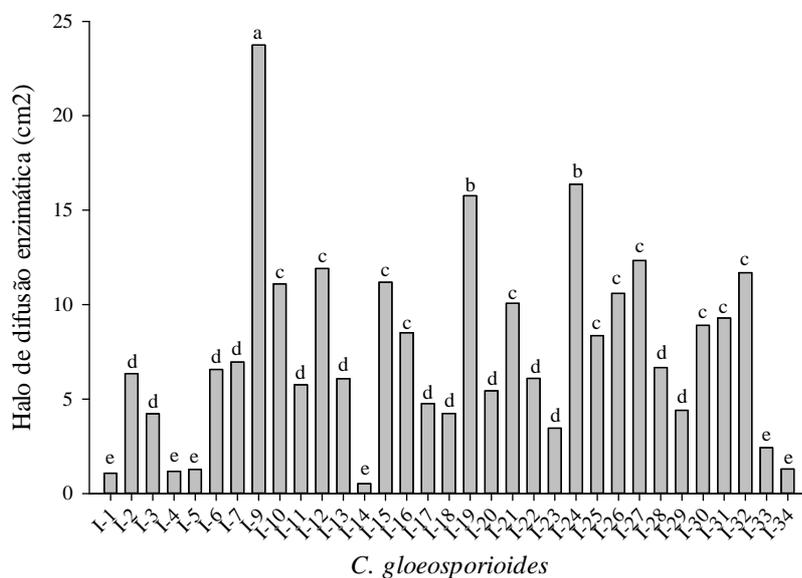


Figura 7 Médias da atividade *in vitro* da enzima extracelular lacase expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio específico

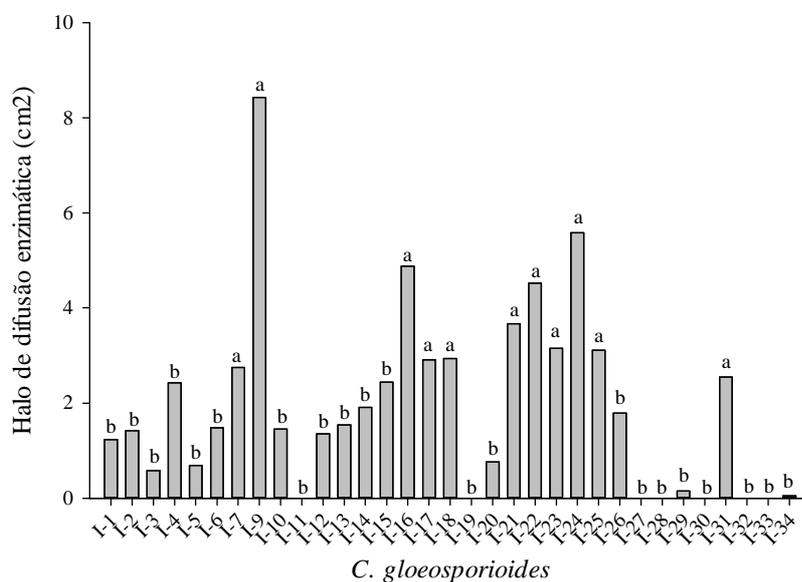


Figura 8 Médias da atividade *in vitro* da enzima extracelular pectinase expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio específico

Verificou-se que entre as enzimas analisadas, a amilase (Figura 4) destacou-se em relação às demais, promovendo os maiores halos de degradação. Como visto no ensaio anterior de IVCN, os isolados avaliados neste trabalho, apresentaram maior desenvolvimento micelial quando cultivados em meios ricos em fontes de carbono. O amido é um polissacarídeo sintetizado pelos vegetais para ser utilizado como reserva energética, sua hidrólise dá origem a um dissacarídeo, a maltose, a qual constitui uma fonte rica em carbono. Segundo Bolton e Thomma (2006) estas enzimas facilitam a penetração, colonização e maceração, mas também geram uma importante fonte de nutrientes. As amilases promovem a degradação do amido, o qual provavelmente poderá ser utilizado como fonte de energia durante o crescimento e/ou esporulação, o qual justifica a observação de uma elevada produção desta neste trabalho.

A enzima lacase (Figura 7), apresentou o segundo maior índice de difusão e formação de halo em meio sólido específico, em relação às enzimas avaliadas. Assim como a amilase, observou-se a formação de cinco grupos, os quais em sua maioria englobam os mesmos isolados envolvidos na produção de amilase.

As lacases são glicoproteínas polifenol-oxidase que estão envolvidas na degradação da Lignina (LEONOWICZ et al., 2001). Segundo Coll et al. (1993), as lacases, além de atuarem na degradação da lignina, também estão envolvidas em diferentes processos biológicos fúngicos como na esporulação, na produção de pigmentos durante o desenvolvimento do corpo de frutificação e na patogênese. Guestsky et al. (2007) demonstraram a atuação de lacases relacionadas a patogenicidade de *C. gloeosporioides* em abacate, no qual isolados que produziam menos lacases apresentavam menor agressividade.

Lin et al. (2012), trabalhando com isolados de *C. orbiculare*, demonstraram a relação entre a produção de lacases e a melanização de

apressórios, visto que melanização destes é essencial no processo de penetração, conseqüentemente na patogenicidade de diversos fungos. Os autores relataram a identificação do gene LAC2, o qual codifica uma proteína de alta homologia com as lacases fúngicas, e verificaram que mutantes defeituosos em LAC2 eram não patogênicos, exibindo conídios de coloração distinta dos isolados selvagens, apresentando apressórios não funcionais e sem melanina.

A maior expressão das atividades da amilase e da lacase, pode estar relacionada à alta necessidade destas nos processos de colonização dos tecidos, visto que amilase esta relacionada diretamente ao requerimento de energia e a lacase ligada ao processo de penetração, evidenciando a alta necessidade destas para o metabolismo fúngico e sua relação com a patogenicidade.

As proteases e as lípases (Figuras 5 e 6) apresentaram-se em menor quantidade em relação às enzimas anteriormente citadas, apresentando três e quatro grupos conforme a área do halo de degradação (Tabela 8) respectivamente.

Mesmo com menor atividade, a expressão de lípases e proteinases é de extrema importância, para estes isolados, já que as lipases atacam fosfolípidos, e representam um complexo enzimático com potencial importante na patogenicidade, pois degradam um componente celular de grande valor que é a membrana plasmática do hospedeiro (ASSIS et al., 2010).

Entre os microrganismos fitopatogênicos, muitos produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese (VALUEVA; MOSOLOV, 2004).

Deste modo, acredita-se que a menor expressão destas duas enzimas, as quais foram constatadas em todos os isolados avaliados, possam estar relacionada à sua atuação em conjunto, formando um complexo o qual culmina no sucesso do processo de infecção.

Nenhum isolado promoveu halo de degradação no substrato específico para a detecção da atividade de celulases. Entretanto neste trabalho observou que os isolados cresceram neste substrato, desta forma acredita-se que a produção de celulases pode ter ocorrido porém, em quantidade insuficiente para a formação do halo, ou o tempo de avaliação não foi o suficiente para a constatação deste.

Em sete dos 33 isolados estudados (I-11, I-19, I-27, I-28, I-30, I-32 e I-33), não foi possível detectar a atividade da pectinase (Figura 8), todos os outros isolados demonstraram serem capazes de produzir a enzima, gerando 5 grupos conforme a expressão com o halo de difusão enzimática formado no meio de cultura. A pectinase apresentou uma baixa atividade em relação às outras enzimas. Apesar desta constatação, existem evidências consideráveis sobre a importância das enzimas pécticas no estabelecimento de doenças. Segundo Thomma (2003) ao hidrolisar os polissacarídeos pécticos, os quais correspondem à 1/3 dos componentes totais da parede celular em dicotiledôneas, as pectinases podem atuar como fatores de patogenicidade, virulência ou agressividade. A inativação de genes codificadores para pectinases em *Alternaria citri* (ISSHIKI et al., 2001), *Nectria hematococca* (ROGERS et al., 2000) e *Colletotrichum gloeosporioides* (YAKOBY et al, 2001), têm resultado em mutantes com virulência reduzida em diversas culturas, evidenciando o envolvimento dessas enzimas na patogênese.

A contribuição das enzimas pécticas na patogênese pode envolver a extensiva destruição dos tecidos vegetais, bem como alterações específicas e localizadas nas paredes celulares. Deste modo, o papel desta enzima não esteja relacionado à sua quantidade, mas sim ao fato de serem ou não capazes de produzi-las.

Mesmo observando-se uma baixa produção de pectinases em meio sólido, isto em relação às outras enzimas, nos ensaios para enzimas degradadoras da parede celular (EDPCs), foi possível verificar a atividade de

pectinases específicas nestes isolados. Para a maioria destes, foi verificada a presença, em diferentes níveis, de poligalacturonase (PG), polimetilgalacturonase (PMG) e pectinaliase (PNL). Diversos autores relatam a atividade destas enzimas em várias espécies fúngicas como: *Fusarium spp.* (KIKOT; HOURS; ALCONADA, 2009), *Colletotrichum acutatum* (GREGORI et al., 2008), *Colletotrichum gloeosporioides* (JAL; SHARMA; GOUR, 2013), *Colletotrichum coccodes* (BEN-DANIEL, BAR-ZVI; TSROR, 2012), *Sclerotinia sclerotiorum* (LI et al., 2004), *Botrytis cinerea* (VALETTE-COLLET et al., 2003), *Alternaria alternata* (HUBBALLI et al., 2011).

As substâncias pécticas são encontradas na parede celular primária e na lamela média, e estas são agrupadas de acordo com o grau de polimerização do ácido galacturônico (pectina ou ácido péctico). A pectina como tal, não é utilizada pelo patógeno, mas sim seus produtos hidrolíticos, os quais são liberados pela clivagem das ligações glicosídicas (α -1,4) resultando em monômeros de ácido galacturônico de tamanhos variados e disponíveis para o fitopatógeno. As PMGs e PLs trabalham na clivagem da pectina, convertendo pectina em ácido péctico, que posteriormente será clivado pelas PG, liberando ácido galacturônico.

Dentre as três EDPCs avaliadas, a PMG foi a qual alcançou os maiores níveis de atividade apresentando níveis entre 0,2 a 1,8 nM.mL⁻¹ (Figura 10). A PG e a PNL apresentaram atividades inferiores a 0,3 8 nM.mL⁻¹ (Figura 9 e 11). A produção de EDPCs esta diretamente ligada a quantidade de substrato disponível. Acredita-se que a alta atividade observada no ensaio esteja relacionada a grande fonte de pectinase disponível no substrato, o que incitaria o fungo a uma maior produção de enzimas para a conversão destas.

As pectinases relacionadas as EDPCs, são consideradas como exemplos típicos de fatores básicos de compatibilidade, o que significa que elas são

requeridas para a patogenicidade, mas não determinam qualquer hospedeiro ou especificidade cultivar (REIGNAULTE; SANCHOLLE, 2001).

Fungos fitopatogênicos são capazes de secretar uma variedade de enzimas degradadoras da parede celular, os quais irão atuar na degradação da pectina, um dos principais polímeros da parede da célula vegetal, levando à maceração dos tecidos vegetais. Segundo Roncero et al. (2000). EDPCs podem ter diferentes finalidades para o patógeno durante a infecção, tais como a penetração e ramificação dentro o tecido hospedeiro, a liberação de nutrientes ou interferência com a resposta de defesa da planta.

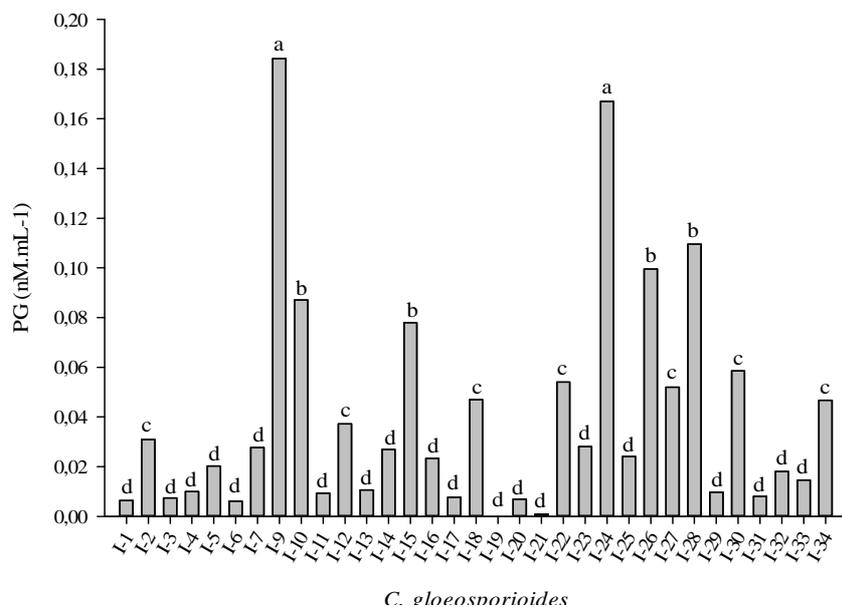


Figura 9 Médias da atividade da poligalcaturonase (PG) expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de mineral não tamponado

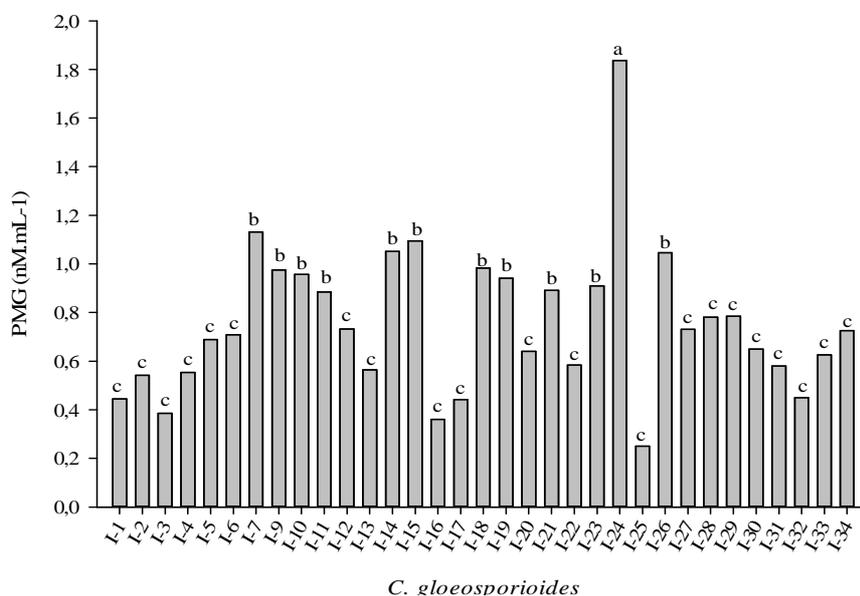


Figura 10 Médias da atividade da polimetilgalcaturonase (PMG) expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de mineral não tamponado

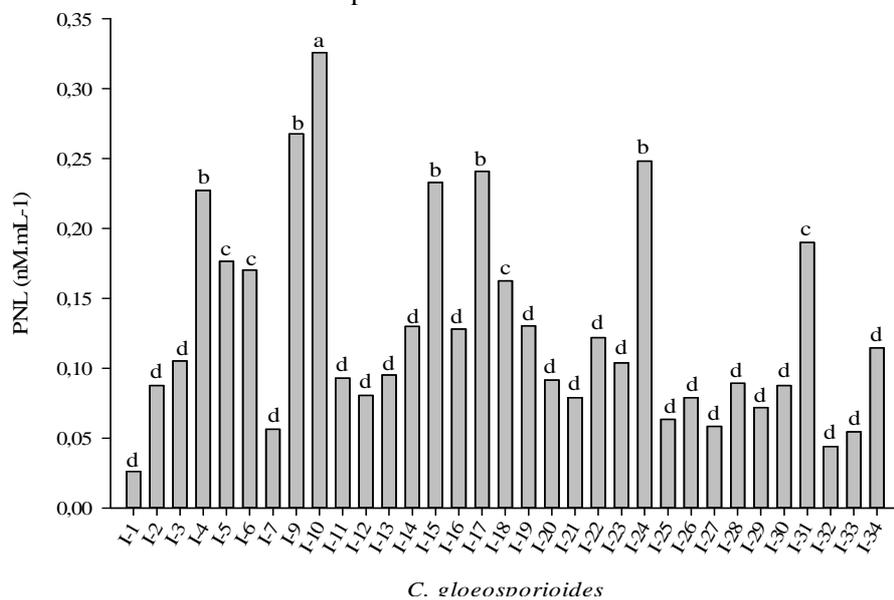


Figura 11 Médias da atividade da pectinase (PNL) expressa pelos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de mineral tamponado

Conforme a análise estatística dos dados, para a PG foi possível observar o agrupamento destes em 4 conjuntos, para a PMG foram 3 e para a PNL 4, nos quais os isolados I-9, I-10 e I-24 apresentaram nos três ensaios os maiores níveis de atividade de EDPCs, e os isolados I-1, I-3, I-13, I-20, I-25, I-29, I-30, I-31, I-32 e I-33 apresentaram os níveis mais baixos. Estes isolados também apresentaram os maiores e os menores índices de intensidade de doença, demonstrando deste modo que a expressão destas possa estar relacionada à patogenicidade dos isolados.

Analisando a correlação dos dados de expressão de EDPCs e patogenicidade (Tabela 9), verifica-se que esta é positiva, principalmente em hipocótilos, indicando que a relação entre a patogenicidade dos isolados e sua capacidade de produzir pectinases são próximas. O mesmo ocorreu para as enzimas hidrolíticas extracelulares amilase, lacase e pectinase.

Para nenhuma das enzimas avaliadas pode-se verificar correlação positiva para frutos de plantas sintomáticas (Tabela 9). Acredita-se que isto se deve ao fato do alto IID alcançado por estes, havendo pouca variabilidade, sugerindo que a manifestação dos sintomas independe da presença de enzimas. O alto IID obtido em frutos sintomáticos como descrito anteriormente, pode estar relacionado à presença do patógeno já no endocarpo, assim como, a suscetibilidade do material (cultivar) utilizado, o qual intensifica os sintomas observados, elevando o índice.

Anand et al. (2008) verificou a relação entre a virulência *C. capsici* e *A. alternata* de a produção de PG nos quais, verificou-se o aumento destas conforme o período de incubação dos patógenos aumentava, porém nos isolados avirulentos este aumento foi em menor escala, dando indícios da importância destas pectinases durante a patogênese.

Hubballi et al. (2012) também verificaram a relação entre a alta atividade de pectinases em isolados virulentos de *C. gloeosporioides*, e ainda relatam o aumento destas conforme o decorrer do período de incubação, no qual após atingir seu máximo de atividade esta começou a decrescer, já para isolados avirulentos a atividade das pectinases se mantiveram constantes durante o período de avaliação.

Ramos et al. (2010) verificou a atividade PMG, PG e PNL em isolados de *C. truncatum*, e justifica a que a disparidade observada na produção das enzimas entre as cepas não poderia estar relacionada ao crescimento fúngico ou com sua origem geográfica, mas sim associada a diferenças de virulência entre as cepas.

Avaliando-se o descrito pelos autores acima, e observando os dados do presente trabalho, pode-se inferir que as atividades das EDPCs independem da patogenicidade dos isolados, sendo todas as cepas capazes de produzir este tipo de enzima. Provavelmente os genes relacionados a esta atividade estejam presente em todas as cepas do patógeno, porém a regulação destes genes, e a expressão destas enzimas em quantidades que possam ser consideradas prejudiciais ao hospedeiro dependam sim, deste ser ou não patogênico, do seu “lifestyle”.

O perfil enzimático dos diferentes isolados de *C. gloeosporioides* neste estudo demonstra a capacidade destes produzirem um grande número de enzimas hidrolíticas extracelulares e EDPCs em diferentes níveis, evidenciando-se variabilidade intraespecífica entre a amostra e a importância das enzimas no processo de patogênese. Os isolados I-9 e I-24, apresentaram-se nos grupos de maior atividade em todas as enzimas analisadas. Essa associação entre patogenicidade/virulência e atividade enzimática pode desempenhar um importante papel na interação *Colletotrichum* x Cafeeiro, visto que grupos de especialização patogênica possam a vir ocorrer na interação.

Tabela 9 Correlação de Pearson entre atividade enzimática e patogenicidade dos isolados de *C. gloeosporioides*

| Enzimas | Frutos | | Hipocótilos | |
|------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | Assintomáticos | Sintomáticos | Assintomáticos | Sintomáticos |
| Amilase | 0,585** | 0,243 ^{NS} | 0,546** | 0,575** |
| Lipase | 0,345* | -0,022 ^{NS} | 0,471 ^{NS} | 0,262 ^{NS} |
| Proteinase | 0,025 ^{NS} | -0,011 ^{NS} | 0,130 ^{NS} | -0,108 ^{NS} |
| Lacase | 0,624** | 0,265 ^{NS} | 0,595** | 0,607** |
| Pectinase | 0,487** | 0,179 ^{NS} | 0,562** | 0,514** |

| EDPC | Frutos | | Hipocótilos | |
|------|----------------|---------------------|----------------|--------------|
| | Assintomáticos | Sintomáticos | Assintomáticos | Sintomáticos |
| PG | 0,678** | 0,331 ^{NS} | 0,816** | 0,766** |
| PMG | 0,633** | 0,239 ^{NS} | 0,569** | 0,552** |
| PEL | 0,381* | 0,094 ^{NS} | 0,449** | 0,442** |

* - Significativo a 5%

** - Significativo a 1%

NS - Não Significativo

5.4 Variabilidade genética dos isolados de *Colletotrichum spp.* por amplified fragment length polymorphism (AFLP)

As três combinações de primers (EcoAG/MseAT; EcoAT/MseAA e EcoAG/MseCA) utilizadas na reação de amplificação seletiva geraram 212 bandas polimórficas entre 200 e 800 pb (Figura 12). Na análise de diversidade pelo método Neighbor Joining, baseadas no padrão de bandas geradas pela análise de AFLP, os isolados de *C. gloeosporioides* foram divididos em três grupos. O Grupo A foi dividido em 16 subgrupos. O grupo B dividiu-se em 14 subgrupos. O grupo C foi formado apenas por um isolado (Figura 13).

A análise de agrupamento indica a existência de possíveis patótipos de *C. gloeosporioides* infectando lavouras cafeeiras do Estado de Minas Gerais. O grupo A foi formado pelos isolados: I-1, I-2, I-11, I-12, I-13, I-14, I-19, I-25, I-

26, I-27, I-28, I-29, I-30, I-32, I-33 e I-34. Os isolados: I-3, I-4, I-5, I-6, I-7, I-15, I-16, I-17, I-18, I-20, I-21, I-22, I-23 e I-24 comporam o grupo B. O grupo C foi formado apenas pelo isolado I-9.

Por meio da metodologia de AFLP, foi possível verificar a existência de grande diversidade entre os isolados analisados. Neste trabalho a distinção entre isolados que apresentaram maiores índices de agressividade e aqueles que obtiveram índices baixos, não foi tão evidente. Apenas o isolado I-9 destacou-se em relação a agressividade formando um grupo isolado.

Atraves da análise dos dados gerados pela AFLP evidenciou-se a tendência da formação dos grupos em relação a sua origem sintomática, no qual, 77% dos isolados que compõem o grupo A estão relacionados a sintomas da mancha manteigosa. No grupo B não foram observados isolados de mancha manteigosa, e o mesmo foi composto apenas por isolados relacionados a seca de ponteiros e antracnose, 60 e 40%, respectivamente. Ainda que, o grupo A tenha em sua formação alguns isolados relacionados a seca de ponteiros, a infomação gerada pela AFLP, sugere a diferenciação de subespécies dentro da população de *C. gloeosporioides* avaliada.

Julliati et al. (2006) com base em 33 marcadores RAPD polimórficos gerados por cinco oligonucleotídeos, evidenciaram a correlação entre o padrão molecular de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de cafeeiros das variedades Mundo Novo e Catuaí com os dados de agressividade, em plântulas e frutos verdes, sugerindo a existência de diferentes espécies e/ou patótipos (raças) de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos e apatogênicos em cafeeiros de Minas Gerais.

Orozco (2003) utilizando marcadores RAPD e SSR, observou altos índices de diversidade entre isolados de originários de Minas Gerais. O autor também propôs existência de raças patogênicas devido à alta variabilidade

encontrada na população *C. gloeosporioides* e aos vários sintomas associados ao patógeno.

Fungos patogênicos são geralmente classificados como espécies e raças com base em sua morfologia, especialização de hospedeiro, especificidade por cultivares e modo de parasitismo. A aplicação de métodos de análise molecular tem ajudado a esclarecer as relações genéticas de fungos que não são claramente distinguidos pela sua morfologia (ADURAMIGBA-MODUPE et al., 2012).

SILVA-MANN et al. (2005) através de marcadores AFLP, pode observar a diferenciação de subespécies de *Colletotrichum gossypi*, no qual, um conjunto de isolados estavam relacionados a sintomas de ramulose e em outro aqueles relacionados a antracnose. EOM et al. (2004) a partir de sequências proporcionadas por marcadores AFLP, construiu primers específicos para espécies de *Colletotrichum* relacionados a frutos de caqui.

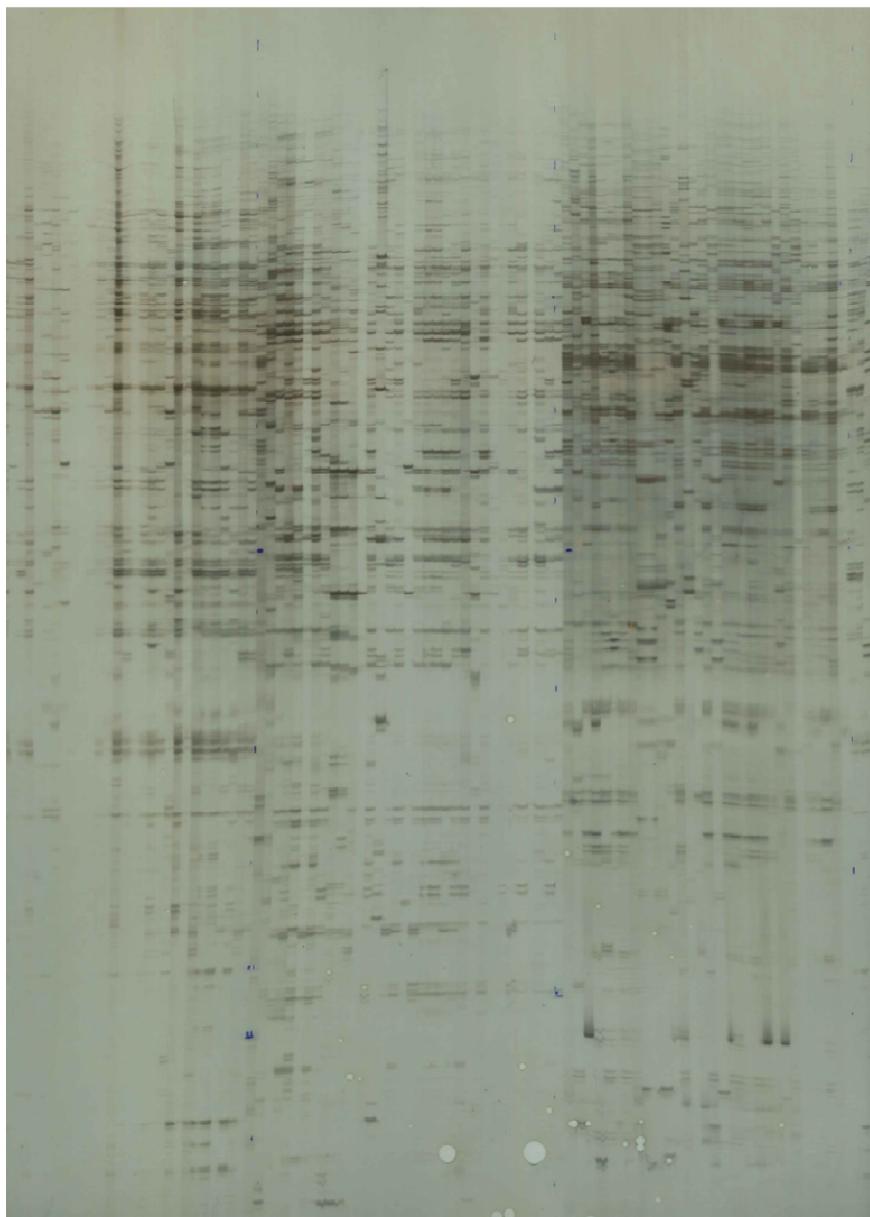


Figura 12 Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com as amostras de AFLP dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

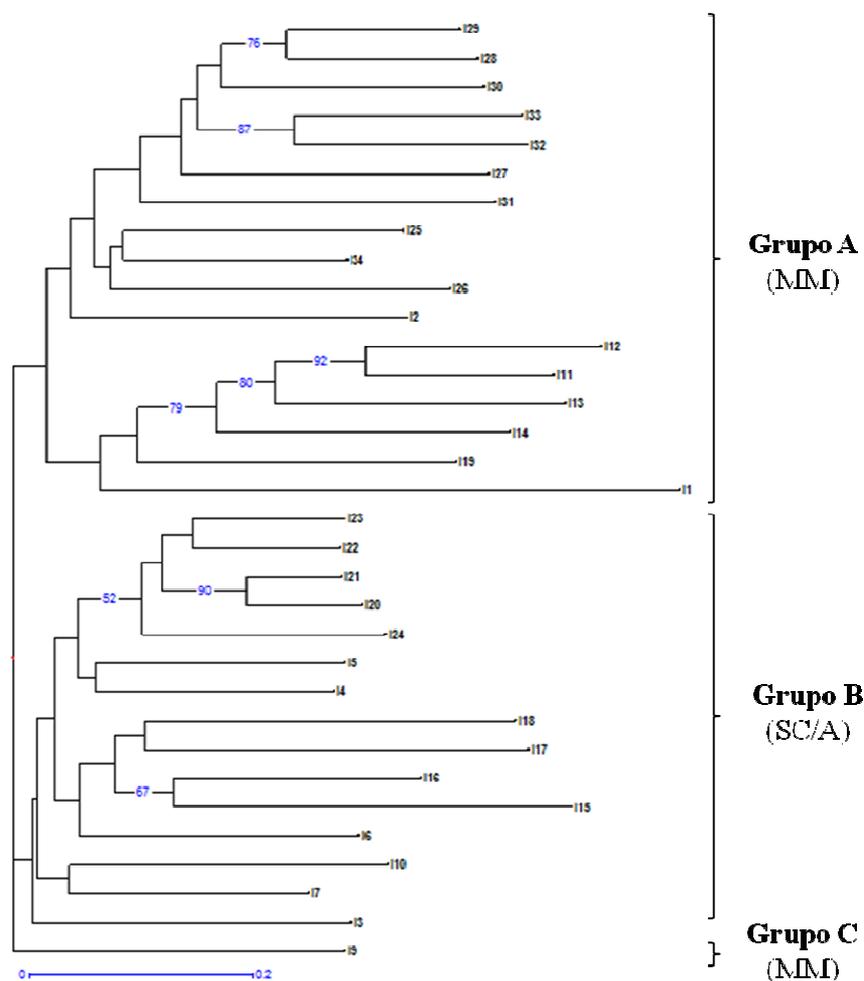


Figura 13 Dendrograma originado pela análise de AFLP utilizando o método de agrupamento Neighbor Joining (bootstraps >50%), demonstrando a divisão de três grandes grupos, formado em sua maioria por: A) isolados obtidos a partir de plantas com sintomas de mancha manteigosa (MM); B) Seca de ponteiros e antracnose (SC/A); C) Mancha manteigosa (MM)

6 CONCLUSÕES

- a) No presente trabalho foram obtidos 33 isolados de *Colletotrichum*, os quais foram identificados como pertencendo à espécie *C. gloeosporioides*.
- b) Características morfológicas e culturais não são suficientes para identificar variações entre os isolados de *C. gloeosporioides* relacionados ao cafeeiro.
- c) *C. gloeosporioides* obtidos de cafeeiros, desenvolve-se eficientemente na faixa de pH entre 5,5 e 6,5. Os meios de cultura extrato de malte-ágar (MEA) e aveia-ágar (OA) são os mais indicados para crescimento micelial e esporulação, respectivamente.
- d) Por meio do teste de patogenicidade, foi possível detectar níveis diferentes de agressividade dos isolados, em frutos assim como em hipocótilos.
- e) Por meio da utilização da *gfp* evidenciou-se a capacidade de colonização de um isolado oriundo de sintomas de mancha menteigosa, em tecidos de hipocótilos de cafeeiro.
- f) Para todos os isolados de *C. gloeosporioides* foi possível a detecção de enzimas extracelulares, com exceção de celulases.
- g) Os isolados I-9 e I-24 apresentaram os maiores índices de produção de enzimas extracelulares, e assim como de EDPCs. Os mesmos obtiveram os maiores índices de intensidade de doença, sugerindo a relação entre estas e a agressividade dos isolados.
- h) A análise de AFLP revelou a formação de três grandes grupos, no qual evidenciou-se a separação entre os isolados proveniente de mancha manteigosa e aqueles oriundos de seca de ponteiro/antracnose.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista dos resultados obtidos, avanços no patossistemas *Colletotrichum* x Cafeeiro foram alcançados. Neste trabalho, fica evidente a relação entre *Colletotrichum gleosporioides* e a mancha manteigosa, assim como a existência de variantes do fitopatógeno, as quais aparentemente estão relacionadas aos diferentes sintomas observados na planta.

As características genético-fisiológicas demonstradas confirmam a variabilidade do patógeno sob ambos os aspectos, porém sempre evidenciando danos potenciais para o hospedeiro. Deve-se, portanto atribuir ao complexo *Colletotrichum* X Cafeeiro o papel de uma doença de importância primária para a cafeicultura.

Uma análise mais detalhada dos grupos formados pela análise de AFLP, em conjunto com averiguação de genes de virulência, poderá contribuir para a diferenciação dos patótipos de *C. gleosporioides* relacionado cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ.
Estatísticas. Disponível em: <www.abic.com.br/>. Acesso em 23 mai. 2013.
- ABREU, M. S.; FERREIRA, J. B.; MARTINS, F. G. Mancha manteigosa no contexto do complexo *Colletotrichum* em cafeeiros. In: Simpósio de manejo de plantas: manejo fitossanitário do cafeeiro, 8., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 105-126.
- ADURAMIGBA-MODUPE, A. O. et al. Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* in Nigeria using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 11,n. 33, p. 8189-8195, Apr. 2012.
- ALLCOCK, A. L. et al. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD V. H.; WATSON R. T. **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 57-88, 1995.
- ANAND, T. et al. Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *alternaria alternata* causing fruit rot of chillies. **Journal of Plant Protection Research**, Poznan-Warsaw, v. 48, n. 4, p. 437-451, Jan. 2008.
- ANCO, D.J. et al. Transformation of *Phomopsis viticola* with the green fluorescent protein. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 6, p. 853-858, Nov/Dec. 2009.
- ANDERSON, D. W.; NICHOLSON, R. L. Characterization of laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**, New York, v. 88, p. 996-1002, 1996.

ARMESTO, C. et al. Produção e regeneração de protoplastos de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes condições de cultivo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 4, p. 597-602, Jul/Ago. 2011.

ARRIEL, N.H.C. et al. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 801-809, 2006.

ASSIS, T.C. et al. Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates by using total proteins and esterase electrophoretic patterns and extracellular enzymes production. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, Jun. 2010.

ATKINS, S. D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, Polônia, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

BARBIERI, R.; CARVALHO, I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, p.79-83, Mai/Ago. 2001.

BEN-DANIEL, B.; BAR-ZVI, D.; TSROR, L. Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, n. 2, p.187-197, 2012.

BENALI, S. et al. Advances of Molecular Markers Application in Plant Pathology Research. **European Journal of Scientific Research**, Mahé, v. 50, p. 110-123, 2011.

BENEN J.A, et al. Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 453-465, 2008.

BEZUIDENHOUT, C.C.; PRINSLOO, M.; VAN DER WALT, A. M. Multiplex PCRbased detection of potencial fumonisin-producing *Fusarium* in traditional african vegetables. **Environmental Toxicology**, Alemanha, v. 21, n. 4, p. 360-366, 2006.

BIGS, J.; GEIDER, K. Moviment of *Erwinia amylovora* in host plants and bacterial sorbitol and sucrose metabolism assayed with the green fluorescent protein. In: _____. **New aspects of resistance research on cultivated plants: bacterial diseases**. Berlin: Springer Verlag, 1999. p. 55-57.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, p. 1-6, 2006.

BOTELHO, S. L.; BARROCAS E. N.; MACHADO, J. C. Uso da técnica de PCR na confirmação da presença de marcadores tipo GFP (*Green Fluorescent Protein*) em isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* transformadas. In: Congresso brasileiro de fitopatologia. 2010, Cuiabá. **Anais...** Sociedade Brasileira de Fitopatologia

BRIDGE, P., et al. On the unreliability of published DNA sequences. **New Phytologist**, Lancaster, v. 160, n. 1, p. 43-48, 2003.

BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 7, p. 664-669, 1997.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (eds.) Marcadores Moleculares. 2ª Edição UFV, Viçosa, 2009, p.11-93.

CAMPOS, J. I. 2005. **A importância do café nosso de todos os dias**. EMPRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em 23 mai. 2013.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systemics. In: PRUSKY D., FREEMAN S., DICKMAN B. (eds). ***Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction***. APS Press, Minnesota, p. 1–20, 2000.

CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. ***Studies in Mycology***, Amsterdam, v. 73, p. 181–213, 2012.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. ***Science***, New York, v. 263, n. 11, p. 802-805, Feb. 1994.

CHEN, Z.; LIANG, J. ; RODRIGUES JR.; C. J. *Colletotrichum gloeosporioides* can Overgrow *Colletotrichum kahawae* on Green Coffee Berries First Inoculated with *C. kahawae*. ***Biotechnology Letters***, Hoalanda, v.27, p. 679-682, 2005.

COLL, P. et al. Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycete *PM1* (CECT2971). ***Applied and Environmental Microbiology***, Washington, v. 59, n. 12, p. 4129-4135, 1993.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores da agropecuária**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 23 mai. 2013.

COUTO, E.F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. ***Fitopatologia Brasileira***, v. 29, p. 406-412, 2004.

COUTO, E.F.; MENEZES, M.; COELHO, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. ***Summa Phytopathologica***, Botucatu, v. 28, p. 260-266, 2002.

CULLEN, D.W. et al. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional PCR and real-time quantitative PCR. ***Plant Pathology***, London, v. 51, p. 281–92, 2002.

CZYMMEK, K. J.; BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. Fluorescent protein probes in fungi. In: _____. **Microbial imaging**. London: Elsevier, 2005. p. 27-41.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. – **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, p. 414–430, 2012.

DESHMUKH, A.J. et al. *In vitro* effect of various nitrogen, carbon sources and pH regimes on the growth and Sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc causing anthracnose of Indian bean. **Journal of Biopesticides**, India, v. 5, n. 46, p. 46-49, 2012.

DIAS, M. D. et al. . Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras , v. 29, n. 3, 2005 .

DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. E. Subcuticular-Intracellular Hemibiotrophic and Intercellular Necrotrophic Development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. **Phytopatology**, St. Paul, v. 95, n. 7, p. 751-758, Sept.2005.

EOM, S. et al. Development of a Rapid Molecular Detection Marker for *Colletotrichum* species with AFLP. **Mycobiology**, Korea, v. 32, n. 3, p. 123-127, Sep. 2004.

FEITOSA, M.I. et al. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, p. 33-54, 1977.

FERNANDO, T. H. P. S.; JAYASINGHE, C. K.; WIJESUNDERA, R. L. C. Cell wall degrading enzyme secretion by *Col brasili letotrichum acutatum*, the causative fungus of secondary leaf fall of *Hevea ensis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 2, p. 195-201, Feb. 2001.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 66 p.

FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: NECAF, 2004. 1 CD-ROM.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros e com sintomas da mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, jul./ago. 2009

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiro com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev., 2010

FREITAG, M. et al. *gfp* as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 10, p. 897-910, Oct. 2004.

FREITAS, R.L. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* E *C. boninense* associados à antracnose do café no Brasil. In: VII SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Araxá., **Anais...** Agosto: 2011

GREGORI, R. et al. Reduction of *Colletotrichum acutatum* infection by a polygalacturonase inhibitor protein extracted from Apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 309–313, 2008.

GUESTSKY, R. et al. Metabolism of epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides*. In: VI World Avocado Congress. 6., 2007, Viña del Mar – Chile. **Anais...IAS**, 2007. p. 98.

HANCOCK J.G.; MILLAR, R. L. Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern antracnose, spring black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfalfa. **Phytopathology**, St. Paul, v.55, p. 356-360, 1996.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, v.67, p.597-607, 1975.

HERBERT, C. et al. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 140-147, 2004.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use the green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 7, p. 743-749, Jul. 2002.

HYDE, K.D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Thailand, v. 39, p. 147-183, 2009.

HUBBALLI, M. et al. Virulence of *alternaria alternata* infecting noni associated with production of cell wall degrading enzymes. **Journal of Plant Protection Research**, Polônia, v. 51, n. 1, p. 1427-4345, Feb. 2011.

HUBBALLI, M. et al. Correlation between cell wall degrading enzyme production and incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* infecting noni (*Morinda citrifolia*). **Madras Agricultural Journal**, India, v. 99, n. 4/6, p. 363-367, 2012.

IDNURM, A. & HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, p. 241-255, 2001.

ISSHIKI, A. et al. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria lternata*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, p.749-757, 2001.

JAL, B.L.; SHARMA, P.; GOUR, H.N. Production of Enzymes and culture filtrates by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing banana fruit rot. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences - Biological Sciences**, India, v. 83, n.2, p. 177-180 Jun. 2013.

JULIATTI, F. C. et al. Agressividade e divergência genética por RAPD de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em lavouras cafeeiras de Minas gerais. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, p. 159-169, 2006.

KIKOT, G.E.; HOURS, R.A.; ALCONADA, T.M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. **Journal of Basic Microbiology**, Alemanha, v. 49, n. 3, p. 231-234, Jun. 2009.

KIRK, P.M. et al. **The Dictionary of the Fungi**, 10th edition. CABI Bioscience, UK. 2008.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, Berlim, v.9, p. 358-363, 2006.

KUMARA, K., RAWAL, R.. Influence of Carbon, Nitrogen, Temperature and PH on the Growth and Sporulation of Some Indian Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing Anthracnose Disease of Papaya (*Carrica papaya* L). **Tropical Agricultural Research and Extension**, Sri Lanka, v.11, Apr. 2010

LAGOPODI, A. L. et al. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 2, p. 172-179, Feb. 2002.

LAVIOLA, B.G et al . Alocação de fotoassimilados em folhas e frutos de cafeeiro cultivado em duas altitudes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, Nov. 2007 .

LEBEDA, A. et al. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions: review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.108, p.89-111, 2001.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 41, n. 3/4, p. 185-227, 2001.

LEVIN, L. et al. Screening of *Colletotrichum* (Ascomycota) isolates, causal agents of soybean Anthracnose, for laccase production. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botanica**, La Plata, v. 42, n. 1/2, p. 71-77, 2007.

LI, J. Y GOODWIN, P. H. Expression of *cgmpg2*, an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, in culture and during infection of *Malva pusilla*. **Journal of Phytopathology**, Maldem, v. 150, p. 213-219, 2002.

LI, K. Em Wood Deterioration and Preservation - Advances in our changing world. In: _____ ACS Symp. Ser 845, Goodell, B.; Nicholas, D. D.; Schultz, T. P., eds.; American Chemical Society: Washington, 2003, cap. 11.

LI, R. et al. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with Brassica napus: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 754-765, 2004.

LIN, S.Y. et al. *LAC2* encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 25, n. 12, p. 52-61, Dec. 2012.

LINS, S. R.; O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v.32, p.488-495, 2007.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 291-338, 2001.

LOUREIRO, S. E. et al. Viabilidade de conídios e blastósporos de *sporothrix insectorum* (hoog & evans) armazenados em diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.89-91, jan./mar., 2003.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. 2012. **Vegetal: Culturas - Café**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 23 mai. 2013.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “Conilon” (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Anais...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MARQUES, V.V. **Patogenicidade e variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2008. p. 108. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

MARTINEZ, G.M. et al. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 397-406, abril/junho, 2009.

MARTINO, E. et al. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express *EGFP* during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Suécia, v. 52, n. 2, p. 65–75, 2007.

MENEZES, M. Biological and taxonomic aspects of *Colletotrichum* species. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 27, p. 23-24, 2002.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Journal. **Analytical Chemistry**, Illinois, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLS, P. R., SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 98, p. 137-143, 1992.

NECHET, K. L; ABREU, M.; Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, p.1135-1142, 2002.

OIC – ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. 2013. **Estatística**. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em 23 mai. 2013.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

ONOFRE, S.B. et al. Amylolytic enzymes produced by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* in rice semi-solid fermentation. **Journal of Yeast and Fungal Research**, Bangkok, v. 2, n. 3, p. 28-32, Mar. 2011.

OROZCO, E. F. M. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

OROZCO, E. F. M. et al. 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. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002a. p. 59.

PARADELA FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: IAC, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

PARESQUI, L. et al. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Coffea arabica* L. In: III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3., 2003. Porto Seguro. **Anais...** Embrapa Café, 2003.

PASCHOLATTI, S.F. Fitopatogenos: Arzenal Enzimático. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed) **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. Piracicaba SP. Agronômica Ceres. p. 647-666. 2011.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D. **Biochemical Techniques for Filamentous Fungi**. IMI Technical Handbooks No. 1. CAB International: Wallingford. 1994.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005. 147 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

PEREIRA, I.S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* x Cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.1, p.117-123, 2009.

PFENNING, L.H., SALGADO, M.; LIMA, C.S. New concepts in the systematics of *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 32, p. 20-21, 2007.

PLIEGO, C. et al. *GFP* sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 137-145, 2009.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, Colorado, v. 155, p. 945–959, Jun. 2000.

PRUSKY, D. et al. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, n. 9, p. 105-113, Sep. 2001.

PRUSKY, D., LICHTER, A. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 268, p.1-8, 2007.

RAMOS, A.M., et al. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 27, n. 4, p. 186-90, Out-Dez. 2010.

REIGNAULT, P.; SANCHOLLE, M. Plant–pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? **Comptes rendus Biologies**, Paris, v. 328, n.9, p. 821-833 Set. 2005.

RODRIGUEZ-TOVAR, A.V.; Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, South Carolina, v. 63, n. 1, p. 45-54, 2005.

ROGERS, L.M. et al. Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p. 9813-9818, 2000.

RONCERO, M.I.G. et al. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la atogenicidad de *Fusarium oxysporum*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 17, p. 47-53, 2000.

SCHAFFER, W. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity, to plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 461–477, 1994.

SANTOS NETO, H. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mancha manteigosa**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, 2012.

SILVA, M.R. et al. Caracterização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro no Estado do Paraná Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (4. : 2005 : Londrina, PR). **Anais...** Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2005

SILVA-MANN, R. et al. AFLP markers differentiate *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 30, p. 169-172, 2005.

SOANES, D. M., et al. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p.1, Jun. 2008.

SUKNO, S. A. et al. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 74, n. 3, p. 823-832, Feb. 2008.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 45, p. 650-655, 1996.

STANGARLIN, J.L.; LEITE, B. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. IN: PASCOLLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.L. (ed) **Interação Planta-Patogeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ. p. 115-150, 2008.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: BAILEY, J. A.; JEGUER, M. J. (Eds.). ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. England: CBA, p. 1-26, 1992.

THOMMA, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. ***Molecular Plant Pathology***, St. Paul, v.4, p.225-236, 2003.

TORRES, C.P. Produção in vitro de pectinasas por *Colletotrichum acutatum*. ***Acta Agronomica***, Palmira, v. 59, n. 1, p. 80-90, Jan. 2010.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. ***Annual Review of Biochemistry***, Palo Alto, v. 67, p. 509-544, Nov. 1998.

VALETTE-COLLET, O. et al. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase *Bcpme1* gene reduces virulence on several host plants. ***Molecular Plant Microbe Interactions***, St. Paul, v. 16, p. 360–367, 2003.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. ***Biochemistry***, Moscow, v. 69, n. 1, p. 1305-1309, Nov. 2004.

VARZEA, V.M.P. **Variabilidade em *Colletotrichum* spp. de cafeeiro. Pesquisa de Fontes de resistência ao *C. Kahawae***. 1995. 128 p. Dissertação (Investigador auxiliar) – Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, 1995.

VASCONCELOS, W.E. et al. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. ***Revista de Biotecnologia e Ciência da Terra***, v. 3, p. 18, 2003.

VOS, P.R. et al. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. ***Nucleic Acids Research***, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line?. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 201, p. 1-7, 2001.

WELSH, S.; KAY, S. A. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. **Current Biology in Biotechnology**, London, v. 8, n. 5, p. 617-622, Oct. 1997.

YAKOBY, N. et al. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 1026-1030, 2000.

YAKOBY, N. et al. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul. v. 14, p. 988-995, 2001.