



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,
MOLECULAR, BIOQUÍMICA E
PATOGENICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS AO
CAFEIEIRO EM MINAS GERAIS E
COMPARAÇÃO COM *Colletotrichum kahawae***

EDIN FRANCISCO OROZCO MIRANDA

2003

56301

047923

EDIN FRANCISCO OROZCO MIRANDA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR,
BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS AO CAFEIEIRO EM
MINAS GERAIS E COMPARAÇÃO COM
*Colletotrichum kahawae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado em
Agronomia, área de concentração em Fitopatologia,
para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Mario Sobral de Abreu

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

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

Orozco Miranda, Edin Francisco

Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae* / Edin Francisco Orozco Miranda. -- Lavras : UFLA, 2003.

147 p. : il.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Antracnose. 3. Mancha manteigosa. 4. *Colletotrichum* spp. 5. Caracterização 6. *Colletotrichum kahawae*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

EDIN FRANCISCO OROZCO MIRANDA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR,
BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS AO CAFEIEIRO EM
MINAS GERAIS E COMPARAÇÃO COM
*Colletotrichum kahawae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado
em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 2 de julho de 2003

Pesquisadora Dra. Ana Isabel Faria Ribeiro

CIFC

Prof. Dr. Rubens José Guimarães

UFLA

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA



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

LAVRAS, MINAS GERAIS – BRASIL

A meus pais, Pedro Rafael Orozco Navarro e Susana Miranda Fuentes, pelo apoio e amor.

Aos meus irmãos e família em geral, por todos os pensamentos positivos.

À minha filha, Diana Elizabeth, porque tem sido algo especial na minha vida.

DEDICO ESTA TESE

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guardar e guiar minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e aos professores do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade para realizar o doutorado.

Ao Conselho Superior Universitário da “Universidad de San Carlos de Guatemala”, por todo o apoio recebido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao pessoal da Embaixada do Brasil na Guatemala, em especial à senhora Dorinha de Soto, pela amizade e atenções.

Ao Dr. Antônio de Pádua Nacif, Gerente Geral da EMBRAPA/CAFÉ, pelo financiamento de parte do trabalho realizado em Portugal.

Ao Dr. Hilário Antônio de Castro, Diretor da FAEPE, pela ajuda na realização desta pesquisa.

Ao Pessoal do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro de Oeiras, Portugal, pela oportunidade e orientação nas pesquisas realizadas. Especialmente a Carlos J. Rodrigues Júnior, Ana Ribeiro, Vitor Várzea e Maria do Céu Silva.

Ao professor e amigo Dr. Mario Sobral de Abreu, pela orientação e apoio.

Aos doutores Rubens José Guimarães, Ana Isabel Faria Ribeiro, Mário Lúcio Vilela de Resende e Eduardo Alves, pelas sugestões e aceitar participar na banca de defesa de tese.

Aos estagiários que acompanharam as minhas pesquisas.

Ao professor Dr. João Bosco dos Santos e Lamartine da Nobrega Filho, pesquisadores do Departamento de Biologia, pela ajuda e treinamento na parte molecular.

Aos professores e amigos da FAUSAC que me apoiaram.

Aos professores e amigos da Universidade de Brasília que formaram as bases da minha profissão como fitopatologista.

Aos colegas e amigos do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Aos amigos Marcos Freitas, Hebert Cavalcante, Euclides Reuter, Cristiano Lima, Victor Tebaldi, Maria Eloísa Salustiano e Gilvânia Mello Alves, pela convivência, amizade e pelo incentivo nos momentos mais difíceis.

À família Alfaro Morales, em especial a Lilian Alfaro.

Aos doutores Lauriano Figueroa Quiñonez e Jorge Mário Ruano R., pela amizade e incentivo.

A todas aquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização dos meus estudos e do presente trabalho. Meu sincero agradecimento e reconhecimento.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Histórico, ocorrência e distribuição de <i>Colletotrichum</i> spp. em café	2
2.2 Taxonomia de <i>Colletotrichum</i> spp. associado a café	3
2.3 Doenças ocasionadas por <i>Colletotrichum</i> spp. em café e sintomas	5
2.4 Estudos de patogenicidade de <i>Colletotrichum</i> spp.	7
2.5 Estudos moleculares de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em café	8
2.6 Estudos bioquímicos de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em café	9
2.7 Estudos de morfologia de <i>Colletotrichum</i> spp. associado a café	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO 2 Características morfológicas de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro no estado de Minas Gerais e comparação com <i>C. kahawae</i>	17
1 RESUMO	17
2 ABSTRACT	18
3 INTRODUÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Obtenção de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. de café	20
4.2 Obtenção de culturas monospóricas	20
4.3 Estudos sobre as características culturais e morfológicas dos isolados ..	22
4.4 Crescimento médio diário das colônias a várias temperaturas	22
4.5 Coloração das colônias	23
4.6 Dimensão dos conídios	23
4.7 Esporulação e germinação de conídios e formação de septos.....	23
4.8 Observação de acérvulos, setas e peritécios	24
4.9 Morfologia de apressórios	24
4.10 Análise estatística	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Crescimento micelial diário a várias temperaturas.....	25
5.2 Dimensões e forma dos conídios.....	28
5.3 Efeito da temperatura na esporulação e germinação de conídios	33
5.4 Coloração das colônias	37
5.5 Presença de acérvulos, setas e peritécios	38

5.6 Formação e morfologia de apressórios	41
6 CONCLUSÕES	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

CAPÍTULO 3 Determinação da resistência de cultivares de café e evidenciação de raças fisiológicas no patossistema café x <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , no estado de Minas Gerais	47
---	----

1 RESUMO	47
2 ABSTRACT	48
3 INTRODUÇÃO	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Isolados do fungo	50
4.2 Cultivares de café	51
4.3 Produção dos hipocótilos	51
4.4 Inoculação de hipocótilos e delineamento experimental	51
4.5 Avaliação de hipocótilos, intensidade da doença e susceptibilidade	52
4.6 Determinação da potogenicidade por meio de cortes histopatológicos ..	53
4.7 Análise estatística	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Sintomas e incidência da doença	55
5.2 Classes de suscetibilidade por meio do índice de intensidade de doença	59
5.3 Incidência de <i>Colletotrichum</i> spp. em plântulas assintomáticas de café	61
5.4 Cortes histopatológicos e patogenicidade de <i>Colletotrichum</i> spp. em café	66
6 CONCLUSÕES	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

CAPÍTULO 4 Patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>C. kahawae</i> em frutos de café	71
--	----

1 RESUMO	71
2 ABSTRACT	72
3 INTRODUÇÃO	73
4 MATERIAL E MÉTODOS	74
4.1 Isolados do fungo	74
4.2 Cultivares de café	74
4.3 Inóculo do fungo	74
4.4 Inoculação de frutos verdes destacados	76
4.5 Análise estatística	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78

5.1 Patogenicidade observada no ensaio realizado na UFLA/2002	78
5.2 Patogenicidade e sintomas observados no ensaio realizado no CIFC/2003	81
6 CONCLUSÕES	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

CAPÍTULO 5 Incidência de <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos maduros, endocarpo, sementes e sua transmissão pelas sementes de café	88
---	----

1 RESUMO	88
2 ABSTRACT	89
3 INTRODUÇÃO	90
4 MATERIAL E MÉTODOS	91
4.1 Genótipos de café e origem	91
4.2 Determinação da incidência de <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos	91
4.3 Determinação da incidência no endocarpo e semente	91
4.4 Determinação da transmissão de <i>Colletotrichum</i> spp. em sementes	92
4.5 Análise estatística	92
5 RESULTADOS	93
5.1 Incidência de <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos	93
5.2 Incidência de <i>Colletotrichum</i> spp. no endocarpo e sementes	94
5.3 Transmissão de <i>Colletotrichum</i> spp. em sementes	98
6 CONCLUSÕES	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

CAPÍTULO 6 Caracterização bioquímica de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro no estado de Minas Gerais	101
--	-----

1 RESUMO	101
2 ABSTRACT	102
3 INTRODUÇÃO	103
4 MATERIAL E MÉTODOS	104
4.1 Teste de tartarato de amônio e ácido cítrico	104
4.2 pH do meio líquido de crescimento dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	104
5 RESULTADOS	106
5.1 Teste de tartarato de amônio e ácido cítrico	106
5.2 pH do meio líquido de crescimento dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	108
6 CONCLUSÕES	110
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

CAPÍTULO 7 Caracterização molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Colletotrichum kahawae</i> obtidos de cafeeiro, por meio de marcadores RAPD e SSR	113
1 RESUMO	113
2 ABSTRACT	114
3 INTRODUÇÃO	115
4 MATERIAL E MÉTODOS	118
4.1 Isolados estudados e culturas utilizadas	118
4.2 Preparação dos isolados e extração de DNA	118
4.3 "Primers" para RAPD	120
4.4 "Primers" para SSR	120
4.5 PCR e eletroforese	120
4.6 Número total de bandas, polimorfismo, bandas exclusivas e poder de resolução dos "primers"	121
4.7 Análise fenética	121
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
5.1 Amplificação por RAPD	123
5.2 Análise fenética dos RAPD	127
5.3 Amplificação por SSR	129
5.4 Análise fenética de SSR	130
5.5 Análise conjunta dos dados de marcadores RAPD e SSR	132
6 CONCLUSÕES	136
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
CONSIDERAÇÕES FINAIS	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146

RESUMO

OROZCO MIRANDA, E. F. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Lavras: UFLA, 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração Fitopatologia¹).

Foram estudados os aspectos físicos de colônia, o crescimento micelial e dimensões de conídios de 35 isolados de *Colletotrichum* spp. na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais (MG), Brasil. Comparações de alguns caracteres com *C. kahawae* foram realizadas no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal. Houve variações das características morfológicas e reprodutivas. As dimensões de conídios e coloração da colônia de alguns isolados de MG foram semelhantes aos de *C. kahawae*. Uso de todos os caracteres morfológicos de forma conjunta permitiram a separação de espécies. A presença de raças fisiológicas foi testada na UFLA por meio de inoculações de suspensões de conídios do fungo em hipocótilos de café. Foram determinados isolados patogênicos e não patogênicos, assim como necrose e morte de plântulas. Estudos histopatológicos realizados no CIFC determinaram a colonização de tecidos dos hipocótilos. O fungo foi reisolado em plântulas assintomáticas. A patogenicidade dos isolados foi realizada em frutos verdes de café em MG e com alguns isolados de CBD no CIFC. Porcentagens de frutos necrosados e tempo de aparecimento de sintomas foram variáveis de acordo com os isolados e cultivares. A caracterização bioquímica consistiu em testar o uso de citrato (C) ou tartarato (T) como fontes de carbono. Ainda, foi analisado o pH do meio líquido de crescimento dos isolados no CIFC. Conclui-se que os isolados caracterizados de MG metabolizaram tartarato como única fonte de carbono, portanto, não pertencem a *C. kahawae*. Foi encontrada variação entre valores de pH. Utilizaram-se marcadores RAPD e SSR para determinar a variabilidade genética e o parentesco entre os isolados de MG e alguns isolados que ocasionam a CBD. Ambas as técnicas permitiram a separação clara dos isolados de MG e aqueles que ocasionam a CBD. Os isolados de MG testados não pertencem a *C. kahawae*. Com base nas características morfológicas, patogênicas, bioquímicas e moleculares, conclui-se que os isolados de *Colletotrichum* spp. de MG, Brasil, caracterizados, pertencem às espécies *C. acutatum* (isolados 5, 7 e 17) e *C. gloeosporioides* (restantes isolados).

¹Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu -UFLA (Orientador)

Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)

Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)

Mário Lúcio Vilela de Resende-UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

OROZCO MIRANDA, E. F. Morphological, molecular, biochemical and pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. associated with the coffee tree in Minas Gerais and comparison with *Colletotrichum kahawae*. Lavras: UFLA, 2003. 147 p. Thesis (Doctorate in Agronomy, Major Phytopathology¹).

Physical aspects of the colony, mycelial growth and dimensions of conidia of 35 isolates of *Colletotrichum* spp. were studied at the “Universidade Federal de Lavras”, MG, Brazil. Comparisons of some characters of *C. kahawae* were performed at “Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC)”, Oeiras, Portugal. There were some variations of the morphological and reproductive characteristics. Sizes of conidia and colony coloration of some isolates of MG were similar to those of *C. kahawae*. The use of all morphological characters allowed the separating of species. The presence of physiological races was tested at UFLA, inoculating suspensions of conidia on hypocotyls of coffee plantlets. Pathogenic and non pathogenic isolates were detected, as well as necrosis and death of seedlings. Hystopathologic studies accomplished in CIFC demonstrated colonization of hypocotyl tissues. The fungus was re-isolated in symptomless plantlets. The pathogenicity of isolates was also carried on unripe coffee berries. Inoculation and comparison of symptoms induced by Brazilian isolates and those isolates causing CBD were performed at CIFC. Necrosis of fruits and time of appearance of symptoms were variable according to isolates and cultivars. The biochemical characterization consisted in testing the use of citrate (C) or tartarate (T), as the only source of carbon. Further, the pH of the liquid growth medium was analyzed at CIFC. It was concluded that isolates from MG used T and C, therefore, they don't belong to *C. kahawae*. Variation was found among pH values. RAPD and SSR techniques were utilized to determine the genetic variability and the relationship among the isolates from MG and those which cause CBD. Both techniques enabled the clear separation amongst the MG isolates and the ones which cause CBD. Brazilian isolates tested do not belong to *C. kahawae*. Based on morphological, pathogenic, biochemical and molecular characteristics, it was concluded that isolates of *Colletotrichum* spp. from MG, belong to the species *C. acutatum* (isolates 5, 7 e 17) and to *C. gloeosporioides*, the others.

¹Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu (Adviser)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-adviser)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-adviser)
Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser)

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ocorrência de espécies de *Colletotrichum* tem sido freqüentemente relatada nas regiões cafeeiras brasileiras (Bitancourt, 1958; Figueiredo & Mariotto, 1978; Alves & Castro, 1998). As principais doenças ocasionadas por esse fungo em cafeeiro citadas no mundo são: antracnose em frutos, folhas e ramos, mancha manteigosa e a CBD (Noak, 1902; Mc Donald, 1926; Nutman & Roberts, 1969a, c; Vargas & Gonzalez, 1972; Rodrigues et al., 1991; Waller et al., 1993; Orozco et al., 2002b,d), associado e transmitido pelas sementes (Orozco et al., 2002b,c).

Estudos de morfologia de *Colletotrichum* spp. têm sido utilizados para critérios de identificação das espécies e conhecer a variabilidade genética do fungo (Gibbs, 1969; Hindorf, 1970; Feitosa 1977; Sutton, 1980; Waller et al., 1993; Várzea, 1995). Mas, para maior confiabilidade dos resultados, critérios de caracterização molecular são importantes na taxonomia de espécies e estão sendo recomendados na atualidade (Cannon, 2003). Entretanto, poucos são os estudos moleculares publicados para este fungo e cultura (Sreenivasaprasad et al., 1993; Beynon et al., 1995; Silva et al., 1998; Rocheta et al., 1999; Nechet, 1999).

O teste de patogenicidade dos isolados é realizado normalmente em frutos verdes de café e o teste da resistência genética das cultivares com a inoculação de hipocótilos com suspensões de esporos do fungo (van der Vossen et al., 1976; Waller et al., 1993; Várzea, 1995)

Nesta pesquisa o objetivo foi realizar a caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com algumas características de isolados de *Colletotrichum kahawae*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico, ocorrência e distribuição de *Colletotrichum* spp. em café

Vários nomes têm sido dados às doenças ocasionadas por *Colletotrichum* spp.: antracnose do cafeeiro, queima castanha “brown blight”, “die-back”, “elon die-back” e CBD (“coffee berry disease”).

A CBD ocasiona os maiores problemas no Quênia e outros países da África. Esta foi assinalada no Congo Belga, em 1938; Angola, 1950; Camerão, 1958 e Uganda, em 1959 (Nutman & Roberts, 1964; Hocking, 1967; Gibbs, 1969; Wallis & Firman, 1967; Vermeulen, 1979; Chalfoun, 1997). O primeiro relato desta doença foi feito por Mc Donald, em 1922, no Quênia. O agente causal foi identificado pelo mesmo autor, em 1923, como sendo o fungo *Colletotrichum coffeanum* Noack, causando consideráveis prejuízos, atacando frutos de cafeeiro em diferentes etapas de amadurecimento. Segundo Waller et al. (1993) Chalfoun (1997) e Silva et al. (1998), não se conhece nenhum relato da CBD confirmado no continente americano.

Na América, *Colletotrichum* spp. associado a café provoca a antracnose em folhas, frutos, mancha manteigosa e seca de ponteiros, entre outros (Schieber et al., 1970; Almeida et al., 1979; Dorizzotto e Abreu, 1993a; Alves e Castro, 1998; Nechet, 1999) há também citações de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (Bitancourt, 1958; Figueiredo & Mariotto, 1978; Sutton, 1980). Na Colômbia, *Colletotrichum* spp. tem sido isolado em brotos, folhas, frutos e plantas de café em diferentes estágios de desenvolvimento (Fernández, 1961). Wellman (1957) relatou a doença “blister spot” como sendo provocada por vírus na Costa Rica, mas Vargas & Gonzalez (1972) demonstraram ser ocasionada por *Colletotrichum*. Na América Central, uma doença denominada “coffee berry necrosis”, provocada por *Colletotrichum* spp., foi relatada em 1963 (Schieber et al., 1970). Infecção latente e incidência variável de *Colletotrichum* spp.,

dependendo do órgão da planta, já foram relatadas em café (Rayner, 1948). Ocorre também como endofítico (Orozco et al., 2002c, d; Paresqui et al., 2003) e transmitido pela semente (Orozco et al., 2002a, c).

2.2 Taxonomia de *Colletotrichum* spp. associado a café

A taxonomia de *Colletotrichum* associado à cultura de café relativa à espécie tem sido confusa. Desde seu primeiro relato no Brasil, foi classificado como *Colletotrichum coffeanum*, por Noack, em 1901. Esta designação foi utilizada por mais de 70 anos, para todos os isolados de *Colletotrichum* associados ao cafeeiro.

Várias propostas de classificação para os isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro têm sido apresentadas ao longo dos anos. Rayner (1948, 1952) designou os isolados que ocasionam a CBD como *C. coffeanum* “var. *virulans*”, tendo por base características morfológicas, como a coloração cinzenta esverdeada do micélio dos isolados. Gibbs (1969) definiu 4 formas de *Colletotrichum* por meio de características da colônia a partir de culturas monospóricas em meio malte ágar: a CBD (= *C. coffeanum* var. *virulans*, *sensu* Rayner 1948); ccp (= *C. coffeanum*, “pink”); ccm (= *C. coffeanum*, “mycelial form”) e cca (= *C. coffeanum*, “acervuli form”). Também menciona que, de acordo com essas características, é possível distinguir a raça que ocasiona a CBD de outra não patogênica.

Hindorf (1970) realizou estudos morfológicos detalhados em isolados de *Colletotrichum*. Alguns isolados são classificados por Hindorf como *Colletotrichum coffeanum* Noack (*sensu stricto*) (= CBD “var. *virulans*” de Rayner, = CBD de Gibbs); *C. acutatum* Simmons (= ccp); *C. gloeosporioides* Penz. “white mycelium form” (=cca); *C. gloeosporioides* “greenish mycelium form” com seu teleomorfo *Glomerella cingulata*. Hindorf (1970) descreve as características morfológicas para separar *Colletotrichum coffeanum* (*sensu*

stricto) = CBD em meio MEA e menciona que a forma teleomórfica nesta espécie não foi observada. Assim, a designação de *C. coffeanum* para a forma patogênica dos frutos verdes foi mantida para essa época.

A classificação atual utilizada pela maioria de pesquisadores contempla a proposta de Waller et al. (1993). A proposta está baseada em características patogênicas, metabólicas e culturais de isolados frescos de *Colletotrichum*. Eles propõem a mudança do nome de *C. coffeanum sensu* Hindorf para *Colletotrichum kahawae* J. M. Waller e P.D. Bridge, sp. nov.

As características consideradas para *C. kahawae*, por Waller et al. (1993), são resumidas da seguinte forma. A partir de culturas monospóricas do fungo, observam-se crescimento micelial lento (2-4 mm d⁻¹ a 25°C) em meio MEA 2%, abundante micélio de coloração cinzento-esverdeado-azeitona a esverdeado-escuro, sem produção de acérvulos e esporulação em hifas simples. No metabolismo, isolados desta espécie não podem utilizar citrato ou tartarato como únicas fontes de carbono. Esta espécie é patogênica em frutos verdes no estado de expansão e em hipocótilos de *Coffea arabica* cv. SL28 e outras cultivares susceptíveis, causando lesões em depressão, típicas de antracnose.

Para a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, nas mesmas condições, o crescimento é rápido (3-6 mm d⁻¹ a 25°C), micélio branco a cinzento claro, esporulação em acérvulos ou hifas simples. Pode utilizar tartarato, citrato ou ambos como únicas fontes de carbono. Os isolados desta espécie não são patogênicos em frutos verdes em expansão ou hipocótilos.

A proposta tem sido utilizada, mas as características contempladas para caracterizar esta espécie continuam a apresentar limitações para diferenciar os isolados de *C. kahawae* de isolados de *C. gloeosporioides* (Várzea, 1995; Orozco et al. 2002d).

Em âmbito subespecífico, Rodrigues et al. (1992) e Várzea (1995) relatam a existência de raças em isolados de *C. kahawae*.

2.3 Doenças ocasionadas por *Colletotrichum* spp. em café e sintomas

As principais doenças que afetam a produtividade do café no mundo são de origem fúngica. Na África, *C. kahawae* ocasiona a CBD, ataca frutos verdes em desenvolvimento e é o principal fator limitante à produção (Mc Donald, 1926; Gibbs, 1969; Nutman & Roberts, 1969b,c; van der Graaff, 1978; Waller et al., 1993; Chalfoun, 1997).

Nos países da América, *Colletotrichum* spp. tem sido associado a sintomas de antracnose em folhas, frutos, mancha manteigosa e seca de ponteiros. Na maioria das publicações, o agente etiológico é relatado como *Colletotrichum* spp. (Schieber et al., 1970; Almeida et al., 1979; Alves & Castro, 1998; Nechet, 1999; Orozco et al., 2002b, c) *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (Bitancourt, 1958; Figueiredo e Mariotto, 1978; Sutton, 1980; Dorizzotto & Abreu, 1993a, b).

A antracnose nas folhas do cafeeiro apresenta-se como manchas irregulares, grandes, coloração castanha e castanho-acinzentada, ocorrendo comumente nas margens das folhas. Estruturas da fase anamórfica e teleomórfica têm sido observadas em folhas doentes (Hindorf, 1975). Este autor descreve sintomas de “die back” no Quênia, como queima das folhas próximas à extremidade dos ramos secundários, com posterior morte e queda. Em seguida, os internódios verdes dos ramos novos tornam-se necróticos. Gutierrez (1954) descreve a incidência de “die back” e infecções foliares ocasionadas por *Colletotrichum coffeanum*.

O ataque do fungo sobre as folhas novas da ponta dos ramos pode causar o “elon die-back”, caracterizado pela abscisão das folhas. Em seguida, a lesão progride em direção ao tecido vascular, ocorre murcha repentina, colapso

do ramo e morte do ponteiro. A fase teleomórfica pode ser encontrada (Chalfoun, 1997; Nutman & Roberts, 1969c).

O termo queima castanha “brown blight” é usado no leste africano para designar as plantas atacadas por *Colletotrichum*, em áreas não infectadas por CBD. Suas características são lesões escuras, deprimidas em frutos maduros ou em processo de maturação, sendo incapaz de atacar frutos verdes; em alguns casos, é observada a fase teleomórfica (Hocking, 1966).

A doença da mancha manteigosa foi descrita pela primeira vez sobre *C. arabica* na Costa Rica por Wellman (1957), como sendo ocasionada por um vírus, mas Vargas & Gonzalez (1972) demonstraram ser ocasionada por *Colletotrichum*. No Brasil, Bitancourt (1958) observou essa doença em 1938, em folhas de café, em São Paulo e a denominou “Mancha de óleo ou pinta redonda clara”. Segundo Mansk & Matiello (1977), no Espírito Santo, em café da variedade Conillon, o fungo ocasiona ataques intensos em folhas, frutos e ramos.

Bitancourt (1958) e Mansk & Matiello (1977) descrevem que nas folhas novas aparecem, inicialmente, manchas de cor verde-claro, com aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. No estágio mais avançado, as manchas apresentam lesões menores, com 2 a 3 mm de diâmetro, deprimidas, necróticas, cor marrom-claro e bordas irregulares. Finalmente, as manchas apresentam o centro necrótico e se coalescem, causando a queda prematura das folhas. As brotações novas que surgem são novamente atacadas, ocorrendo a morte prematura das plantas. Os mesmos autores indicam que nos ramos e frutos aparecem lesões menores, com 2 a 3 mm de diâmetro, deprimidos, necróticos, cor marrom-claro e bordas irregulares. Os ataques mais intensos são observados nas folhas e ramos novos em plantas adultas, durante a fase de maior vegetação. A doença é relatada para *C. canephora* ou variedades produto de um cruzamento entre essa espécie e *C. arabica* e que são portadoras de fatores para susceptibilidade genética (Vargas & Gonzalez, 1972; Mansk &

Matiello, 1977). Dorizzotto & Abreu (1993a) relataram esta doença no município de Cristais, MG, ocasionada por *C. coffeanum* Noak e o isolado apresenta algumas características morfológicas semelhantes às de *C. kahawae in vitro*.

A CBD é ocasionada por *C. kahawae* J. M. Waller e P. D. Bridge, sp. nov. (1993). Mc Donald (1926) descreve originalmente os sintomas dessa doença referindo-se ao ataque a frutos verdes, ocasionando manchas deprimidas e escuras. As manchas pequenas pretas que aparecem aumentam de tamanho, eventualmente cobrindo todo o fruto. Esta doença é considerada o principal fator limitante da produção de café arábica nos países africanos. No Quênia têm sido referidas reduções entre 50% a 80% na produtividade e a umidade prolongada e temperaturas baixas favorecem o desenvolvimento de epidemias (Griffiths et al., 1971; Vermeulen, 1979). A raça do patógeno que ocasiona a CBD infecta flores, frutos verdes e maduros do café (Gibbs, 1969; Nutman & Roberts, 1964; Mulinge, 1970; Vermeulen; 1979). Nutman & Roberts (1964) mencionam que, em ataques severos, a maior parte das cerejas é mumificada, porém, não caem e observam-se acérvulos com massa de esporos de coloração rósea pálido.

2.4 Estudos de patogenicidade de *Colletotrichum* spp.

Waller et al. (1993) caracterizam a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. de acordo com a porcentagem de infecção em hipocótilos de café. Segundo estes autores, isolados do fungo são considerados patogênicos quando mais de 25% das plântulas são mortas. Na prática, isolados patogênicos típicos invariavelmente causam a morte de mais do 30% das plântulas, enquanto que isolados não patogênicos não apresentam nenhum efeito. No Brasil, Feitosa et al. (1977) estudaram isolados de *C. gloeosporioides* e obtiveram baixa virulência. Orozco et al. (2002d) realizaram testes de resistência em hipocótilos de café e mencionam a existência de relações compatíveis e incompatíveis no patossistema *Colletotrichum* x café. Foi determinada colonização sistêmica do

fungo nos tecidos das plantas sem manifestação de sintomas nas relações não compatíveis. Dorizzotto & Abreu (1993b) estudaram a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em plântulas e frutos verdes de café em progênies de cafeeiro originadas do híbrido do Timor, concluindo que todos os genótipos foram suscetíveis ao patógeno. Silva et al. (1998) estudaram a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. em mudas de cafeeiro, concluindo que as cultivares Mundo Novo e Catuai Vermelho foram suscetíveis a determinados isolados. Contudo, no Brasil, existem pesquisadores que ostentam o pensamento de que *Colletotrichum* sp. é um fungo endofítico oportunista que se manifesta em condições de estresse (Paresqui et al., 2003).

A patogenicidade de isolados *C. kahawae* tem sido realizada com inoculações de esporos do patógeno em frutos verdes (Várzea, 1995; Várzea et al., 2002). Essa metodologia tem sido adaptada para o mesmo objetivo com isolados de *Colletotrichum* spp. por outros pesquisadores, nos quais tem se demonstrado a patogenicidade de alguns isolados do fungo (Vargas & Gonzalez, 1972; Almeida, et al. 1979; Dorizzotto & Abreu 1993b; Nechet & Abreu, 2002).

2.5 Estudos moleculares de isolados de *Colletotrichum* spp. em café

Na atualidade, a taxonomia e diagnose de espécies de *Colletotrichum* spp. estão sendo recomendadas por meio de técnicas moleculares (Cannon, 2003). Para este fungo e cultura em particular, existem poucos estudos. Sreenivasaprasad et al. (1993) utilizaram as técnicas RFLP de DNA ribossomal e mitocondrial, RAPD e seqüenciamento da variável ITS (Internally Transcribed Spacer) para elucidar a variação molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de diferentes espécies vegetais. Estes autores concluíram que ambas as técnicas permitiram o agrupamento de isolados de *C. kahawae* e a diferenciação dos isolados de *C. gloeosporioides*. Segundo Rocheta et al. (1999), a utilização de SSR e RAPD permitiu a diferenciação intra e interespecífica de

Colletotrichum spp. Utilizando RFLPs, Beynon et al. (1995) estudaram a variação genética entre 25 isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes de diferentes locais da África, concluindo não ter sido detectado polimorfismo entre esses isolados. Porém, a técnica permitiu a separação de isolados de *C. kahawae* dos isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

No Brasil, Nechet (1999) estudou a variabilidade de isolados de *Colletotrichum* spp. com análise eletroforética de isoenzimas, tendo concluído que com essa técnica foi possível diferenciar os isolados. Silva et al. (1998) estudaram as características genéticas de isolados de *Colletotrichum* spp. com RAPD e, com base nos polimorfismos detectados, concluíram que existem vários patótipos infectando as lavouras de café nessa região.

2.6 Estudos bioquímicos de isolados de *Colletotrichum* spp. em café

A habilidade dos fungos filamentosos para utilizar determinados compostos como únicas fontes de carbono tem sido utilizada pelos pesquisadores com diferentes objetivos. Paterson & Bridge (1994) mencionam que a assimilação de carbono é realizada preparando-se um meio base, ao qual é incorporada a fonte de carbono de interesse. A assimilação é usualmente determinada qualitativamente pela observação visual do crescimento em meio líquido ou quantitativamente pela determinação do peso seco do fungo.

Em relação às características bioquímicas de isolados de *Colletotrichum* spp., menciona-se que *C. kahawae* não pode utilizar citrato ou tartarato como únicas fontes de carbono (Waller et al., 1993), embora outras espécies possam (Waller et al., 1993; Paterson & Bridge, 1994; Várzea, 1995).

Várzea (1995) estudou o pH final do meio líquido de crescimento de isolados de *Colletotrichum* spp., tendo encontrado grande variabilidade de valores de pH entre os diferentes isolados estudados. Contudo, observou que

isolados de *C. kahawae* tendem acidificar o meio líquido. A partir deste resultado, o autor sugere que essa característica seja mais explorada.

2.7 Estudos de morfologia de *Colletotrichum* spp. associado a café

A caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro é o campo mais explorado devido ser um método clássico. Os pesquisadores têm orientado suas pesquisas com fins taxonômicos (Gibbs, 1969; Hindorf, 1970; Waller et al., 1993; Sutton, 1980) e para conhecer a variabilidade e biologia do patógeno (Dorizzotto & Abreu, 1993a; Nechet, 1999; Várzea, 1995; Feitosa 1977; Sutton, 1992; Martínez & Zambrano, 1994; Dias, 2002).

As características morfológicas normalmente utilizadas para a determinação de espécies de *Colletotrichum* são as características da colônia, crescimento micelial, dimensões e forma de conídios, forma de apressórios, presença ou ausência de setas, formação de esclerócios (Gibbs, 1969; Hindorf, 1970; Waller et al., 1993; Sutton, 1980; Sutton, 1992).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. R.; MANSK, Z.; MATIELLO, J. B.; MULLER, R. A. Observações preliminares sobre queda de frutos sob suspeita de ataque por *Colletotrichum* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá-MG. Resumos... Araxá: IBC/GERCA, 1979. p. 323-326.

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

BEYNON, S. M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, B. G.; VÁRZEA, V. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 46, n. 6, p. 457-476, June 1995.

BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. *O biológico*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 191-201, abr. 1958.

CANNON, P. F. Definition and diagnosis of *Colletotrichum* species. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, New Zeland. Abstract... New Zeland: Australiasian Plant Pathology, 2003.

CHALFOUN, S. M. Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93 p.

DIAS, M. D. Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum coffeanum* NOAK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, ago. 1993a. Resumo. Suplemento.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOAK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, ago. 1993b. Resumo. Suplemento.

FEITOSA, M. I. et al. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33-54, 1977.

FERNÁNDEZ, O. Muerte descendente de los brotes del cafeto causada por espécies de *Phoma* e *Colletotrichum*. **Cenicafe**, Chinchila, v. 12, n. 3, 1961.

FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P. R. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **O Biológico**, São Paulo, v. 54, p. 25-26, 1978.

GIBBS, J. N. Inoculum sources for coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, London, v. 64, n. 3, p. 515-522, Apr. 1969.

GRIFFITHS, E.; GIBBS, J. N.; WALLER J. M. Control of coffee berry disease. **Annals Applied Biology**, London, v. 67, n. 1, p. 45-74, Jan. 1971.

GUTIERREZ, L. H. Muerte descendente causada por *Colletotrichum* en las plantas de café en el almacigo y su combate por medio de aspersiones en Turrialba, Costa Rica. **Turrialba**, San José, v. 4, n. 3, p. 43-56, jul./set. 1954.

HINDORF, H. *Colletotrichum* spp. isolated from *Coffea arabica* L. in Kenya. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 77, p. 328-331, 1970.

HINDORF, H. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: a review. **Journal of Coffee Research**, London, v. 5, n. 3/3, p. 43-56, 1975.

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

HOCKING, D. Direct effects of copper upon *Colletotrichum coffeanum* Noack. **Pans**, London, v. 13, n. 2, p. 163-167, June 1967.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café "Conilon" (*Coffea canephora*, Pierre) no estado de Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 5., 1977, Guarapari, Espírito Santo. **Resumos...** Guarapari, IBG/GERCA, 1977. p. 172-173.

MC DONALD, J. A preliminary account of disease green coffee berries in Kenya colony. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 2, n. 2, p. 145-154, Oct. 1926.

MARTINEZ, M.; ZAMBRANO, C. Variantes morfológicas de cepas del género *Colletotrichum*, asociadas al cultivo del café *Coffea arabica*, L. em diferentes pisos altitudinales de la región centro occidental de Venezuela. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 44, n. 4, p. 679-692, oct./dic. 1994.

MULINGE, S. K. Development of coffee berry disease in relation to the stage of berry growth. **Annals Applied Biology**, London, v. 65, n. 2, p. 269-276, Apr. 1970.

NECHET, K. de L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NECHET, K. de L.; ABREU, M. S. De. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n. 1, jan. 1902.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Coffee berry disease and coffee leaf rust in Kenya. **Outlook on Agriculture**, Berckshire, v. 14, n. 2, p. 72-79, 1964.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Coffee berry disease: epidemiology in relation to control. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 271-282, Jan. 1969a.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Seasonal variations in the sporulating capacity of the fungus causing coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, London, v. 64, n. 1, p. 85-99, Aug. 1969b.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. The stimulating effect of some fungicides on *Glomerella cingulata* in relation to the control of coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, London, v. 64, n. 2, p. 335-344, Oct. 1969c.

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

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

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

OROZCO MIRANDA, E. F.; PIGOZZO, P.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. de. Estudo das relações compatíveis e incompatíveis de *Colletotrichum* spp. x cafeeiro. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras. *Anais...* Lavras, MG: Associação da Pós graduação, APG-UFLA, 2002d.

PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. Surrey: International Mycological Institute, 1994. 55 p. (Technical Handbooks; n. 1).

PARESQUI, L.; ZAMBOLIM, L. COSTA, H.; SAKIYAMA, C. H.; BATISTA, U. G. Evidências da latência e associação endofítica de *Colletotrichum* sp. em tecidos de *Coffea arabica* L. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFES DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. *Anais...* Porto Seguro-BA, 2003. p. 200.

RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. *Nature*, London, v. 161, n. 4085, p. 245-246, Feb. 1948.

RAYNER, R. W. Coffee berry disease, a survey of investigations carried out up to 1950. *East Africa Agricultural Journal*, Nairobi, v. 17, p. 130-158, 1952.

ROCHETA, M.; COELHO, T.; BESSA, A.; DIAS, A.; VÁRZEA, V.; RODRIGUES JR., C.; TENREIRO, R. Obtenção de marcadores moleculares em *Colletotrichum* spp. isolados de cafeeiro (*Coffea arabica*). SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. *Anais...* Londrina, Brasil: Instituto Agrônomo de Paraná. p. 129-132.

RODRIGUES, Jr., C. J.; VÁRZEA, V. M. P.; MEDEIROS, E. F. Strains of *Colletotrichum coffeanum* Noak causing Coffee Berry Disease in Angola and Malawi with characteristics different to the Kenya strain. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 131, n. 3, p. 205-209, Mar. 1991.

RODRIGUES, Jr., C. J.; VÁRZEA, V. M. P.; MEDEIROS, E. F. Evidence for the existence of physiological races of *Colletotrichum coffeanum* Noack *sensu* Hindorf. **Kenya Coffee**, Nairobi, v. 57, n. 672, p. 1417-1420, 1992.

SILVA, C. C. N. et al. Características fisiológicas e genéticas de isolados de *Colletotrichum* sp. coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica*) de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CAFEICULTURA IRRIGADA, 1., 1998, Araguari M. G. 1998. p. 97-100.

SCHIEBER, E.; SENTMYER, G.; MITCHELL, D. J.; ROHEIM, J. Coffee berry necrosis in Guatemala and Costa Rica. **Phytopathology**, v. 60, p. 1542, 1970.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, New York, v. 97, n. 8, p. 995-1000, Aug. 1993.

SUTTON, B. C. *Coelomycetes*. Kew, Surrey: CMI, 1980. 696 p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum*: biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology, 1992. p. 1-25.

van der VOSSSEN, H. A. M.; KOOK, R. T. A.; MURAKURO, N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noak (*Sensu* Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 3, p. 733-745, Nov. 1976.

van der GRAAFF, N. A. Selection for resistance to coffee berry disease in arabica coffee in Ethiopia. Evaluation of selection methods. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 84, p. 205-215, 1978.

VARGAS, G. E.; GONZALEZ U. L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San Jose, v. 22, n. 2, p. 129-35, abr./jun. 1972.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES, C. J. Jr.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002.

VÁRZEA, 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, Portugal.

VERMEULEN, H. Coffee berry disease in Kenya. 1979. 112 p. Thesis (Ph. D) - Wageningen University, Holanda.

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

WALLIS, J. A. N.; FIRMAN, I. D. A comparison of fungicide spray volumes for the control of coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, London, v. 59, n. 2, p. 111-122, Mar. 1967.

WELLMAN, F. L. Blister spot of arabica coffee from virus in Costa Rica. **Turrialba**, San José, v. 7, n. 4, p. 113-115, oct./dic. 1957.

CAPÍTULO 2

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro no estado de Minas Gerais e comparação com *C. kahawae*.** 2003. p. 17-46. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração Fitopatologia) - UFLA, Lavras, MG¹.

1 RESUMO

Morfologia de *Colletotrichum* spp. é utilizada como critério taxonômico. Objetivou-se, neste trabalho, realizar a caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. e realizar a comparação com *C. kahawae*. Estudaram-se 35 isolados, na Universidade Federal de Lavras, MG, comparados com dois que ocasionam a CBD e um de *C. gloeosporioides* da China, no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal. Houve variação das características morfológicas e reprodutivas dos isolados. O crescimento micelial da maioria dos isolados de MG foi tipificado como rápido. O maior crescimento micelial foi observado a 25°C. Houve diferença significativa entre temperaturas, isolados e na interação temperaturas x isolados. O tamanho do conídio foi variável, não sendo um critério útil para separar espécies. Na análise de variância para comprimento e largura de conídios houve diferença significativa entre isolados. Contudo, as características de tamanho dos conídios de *C. kahawae* foram semelhantes a alguns dos isolados do Brasil. A maioria dos isolados têm formato cilíndrico, incluindo os de *C. kahawae* e o precedente da China. A esporulação foi afetada pela temperatura e tempo de incubação. Houve diferença significativa entre tempos de avaliação, temperaturas, isolados e nas interações tempos x temperaturas e temperaturas x isolados. Observou-se a formação de setores, crescimento irregular das colônias e formação de apressórios; estes são pigmentados, de cor marrom, forma clavada para todos os isolados. Observaram-se também setas e acérvulos na maioria de isolados e fase teleomórfica para oito isolados. As características observadas nos isolados de MG enquadram-se dentro de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. O crescimento micelial, coloração de colônia, formação de setas e acérvulos, esporulação e teleomorfo, de forma conjunta, permitiram a separação de espécies e distinção dos isolados de *C. kahawae*.

¹ Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu -UFLA (Orientador)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)
Mário Lúcio Vilela de Resende-UFLA (Co-orientador)

2 ABSTRACT

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Morphological characteristics of isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from the coffee tree in the state of Minas Gerais and comparison with *C. kahawae*.** 2003. p. 17-46. Thesis (Doctorate in Agronomy, Major -Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Morphology of *Colletotrichum* spp. is utilized as a taxonomical criterion. The current work was aimed at performing the morphological characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. and comparing with *C. kahawae* characteristics. 35 isolates from MG were studied at “Universidade Federal de Lavras”, MG and compared with two which cause CBD and one *C. gloeosporioides* from China, at the Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal. There was variation of the morphological and reproductive characteristics of the isolates. The mycelial growth of most isolates from MG was typified as fast. The fastest mycelial growth occurred at 25°C. There was a significant difference among temperatures (T), isolates (I) and in the interaction T x I. The size of the conidium was variable and it was not a useful criterion to separate species. There was a significant difference among isolates for length and width of conidia. However, the conidium size of *C. kahawae* was similar to some of the isolates from Brazil. Most of the isolates possesses cylindrical shape, including those of *C. kahawae* and that from China. Sporulation was affected by temperature and incubation time. There were significant differences among times of evaluation, temperatures, isolates, and at the interactions times x temperatures, temperatures x isolates. Irregular growth of the colonies, formation of sectors and apressoria were observed. Apressoria of all isolates were pigmented, brown in color and clavate. Arrows and acervuli were observed for most isolates. The teleomorphic phase was also observed for eight isolates. The characteristics observed for isolates of Brazil fit within *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*. Altogether, the mycelial growth, colony coloration, formation of arrows and acervuli, sporulation and teleomorph, enabled the separation of species and distinction from isolates of *C. kahawae*.

Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu (Adviser)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-adviser)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-adviser)
Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

Estudos de caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro normalmente foram realizados, no passado, com fins taxonômicos (Gibbs, 1969; Hindorf, 1970; Sutton, 1980; Waller et al., 1993). Na atualidade, a taxonomia e a diagnose de espécies deste fitopatógeno estão sendo recomendadas por meio de técnicas moleculares (Cannon, 2003). Mas, estudos morfológicos permitem conhecer a variabilidade e biologia do patógeno (Feitosa 1977; Sutton, 1992; Dorizzotto, 1993; Várzea, 1995; Nechet, 2002).

Objetivou-se, neste trabalho, realizar a caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à cultura do café (*Coffea arabica*) no estado de Minas Gerais, para determinar a variabilidade e realizar a comparação com alguns isolados de *C. kahawae*, que ocasionam o sintoma de CBD, e um isolado de *C. gloeosporioides*, procedente da China.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, de 2001 a 2003, nas etapas: 1) coleta de material doente de plantas de café no campo; 2) isolamento, identificação e conservação dos isolados de *Colletotrichum* spp. e 3) estudo de características culturais e morfológicas.

No Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal, 2003, foram realizadas comparações para algumas características entre isolados de *C. kahawae* e isolados de *Colletotrichum* spp.

4.1 Obtenção de isolados de *Colletotrichum* spp. de café

Foram realizadas coletas de folhas, ramos e frutos com sintomas de necrose, mancha manteigosa e seca de ponteiros em MG. Para o isolamento, partes do tecido infectado foram superficialmente desinfestadas com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por um minuto. Depois, foram transferidas para placa de Petri com meio MEA 2% (extrato de malte ágar) mais cloranfenicol. Incubadas por sete dias em câmara de crescimento a 22°C e fotoperíodo de 12 horas, as colônias purificadas foram utilizadas para obtenção de culturas monospóricas. A procedência e relação dos isolados utilizados na caracterização morfológica, na UFLA e no CIFC são apresentadas na Tabela 1.

4.2 Obtenção de culturas monospóricas

Esporos do fungo foram suspensos em 5 mL de água esterilizada e, em seguida, alíquota de 10µL dessa suspensão foi recolhida com uma finapipeta e colocada sobre a superfície de meio ágar água contido em placas de Petri e colocada a 25°C. Após a germinação dos conídios, foram feitas observações ao

TABELA 1 Procedência e relação dos isolados de *Colletorichum* spp. utilizados na caracterização morfológica, na UFLA, Lavras e Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal, 2003.

Isolado	Órgão	Sintoma	Procedência	Data
1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, UFLA	2001
2	Folha	Mancha manteigosa	Piumhi	2001
3	Folha	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
4	Fruto	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
5	Folha	Necrose	Ouro Fino	2001
6	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
7	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
8	Ramo	Necrose	Boa Esperança	1998
9	Folha	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
10	Ramo	Seca de ponteiros ⁺	Nepomuceno	2001
11	Fruto	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
12	Folha	Mancha manteigosa	Poço Fundo	2001
13	Fruto	Antracnose ⁺	Poço Fundo	2001
14	Fruto	Antracnose	Poço Fundo	2001
15	Folha	Mancha manteigosa	Turvolândia	2001
16	Ramo	Necrose	Ibituruna	1998
17	Ramo	Necrose	Muzambinho	2001
18	Ramo	Necrose	Varginha	1998
19	Ramo	Necrose	Patrocínio	1999
20	Folha	Necrose	Guaxupé	1998
21	Folha	Necrose	Piumhi	1998
22*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
23*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
24*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
25*	Fruto	Necrose	Canaã	1998
26	Fruto	Necrose	Teixeiras	1998
27	Fruto	Necrose	Patrocínio	1998
28	Fruto	Necrose	Araguari	1998
29	Ramo	Seca de ponteiros	Capelinha	2001
30	Fruto	Necrose	Ouro Fino	2000
31	Ramo	Necrose	Ijaci	2001
32	Ramo	Necrose	Cristais	2002
33	Ramo	Necrose	Cristais	2002
34	Fruto	Necrose	Cristais	2002
35	Folha	Necrose	Campo Belo	2002
Ch	Fruto	Necrose	China ¹	1994
Z1	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1991
Z9	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1997
Ca1	Fruto	Necrose	Camarões ¹	1992

+ Proveniente de planta com sintoma de mancha manteigosa; ¹Isolados fornecidos no CIFC; * Isolados identificados como *C. gloeosporioides* na Universidade Federal de Uberlândia/ Depto. de Fitopatologia.

Microscópio, marcados e cortados pequenos blocos do meio contendo apenas um conídio germinado. Este conídio foi colocado em meio MEA 2% e originou uma cultura monospórica. Passados oito dias, discos com o micélio desses isolados foram conservados em água esterilizada usando o método de Castellani, segundo Figueiredo (1967).

4.3 Estudos sobre as características culturais e morfológicas dos isolados

Foram caracterizados crescimento micelial, coloração das colônias e formação de setores, dimensões dos conídios, esporulação, germinação dos conídios em relação à temperatura, formação de septos nos conídios na germinação, características microscópicas dos conídios e dos apressórios, presença de acérvulos, setas e peritécios para cada um dos isolados.

4.4 Crescimento médio diário das colônias a várias temperaturas

Para cada isolado, discos de cinco milímetros de diâmetro, obtidos de uma placa com meio MEA 2% colonizado pelo fungo, foram retirados com uma agulha esterilizada das margens de colônias do fungo de oito dias de idade e transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio MEA 2%. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições; cada repetição foi uma placa de Petri. Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de doze horas nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C. Para determinar o crescimento micelial, foram realizadas medições a cada 24 horas após inoculação do fungo, dos diâmetros das colônias em posição ortogonal, durante oito dias. Os valores entre as diferenças do diâmetro médio do primeiro e do oitavo dia foram anotados. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado utilizando-se a fórmula de Manguire, adaptada por Oliveira (1991).

$$IVCM = \sum (D-Da)/N$$

Em que:

D = diâmetro médio atual

Da = diâmetro médio do dia anterior

N = número de dias após a inoculação

4.5 Coloração das colônias

A coloração das colônias dos isolados foi observada em meio MEA 2%. Características da colônia foram registradas 8 dias após a inoculação do fungo na placa de Petri. Este processo foi feito em fotoperíodo de 12 horas nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25 °C e 30°C e as leituras foram realizadas com critério visual.

4.6 Dimensão dos conídios

A dimensão dos conídios para cada isolado foi obtida pela medição do comprimento e largura de 100 conídios escolhidos ao acaso. Os conídios foram obtidos a partir de acérvulos ou de colônias de oito dias de idade crescidas em meio MEA 2%. As medições foram realizadas com o auxílio de uma ocular micrométrica.

4.7 Esporulação e germinação de conídios e formação de septos

Os conídios foram obtidos a partir da lavagem da superfície de colônias com água destilada esterilizada. Os isolados foram inoculados em meio MEA 2% a 15°C, 20°C, 25°C e 30°C. A capacidade de esporulação foi determinada a cada 24 horas, durante 8 dias. Foram colocados 5 mL de água para cada placa de Petri, obtendo-se uma suspensão de esporo, filtrada em gaze e retirando-se uma alíquota de 10µL para contagem do número de esporos mL⁻¹ em câmara de

Newbauer. Para a observação da germinação dos conídios, 50 μL da suspensão foram depositados em lâminas de vidro escavadas. As lâminas foram colocadas em câmara úmida (placas de Petri com papel umedecido) durante 18 horas, a 25°C. A presença de septos nos conídios germinados foi registrada em lâminas com o auxílio de um microscópio de luz. Em cada isolado, observaram-se 100 conídios, que foram considerados germinados após emissão do tubo germinativo com pelo menos o comprimento do conídio e a produção do apressório.

4.8 Observação de acérvulos, setas e peritécios

As observações destas estruturas foram feitas em meio MEA 2% em placas de Petri inoculadas com os diferentes isolados, nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C, durante 60 dias. Periodicamente, foram realizadas preparações microscópicas.

4.9 Morfologia de apressórios

Foi utilizado o método de germinação em lâmina de vidro. Os isolados foram cultivados em meio MEA durante oito dias a 25°C em câmara de germinação. Os conídios foram suspensos em água destilada e esterilizada, sendo uma gota dessa suspensão depositada em uma lâmina e colocada em câmara úmida durante 8 horas a 25°C em BOD. Os apressórios de 20 conídios por isolado foram caracterizados com auxílio de microscópio de luz.

4.10 Análise estatística

Foi realizada análise de variância para os dados de IVCM, comprimento e largura de conídios e esporulação. Na comparação múltipla de médias dessas variáveis foi utilizado o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). Foi feita análise de regressão para IVCM e esporulação em função da temperatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento micelial diário a várias temperaturas

O crescimento diário das colônias de isolados *Colletotrichum* spp. nas temperaturas contempladas foi variável (Tabela 2). Na análise de variância para a variável IVCM houve diferença significativa entre isolados ($p \leq 0,05$) nas quatro temperaturas. Os coeficientes de variação foram de 3,33; 7,36; 5,16 e 13,73 nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C, respectivamente. Na comparação de médias para a variável IVCM, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de 11, 4, 4 e 6 grupos para as mesmas temperaturas (Tabela 2). Isto demonstra que variações de temperatura afetaram muito o crescimento dos isolados de *Colletotrichum* spp. Estudos realizados por Várzea (1995) com isolados de três espécies de *Colletotrichum* procedentes de café demonstram que a temperatura foi o fator que ocasionou variação no crescimento diário das colônias do fungo. Dias (2002) observou que, na temperatura de 35°C, o crescimento micelial de isolados desse fungo foi inibido.

Conforme análise de variância combinada dos dados, houve diferença significativa entre temperaturas, isolados e na interação temperatura x isolados ($p \leq 0,05$). O coeficiente de variação foi de 7,7. Na comparação de médias para a variável IVCM, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de 7 grupos (Tabela 2). Isolados 5 e 17, que são de cor rosa, tiveram menor crescimento micelial e os isolados 22 e 27 o de maior IVCM.

TABELA 2 Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) (cm) de isolados de *Colletotrichum* spp. de café em meio malte-ágar a várias temperaturas, fotoperíodo de 12 horas. UFLA, Lavras, 2003.

Isolados	Análise 15°C	Análise 20°C	Análise 25°C	Análise 30°C	Análise combinada
1	0,671 f	0,858 c	1,048 a	0,530 d	0,777 e
2	0,674 f	0,830 c	1,063 a	0,640 c	0,802 d
3	0,613 h	0,910 b	1,063 a	0,589 d	0,794 d
4	0,575 i	0,871 c	1,063 a	0,920 a	0,857 b
5	0,474 k	0,740 d	0,987 b	0,393 e	0,649 g
6	0,784 c	0,909 b	0,869 d	0,174 f	0,684 f
7	0,613 h	0,743 d	0,888 d	0,530 d	0,693 f
8	0,643 g	0,901 b	1,063 a	0,760 b	0,842 c
9	0,610 h	0,829 c	1,063 a	0,865 a	0,842 c
10	0,571 i	0,879 c	1,038 a	0,978 a	0,866 b
11	0,828 b	0,929 b	1,053 a	0,540 d	0,837 c
12	0,638 g	0,775 d	0,960 c	0,456 d	0,707 f
13	0,648 g	0,806 c	0,976 c	0,488 d	0,729 e
14	0,658 f	0,905 b	1,063 a	0,669 c	0,823 c
15	0,545 i	0,808 c	1,003 b	0,644 c	0,750 e
16	0,683 f	0,843 c	1,043 a	0,980 a	0,887 b
17	0,503 j	0,755 d	0,936 c	0,380 e	0,643 g
18	0,642 g	0,830 c	0,813 d	0,788 b	0,768 e
19	0,646 g	0,830 c	0,995 b	0,783 b	0,813 d
20	0,621 h	0,851 c	0,855 d	0,845 a	0,793 d
21	0,875 a	0,897 b	0,968 c	0,770 b	0,877 b
22	0,833 b	1,024 a	1,063 a	0,698 c	0,904 a
23	0,753 d	0,966 a	1,010 b	0,652 c	0,845 c
24	0,664 f	0,890 b	0,993 b	0,693 c	0,810 d
25	0,721 e	0,963 a	1,050 a	0,700 c	0,858 b
26	0,719 e	0,855 c	1,038 a	0,710 c	0,830 c
27	0,813 b	0,980 a	1,038 a	0,905 a	0,934 a
28	0,690 f	0,878 c	0,983 c	0,611 d	0,790 d
29	0,681 f	0,913 b	0,909 d	0,461 d	0,741 e
30	0,684 f	1,035 a	0,960 c	0,766 b	0,861 b
31	0,808 b	0,844 c	1,053 a	0,709 c	0,853 b
32	0,758 d	0,906 b	0,964 c	0,393 e	0,755 e
33	0,599 h	0,890 b	1,063 a	0,783 b	0,833 c
34	0,715 e	0,999 a	1,035 a	0,705 c	0,864 b
35	0,680 f	1,007 a	1,063 a	0,780 b	0,883 b
Média	0,675	0,881	1,001	0,665	0,806

Comparação de médias para IVCM em cm. Valores seguidos da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Na comparação de médias para a variável temperatura, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de 3 grupos (Figura 1). Observa-se que o maior valor de IVCM foi 1,001 e corresponde à temperatura de 25°C, sendo esta significativamente diferente dos outros valores. Isto indica que os isolados tiveram o maior crescimento micelial diário nessa temperatura. A 20°C, o IVCM foi de 0,88 e constitui um crescimento intermediário. Não houve diferença significativa entre os valores de IVCM nas temperaturas de 15°C e 30°C, os IVCM foram de 0,68 e 0,67, respectivamente. Como observado nessas temperaturas, o crescimento micelial do fungo diminui.

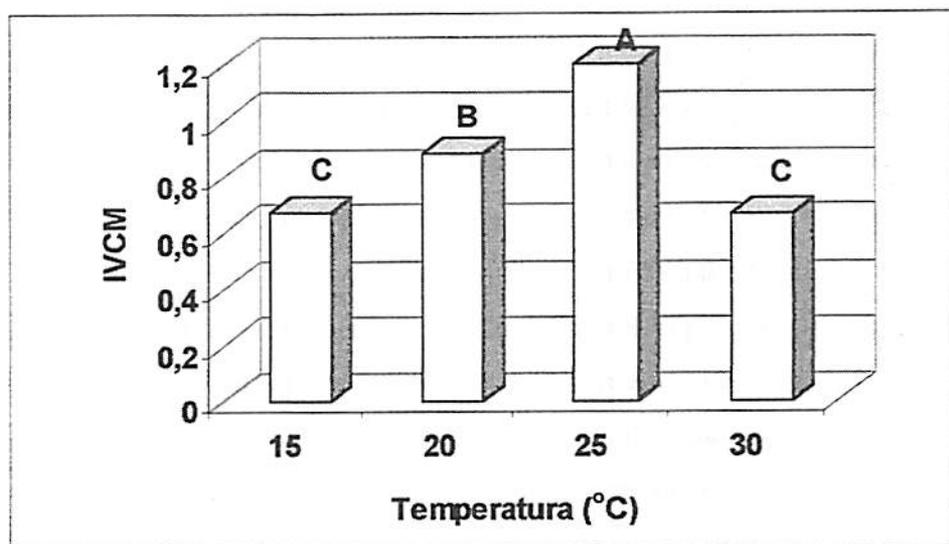


FIGURA 1 Comparação de médias do índice de crescimento micelial (IVCM) diário (cm) de isolados *Colletotrichum* spp. em quatro temperaturas. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). UFLA, Lavras, 2002.

A significância da interação temperatura x isolados indica que existem isolados com temperaturas específicas de crescimento. Por exemplo, o isolado 1,

que ocasiona sintomas de mancha manteigosa a 15°C, teve um IVCM de 0,671 e 0,53 a 30°C; já no isolado 10, que ocasiona o mesmo sintoma, ocorreu o contrário. O IVCM foi de 0,571 a 15°C e de 0,978 a 30°C. Comparando-se os resultados de IVCM a 25°C com o critério de Waller et al. (1993) para distinção de isolados *C. kahawae* e *C. gloeosporioides*, o crescimento dos isolados aqui estudados pode ser considerado de médio a rápido. De acordo com esta característica, os isolados enquadram-se dentro das espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. O IVCM também é concordante com os relatados por outros pesquisadores (Gunnell & Gubler, 1992; Várzea, 1995; Nechet, 2002; Várzea et al., 2002) para isolados dessas espécies.

5.2 Dimensões e forma dos conídios

Os isolados de *Colletotrichum* spp. têm grande variação no comprimento de conídio; entretanto, na largura é menor. O tamanho médio de comprimento de conídio variou de 18,49µm (no isolado 32) a 10,65µm (isolado31) e na largura foi de 5,05µm (isolado 5) a 4,0µm (isolado 19). Estes dados estão dentro da variação encontrada por Feitosa et al. (1977) para isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro no estado de São Paulo. Na Tabela 3, são apresentadas as características de comprimento e largura e a variação de tamanho de conídio para cada isolado. Nos isolados de *C. kahawae*, o tamanho médio de comprimento e largura dos conídios variou entre 14,53 x 4,98µm a 12,13 x 5,0µm para os isolados Z1 e Ca1, respectivamente. Estas dimensões estão de acordo com as descritas por Várzea (1995) para tal espécie. Já o isolado de *C. gloeosporioides*, procedente da China, apresentou 14,21 x 4,99µm. Estas dimensões estão próximas as de isolados de *C. kahawae* e alguns isolados de *Colletotrichum* spp. do Brasil.

TABELA 3 Características microscópicas de conídios de *Colletotrichum* spp. e *C. kahawae* (Ca1 e Z1), associados ao caféiro. UFLA, Lavras, 2003.

Isolado	Varição tamanho (μm)	Comprimento médio (μm)		Largura média (μm)	
1	10,0-16,0 x 4,0-5,0	12,92	e	4,77	b
2	9,0-16,0 x 4,0-5,0	12,60	f	4,80	b
3	9,0-27,0 x 4,0-5,0	13,65	e	4,80	b
4	7,0-15,0 x 4,0-5,0	11,19	g	4,58	c
5	8,0-17,0 x 5,0-6,0	12,63	f	5,05	a
6	9,0-26,0 x 4,0-5,0	12,93	e	4,90	b
7	10,0-17,0 x 5,0-6,0	13,18	e	5,01	a
8	9,0-18,0 x 5,0-5,0	12,81	e	5,00	a
9	8,0-15,0 x 4,0-5,0	12,18	f	4,88	b
10	10,0-23,0 x 4,0-5,0	15,29	c	4,98	a
11	8,0-19,0 x 4,0-5,0	12,58	f	4,98	a
12	10,0-20,0 x 5,0-5,0	14,58	d	5,00	a
13	11,0-22,0 x 4,0-6,0	15,73	c	5,00	a
14	14,0-24,0 x 5,0-6,0	17,13	b	5,01	a
15	10,0-21,0 x 4,0-5,0	16,32	b	4,46	c
16	10,0-18,0 x 4,0-5,0	13,99	d	4,97	a
17	10,0-26,0 x 5,0-6,0	14,47	d	5,03	a
18	9,0-14,0 x 4,0-5,0	11,23	g	4,95	a
19	10,0-15,0 x 4,0-4,0	10,82	g	4,00	c
20	8,0-15,0 x 4,0-5,0	11,58	g	4,70	b
21	9,0-16,0 x 4,0-5,0	13,10	e	4,45	c
22	10,0-15,0 x 4,0-5,0	10,73	g	4,64	c
23	9,0-20,0 x 5,0-5,0	13,57	e	5,00	a
24	9,0-15,0 x 4,0-5,0	11,55	g	4,82	b
25	9,0-15,0 x 4,0-5,0	12,94	e	4,80	b
26	10,0-16,0 x 4,0-5,0	12,31	f	4,89	b
27	10,0-16,0 x 5,0-5,0	12,24	f	5,00	a
28	10,0-20,0 x 5,0-5,0	15,02	c	5,00	a
29	10,0-23,0 x 4,0-5,0	16,68	b	4,99	a
30	11,0-20,0 x 5,0-5,0	15,37	c	5,00	a
31	9,0-13,0 x 4,0-5,0	10,65	g	4,84	b
32	10,0-25,0 x 5,0-5,0	18,49	a	5,00	a
33	8,0-15,0 x 4,0-5,0	11,93	g	4,84	b
34	10,0-22,0 x 4,0-5,0	12,40	f	4,90	b
35	10,0-20,0 x 4,0-5,0	14,45	d	4,94	a
Ch	9,0-21,0 x 4,0-5,0	14,21	d	4,99	a
Z1	9,0-34,0 x 4,0-5,0	14,53	d	4,98	a
Ca1	9,0-21,0 x 4,0-5,0	12,13	f	5,00	a

Valores seguidos da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Conforme a análise de variância da variável comprimento de conídios de *Colletotrichum* spp. e de *C. kahawae*, houve diferença significativa entre isolados ($p \leq 0,05$). O coeficiente de variação foi 5,04. Na comparação de médias para comprimento de conídios, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de sete grupos (Tabela 3). Isto demonstra a grande variação existente no comprimento dos conídios dos isolados estudados.

Na análise de variância para a variável largura de conídios de *Colletotrichum* spp. e de *C. kahawae*, também houve diferença significativa entre isolados ($p \leq 0,05$). O coeficiente de variação foi 2,79. Na comparação de médias para essa variável, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de três grupos (Tabela 3). No primeiro, ficaram agrupados os isolados 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 23, 27, 28, 29, 30, 32, 35, Ca1, Z1 e Ch. No segundo, agruparam-se os isolados 1, 2, 3, 6, 9, 20, 24, 25, 26, 31, 33 e 34, que apresentaram largura média entre 4,7 a 4,9 μ m. No terceiro grupo, os isolados 4, 15, 19, 21 e 22, que tiveram a menor largura de conídio, variando entre 4 a 4,64 μ m.

Valores dos parâmetros moda e desvio padrão para comprimento e largura de conídios, a relação de comprimento/largura e formato de acordo com o critério de Feitosa et al. (1977) para cada isolado são apresentados na Tabela 4. Observa-se que o desvio padrão para comprimento de conídios é maior e variável entre os isolados, comparado ao desvio padrão para a largura. Isso é devido à heterogeneidade existente nos valores quantificados para essa característica. Em outras caracterizações de conídios, tem se encontrado variação para esta característica (Feitosa et al., 1977; Dorizzotto, 1993; Nechet, 2002) e, segundo Várzea (1995), as dimensões dos conídios de *C. kahawae* podem variar de acordo com o substrato onde o fungo é desenvolvido.

A relação comprimento/largura variou de 2,3 correspondente ao isolado 18 de *Colletotrichum* spp. a 3,7 nos isolados 15 e 32 de *Colletotrichum* spp. A forma dos conídios com base nessa relação e critério de Feitosa et al. (1977) foi cilíndrica (C) para 15 isolados; cilíndrica curta (Cc) para 13 isolados; fusiforme (F) para 5 isolados e fusiforme muito longo (FF) em 2 isolados. De acordo com esses resultados, observa-se que a maioria dos isolados tem forma cilíndrica (Figura 6D) e cilíndrica curta. Para os isolados de *C. kahawae* a forma foi cilíndrica para o Ca1 e cilíndrica curta para o Z1 (Figura 6C), já para o isolado Ch de *C. gloeosporioides*, a forma foi cilíndrica. De acordo com o critério de Sutton (1980, 1992) os isolados 5, 7 e 17 têm conídios retos, fusiformes, para os demais isolados os conídios são retos, cilíndricos.

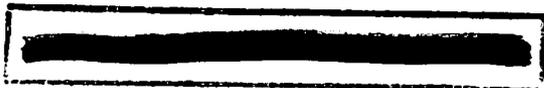
De 37 isolados de *Colletotrichum* spp. de São Paulo estudados por Feitosa (1977), 24 produziram conídios de forma C; 6 Cc; 2 Ccc (cilíndrico muito curto); 3 do tipo F e 2 de forma FF. Comparando-se os resultados desse estudo observa-se que nas populações de *Colletotrichum* spp. associadas ao cafeeiro em São Paulo e MG prevalecem as formas cilíndrica e cilíndrica curta; do mesmo modo, isolados de *C. kahawae* também apresentaram a mesma forma. O critério utilizado por Feitosa (1977) não se enquadra dentro de aqueles utilizados para determinação de espécies, porém o critério de Sutton (1980, 1992) é aplicável par esse objetivo.

Com base nos resultados de dimensões dos conídios, torna-se difícil caracterizar espécies de isolados de *Colletotrichum* spp. associadas ao cafeeiro. Contudo, as características de tamanho de conídios de isolados que ocasionam a CBD e de isolados que ocasionam a mancha manteigosa em MG são semelhantes e tiveram o mesmo agrupamento na probabilidade de 5%. Já para a forma de conídios, a maioria dos isolados aqui estudados enquadra-se nas características de *C. gloeosporioides*, segundo Sutton (1980) em meio PDA.

TABELA 4 Parâmetros de variação no comprimento e largura dos conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. e de *C. kahawae* (Ca1 e Z1) e seu formato de acordo com Feitosa et al. (1977). UFLA, Lavras, 2003.

Isolado	Moda comp. e larg.	Desvio padrão comprimento	Desvio padrão largura	Relação comp./larg.	Forma dos conídios
1	13,5 e 5,0	1,51	0,42	2,7	C
2	12,2 e 5,2	1,36	0,51	2,6	C
3	14,7 e 5,0	3,10	0,40	2,8	C
4	11,48 e 5,0	1,44	0,49	2,4	Cc
5	11,88 e 5,0	1,63	0,10	2,5	Cc
6	12,71 e 5,0	2,46	0,30	2,6	C
7	13,72 e 5,0	1,64	0,10	2,6	C
8	12,78 e 5,0	1,55	0,00	2,6	C
9	12,05 e 5,0	1,37	0,32	2,5	Cc
10	13,61 e 5,0	3,04	0,14	3,1	F
11	12,56 e 5,0	1,71	0,14	2,5	Cc
12	15,00 e 5,0	1,74	0,00	2,9	C
13	14,79 e 5,1	2,38	0,25	3,1	F
14	16,81 e 5,0	2,05	0,10	3,4	F
15	16,41 e 4,0	2,46	0,50	3,7	FF
16	12,69 e 5,0	1,85	0,17	2,7	C
17	14,60 e 5,0	2,32	0,17	2,9	C
18	9,92 e 5,0	1,18	0,38	2,3	Cc
19	10,13 e 4,0	1,25	0,00	2,7	C
20	12,0 e 5,0	1,39	0,46	2,5	Cc
21	12,68 e 4,0	1,47	0,5	2,9	C
22	10,06 e 4,0	1,19	0,46	2,5	Cc
23	14,91 e 5,0	1,64	0,00	2,7	C
24	12,54 e 5,0	1,48	0,39	2,4	Cc
25	12,67 e 5,0	1,46	0,40	2,7	C
26	12,08 e 5,0	1,24	0,31	2,5	Cc
27	11,72 e 5,0	1,13	0,00	2,4	Cc
28	15,50 e 5,0	1,50	0,00	3,0	C
29	15,93 e 5,0	2,40	0,10	3,3	F
30	15,41 e 5,0	2,13	0,00	3,1	F
31	9,65 e 5,0	0,94	0,36	2,2	Cc
32	19,09 e 5,0	2,39	0,00	3,7	FF
33	12,57 e 5,0	1,15	0,37	2,5	Cc
34	11,71 e 5,0	2,19	0,30	2,5	Cc
35	14,91 e 5,0	2,05	0,10	2,9	C
Ch	13,94 e 5,0	2,20	0,10	2,8	C
Z1	12,76 e 5,0	3,76	0,14	2,9	C
Ca1	11,75 e 5,0	2,31	0,60	2,4	Cc

C=cilíndrica; Cc=cilíndrica curta; F=fusiforme; FF=fusiforme muito longo



5.3 Efeito da temperatura na esporulação e germinação de conídios

A esporulação foi diferente entre os isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados. Ela variou no tempo após a inoculação no meio de cultura e é muito influenciada pela temperatura (Figuras 2-4).

Conforme análise de variância conjunta dos dados de esporulação nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C e oito leituras realizadas para cada isolado, houve diferença significativa entre tempos de avaliação, temperaturas, isolados e nas interações tempos x temperaturas e temperaturas x isolados ($p \leq 0,05$). Na comparação de médias para a variável produção de conídios mL^{-1} e, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de 7 grupos (Figura 2). Os isolados que apresentam crescimento liso e coloração rósea (isolados 5, 7 e 17) e o 23 estão no grupo de menor esporulação. Os de maior esporulação foram os isolados 13, 3, 12 e 32.

Na comparação de médias de produção de conídios ao longo do tempo, (leituras) de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de quatro grupos. Não existe diferença significativa na esporulação entre 24 a 72 horas. A maior produção de conídios foi alcançada às 192 horas após a inoculação do fungo no meio de cultura (Figura 3).

Na análise de comparação de médias de produção de conídios por temperatura, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), as quatro médias foram significativamente diferentes. A temperatura em que houve a menor esporulação foi 15°C e a maior esporulação foi a 25°C (Figura 4).

Na Figura 5, exemplificam-se curvas de regressão de IVCM e esporulação para os isolados 5, 12, 14 e 32. Para estas características, em todos os isolados, o modelo de regressão que mais se adaptou foi o quadrático. Estes dados são concordantes com os citados por Feitosa et al. (1977) e Dias (2002), que encontraram variações de esporulação e efeito de temperatura.

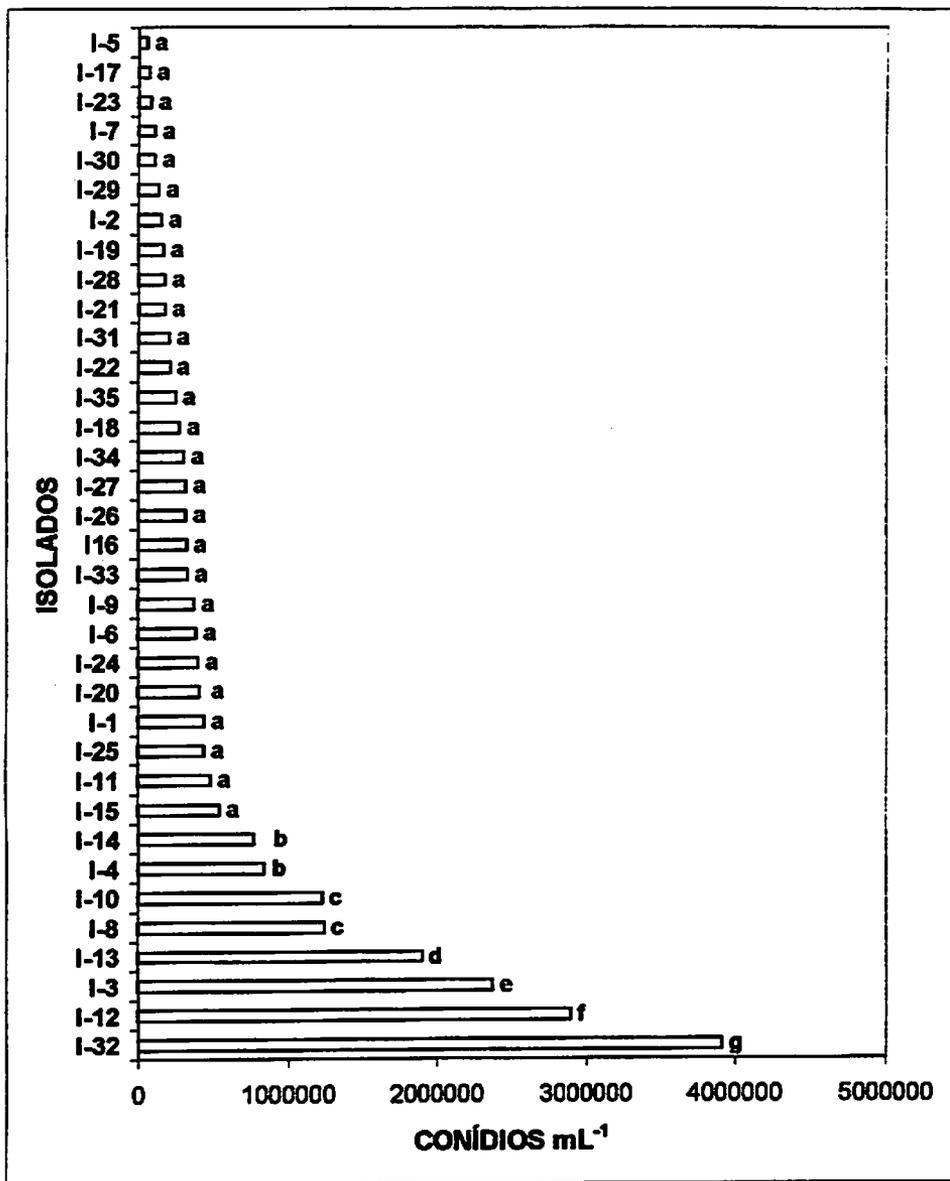


FIGURA 2 Comparação da esporulação de isolados *Colletotrichum* spp. em meio malte ágar 2%. Médias de conídios produzidos mL⁻¹ por isolado. Análise combinada nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). UFLA, Lavras, 2003.

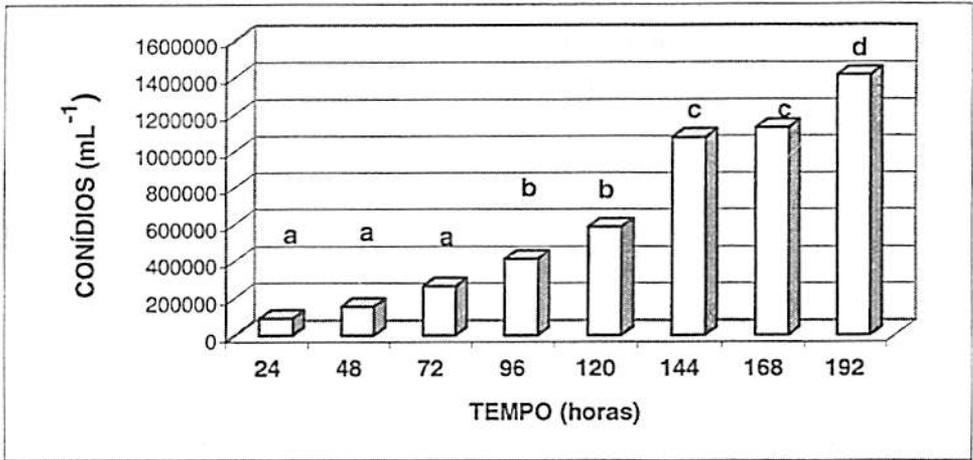


FIGURA 3 Comparação da esporulação de isolados *Colletotrichum* spp. em meio malte ágar 2% em relação ao tempo de inoculação, análise combinada de quatro temperaturas. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). UFLA, Lavras, 2003.

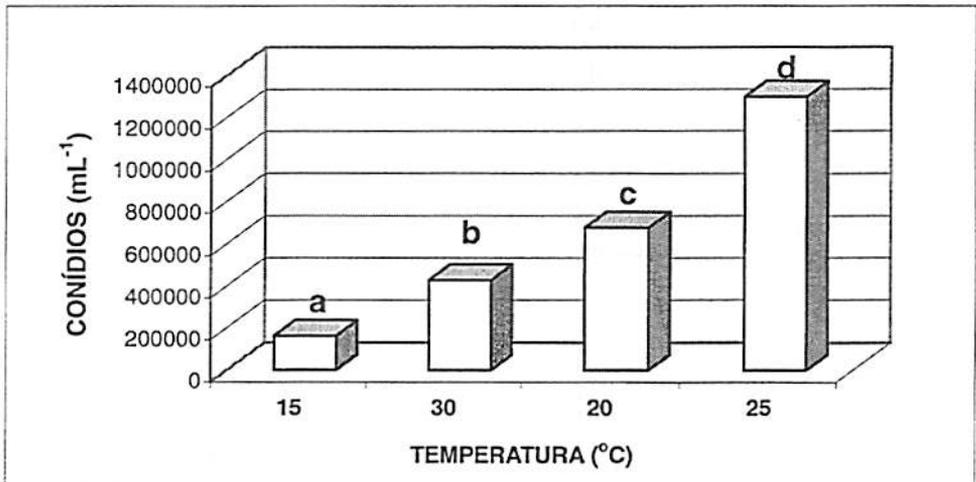
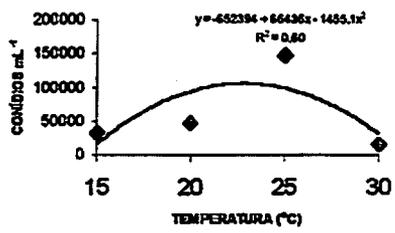
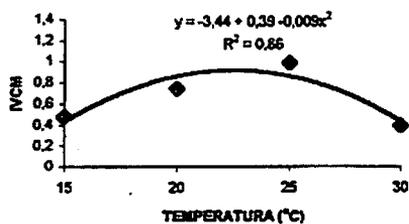
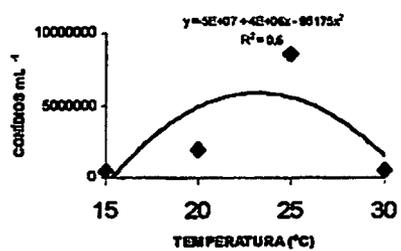
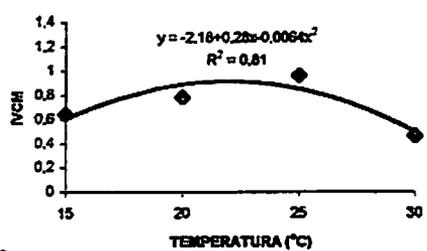


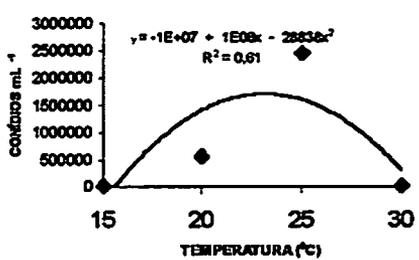
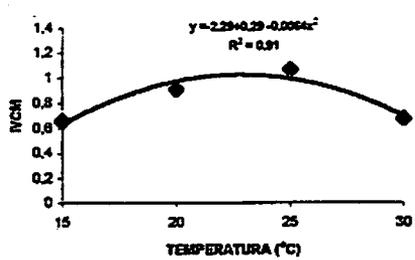
FIGURA 4 Comparação da esporulação de isolados *Colletotrichum* spp. em meio malte ágar 2% em relação à temperatura de incubação, análise combinada de quatro temperaturas. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). UFLA, Lavras, 2003.



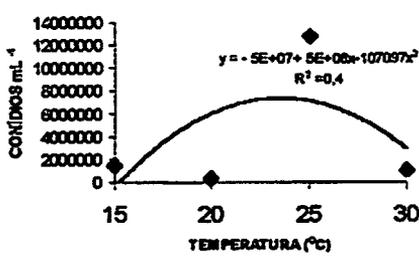
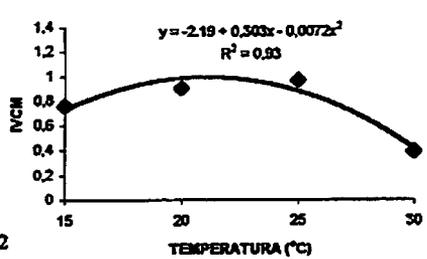
I-5



I-12



I-14



I-32

FIGURA 5 Curvas de regressão de índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (esquerda) e produção de conídios mL⁻¹ (direita), em diferentes temperaturas para os isolados 5, 12, 14 e 32 de *Colletotrichum* spp. UFLA, Lavras, 2003.

Conídios de *Colletotrichum* spp. tiveram de 70% a 100% de germinação em água na concentração de 10^6 conídios mL⁻¹, entre 24 a 192 horas após incubação do fungo a 15°C. Já nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C, a germinação variou entre 50% a 100%. As menores porcentagens de germinação de conídios foram observadas nos isolados de maior produção de conídios. Isto possivelmente deve-se à mucilagem conidial, em que existe um autoinibidor de germinação denominado micosporina-alanina (Mercure et al., 1994; Bergstrom & Nicholson, 1999).

5.4 Coloração das colônias

A coloração de colônia foi uma característica muito variável na maioria dos isolados estudados (Tabela 6). Os isolados 5, 7 e 17 apresentaram coloração rósea e crescimento micelial superficial e permanecem com suas características quase constantes. As colônias apresentaram várias tonalidades dentro de isolados e dentro de um mesmo isolado ao longo do tempo, principalmente quando o fungo foi repicado sucessivamente. A mudança de cor foi observada após 48 horas de incubação do fungo no meio de cultura. Além disso, após 72 horas de incubação do fungo, é comum o aparecimento de setores. Estes consistem em mudanças de cor, de cinza ou esverdeado a branco e de rosa a cinza em forma de ângulos dentro da colônia. Após 96 horas e 15°C, observaram-se tais características nos isolados 3, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 22, 28, 23, 24, 25, 31, 33 e 35; a 20°C e após 96 horas nos isolados 6, 9, 14, 20, 21, 23, 25, 4, 18 e 32; a 25°C e após 120 horas, nos isolados 1, 8, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 16, 22, 29 e 30; e a 30°C e após 72 horas nos isolados 1, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34 e 35. Portanto, acontece em 43% e 28% dos isolados a 15°C e 20°C e em 63% para as temperaturas de 25°C e

30°C, respectivamente. Observa-se que, sob maior temperatura, a ocorrência de formação de setores nas colônias do fungo aumenta.

Crescimento irregular das colônias nas temperaturas de 15°C e 30°C foi observado nos isolados 1, 9, 11, 12, 13, 15, 3, 4, 5, 7, 8, 22, 29 (os primeiros 6 isolados ocasionam o sintoma de mancha manteigosa). Este fenômeno possivelmente deve-se a estresse ocasionado em temperaturas não adequadas ao desenvolvimento do fungo. A formação de anéis em forma concêntrica aconteceu após 72 horas nos isolados 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34 e 35, em todas as temperaturas.

Com base nos resultados, pode-se afirmar que a coloração de colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. é uma característica muito variável e não adequada para fins taxonômicos deste fungo. Pode variar entre isolados, no mesmo isolado, ao longo do tempo e com a temperatura. Nas colônias também se observa a formação de setores e anéis concêntricos. Variações de coloração de *Colletotrichum* spp. já foram citadas por Várzea (1995) e Gunnell & Gubler (1992). Comparações realizadas no CIFC entre isolados que ocasionam a mancha manteigosa no Brasil e os que ocasionam a CBD permitem afirmar que coloração não é uma característica que permita a sua distinção, dado que são semelhantes (Figura 6-A). Portanto, o critério de coloração de colônia utilizado por Waller et al. (1993) é inconsistente para distinção de espécies de *Colletotrichum* em café. Entretanto, estes resultados são importantes para o conhecimento da biologia do fungo, armazenamento e repicagem adequada para fins de experimentação.

5.5 Presença de acérvulos, setas e peritécios

Presença de acérvulos foi observada para quase todos os isolados, exceto nos isolados 5, 7, 17, 19 e 22. Destes, o 5, 7 e 17 são de coloração rósea e crescimento micelial superficial (Tabela 6). Todos os isolados aqui estudados têm

a característica de produzir conídios a partir de hifas simples e em acérvulos (Figura 6 B e D). Acérvulos dos isolados que ocasionam a mancha manteigosa são de tonalidades cinza e alaranjada e, nos outros isolados, unicamente alaranjada. Isso se deve à produção de massas de esporos dessa coloração.

A produção de setas é comum nos isolados caracterizados. Podem ser encontradas de maneira abundante, como nos isolados 2, 4, 20 e 27 ou de maneira escassa (isolados 8, 9, 10, 11, 12, 16, 18, 21, 23, 24, 25, 26, 31, 33 e 35) (Tabela 6). O tamanho médio das setas foi de $84,2 \times 3\mu\text{m}$ para os isolados que ocasionam a mancha manteigosa e de $68,8 \times 3,6\mu\text{m}$ nos isolados restantes. As setas são retas, diminuindo gradualmente o diâmetro no ápice. A cor das setas é marrom e elas têm septos. Segundo Gunnell & Gubler (1992), o valor taxonômico das setas é ignorado, porém, para os isolados de *Colletotrichum* por eles estudados, foi importante. Sutton (1980) unicamente considera a presença ou ausência como característica para distinção de espécies.

Várzea (1995) menciona que a presença de setas e acérvulos em meio de cultura em isolados de *C. kahawae* não é comum. Nos poucos isolados que apresentam, perdem esta característica depois de repicagens sucessivas. Entretanto, Waller et al. (1993) mencionam que isolados de *C. kahawae* não produzem acérvulos em meio de cultura e utilizam esta característica para distinção de espécies. De acordo com o observado, estas características podem ser utilizadas para distinção de espécies ou isolados de *Colletotrichum* de cafeeiro.

Foram observadas estruturas reprodutivas de *Glomerella cingulata* (Phyllachoraceae), nos isolados 1, 2, 9, 10, 11, 12, 13 e 15 (ocasionam a mancha manteigosa) 5 (coloração rósea) e 29 (ocasiona seca de ponteiros), 10 dias após incubação do fungo em meio MEA 2%. Esta característica é importante porque proporciona variabilidade genética no fungo e possivelmente lhe permite maior adaptabilidade ambiental gerando raças mais virulentas.

TABELA 6 Características culturais e reprodutivas de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro. UFLA, Lavras, 2003.

Isolado	Coloração da colônia	Aspecto	setores	Acér-vulos	Setas	Perité-cios
1	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso	+	+	-	+
2	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso		+	++	+
3	Branca	Cotonoso	+	+	+	-
4	Branca	Cotonoso	+	+	++	*
5	Rósea a salmão	Superficial		-	-	+
6	Cinza-escuro	Cotonoso	+	+	-	-
7	Rósea a salmão	Superficial		-	-	*
8	Cinza-escuro	Cotonoso	+	+	+	-
9	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso	+	+	+	+
10	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso	+	+	+	+
11	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso	+	+	+	+
12	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso	+	+	+	+
13	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso	+	+	-	+
14	Branca	Cotonoso	+	+	-	-
15	Cinza-escuro a esverdeado	Cotonoso	+	+	-	+
16	Cinza-escuro	Cotonoso		+	+	-
17	Rósea a salmão	Superficial		-	-	-
18	Branca	Cotonoso	+	+	+	*
19	Cinza-claro	Cotonoso		-	-	-
20	Cinza a verde-oliva	Cotonoso	+	+	++	-
21	Branca	Cotonoso	+	+	+	-
22	Branca	Cotonoso	+	-	-	-
23	Branca	Cotonoso	+	+	+	-
24	Cinza-claro	Cotonoso	+	+	+	-
25	Branca	Cotonoso	+	+	+	-
26	Esverdeado	Cotonoso	+	+	+	-
27	Esverdeado	Cotonoso	+	+	++	-
28	Cinza-escuro	Cotonoso	+	+	-	-
29	Cinza-escuro	Cotonoso		+	-	+
30	Branca	Cotonoso		+	-	-
31	Branca	Cotonoso	+	+	+	-
32	Cinza a esverdeado	Cotonoso	+	+	-	-
33	Cinza-claro	Cotonoso	+	+	+	-
34	Branca	Cotonoso	+	+	-	-
35	Cinza a esverdeado	Cotonoso	+	+	+	-

+ Presente; ++ Presente em forma abundante; - Ausente; *Formação de peritécios sem presença de ascas, cotonoso = micélio com aspecto de algodão.

O ascoma observado em meio MEA 2%, apresenta-se de forma arredondada ou globosa (Figura 6F), com diâmetro médio de 90,5µm, ascas unitunicadas de 45µm x 9µm, normalmente com oito ascósporos por asca. Ascósporos unicelulares, hialinos, ligeiramente curvados e com ápice arredondado. Tamanho 15 x 5µm. Dimensões e formato destas estruturas estão de acordo com as relatadas para *Glomerella* (Bryson et al., 1992). De acordo com estudos realizados por Várzea (1995), isolados de *C. kahawae* não formaram fase teleomórfica. Entretanto, Waller et al. (1993) não consideraram esta característica para distinção de espécies de *Colletotrichum* spp. associadas a café. Pelo fato desta característica ser muito variável e só ter sido observada em 10 isolados, resulta pouco prática para distinção de espécies e isolados deste gênero.

5.6 Formação e morfologia de apressórios

Conídios de *Colletotrichum* spp. iniciam a germinação entre 5 a 8 horas em água destilada esterilizada a 25°C. A partir do conídio, um ou dois tubos germinativos são formados, ocorrendo a formação de um septo no conídio e um apressório. Esporadicamente foram observados dois apressórios. O crescimento do tubo germinativo foi variável antes da emissão do apressório, 3 a 34µm. Os apressórios desenvolveram-se na extremidade do tubo germinativo ou diretamente do conídio. O tamanho do apressório variou de 7 a 9µm no comprimento e de 6µm a 7µm na largura. Os apressórios são pigmentados, de cor marrom, predominando a forma clavada, raramente subglobosa (Figura 6F) e constante para todos os isolados. Dimensões e formato dos apressórios aqui descritos estão de acordo com as referidas por Sutton (1980) para *C. gloeosporioides*. Segundo Gunnell & Gubler (1992), o apressório produzido em

meio de cultura não é útil para a separação de *Colletotrichum* spp., pois é muito semelhante em tamanho e varia pouco na forma.

De acordo com os resultados, as características morfológicas *in vitro* dos isolados *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro no estado de Minas Gerais foram muito variáveis. Critérios morfológicos de forma individual não constituem critérios absolutos contundentes para fins taxonômicos e separação de espécies deste fitopatógeno na cultura de café. Contudo, algumas características dos isolados que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa são semelhantes a alguns isolados que ocasionam a CBD. Portanto, caracteres morfológicos podem ser utilizados de forma conjunta para a distinção de espécies; a caracterização molecular torna-se uma alternativa importante para alcançar e complementar esse objetivo.

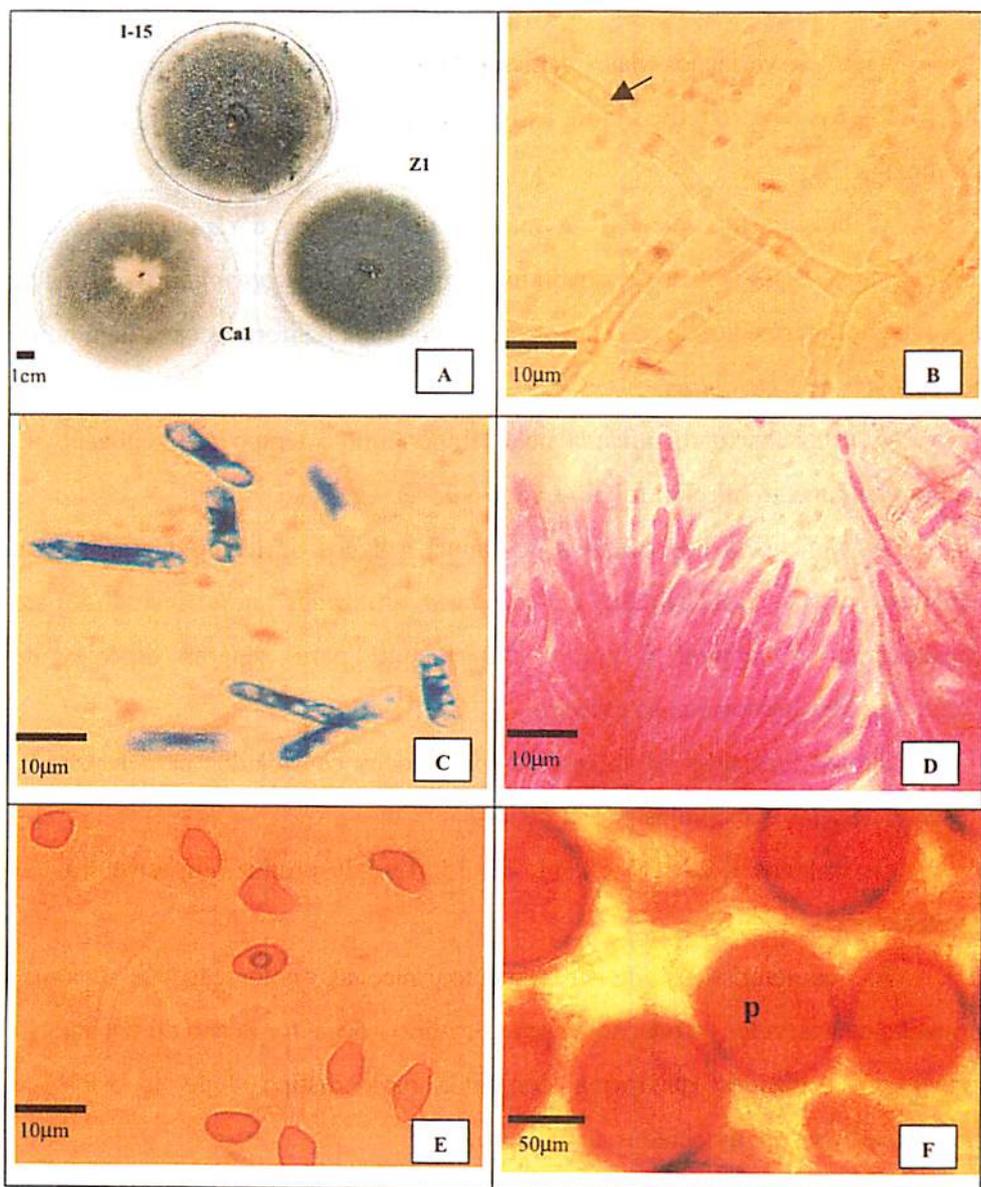


FIGURA 6 A. Coloração de colônias dos isolados Ca1 e Z1 de *Colletotrichum kahawae* e isolado 15 que ocasiona a mancha manteigosa; B. produção de conídios em hifas simples; C. conídios do isolado Z1; D. produção de conídios em fiálides em acérvulos; E. conídios germinados com apressórios; e F. peritécios (p) do isolado 1, que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa.

6 CONCLUSÕES

Houve variação das características morfológicas microscópicas, macroscópicas e reprodutivas entre os isolados de *Colletotrichum* spp. estudados em meio MEA.

O crescimento micelial da maioria dos isolados é rápido. Dada esta característica, esses isolados enquadram-se como *C. gloeosporioides*. Isolados de crescimento intermédio, de coloração rósea e conídios fusiformes os situam como pertencentes a *C. acutatum*.

A esporulação foi afetada pela temperatura e tempo de incubação. O melhor crescimento micelial foi observado a 25°C.

As dimensões dos conídios de alguns isolados de Minas Gerais foram semelhantes aos isolados de *C. kahawae* utilizados neste estudo. Esta característica é variável e não é critério útil para separar espécies de *Colletotrichum* associados ao cafeeiro.

Houve formação de apressórios para todos os isolados caracterizados, presença de setas e acérvulos para a maioria.

Os isolados 1, 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 15 e 29 produziram estruturas da fase teleomórfica.

As características de crescimento micelial, coloração de colônia, formação de acérvulos, produção de setas, esporulação, e formação do teleomorfo podem ser utilizadas de forma conjunta, para distinção de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro.

As características morfológicas e culturais dos isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais enquadram-se nas espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON R. L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease*, St. Paul, v. 83, n. 7, p. 596-608, July 1999.

BRYSON, R. J.; CATEN, C. E.; HOLLOMON, D. W.; BAILEY, J. A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, E M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. London: British Society for Plant Pathology, 1992. p. 27-46.

CANNON, P. F. Definition and diagnosis of *Colletotrichum* species. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, New Zealand. Abstract.... New Zealand: Australiasian Plant Pathology, 2003.

DIAS, M. D. Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

FEITOSA, M. I. et al. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33-54, 1977.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-15, jan. 1967.

GIBBS, J. R. S. Inoculum sources of coffee berry disease. *Annual of Applied Biology*, London, v. 64, n. 3, p. 515-522, Apr. 1969.

GUNNELL, P. S. E.; GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, New York, v. 84, n. 2, p. 157-165, Mar./Apr. 1992.

HINDORF, H. *Colletotrichum* spp. Isolated from *Coffea arabica* L. in Kenya. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Berlin, v. 77, p. 328-331, 1970.

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Oxford, v. 45, n. 6, p. 407-420, Dec. 1994.

NECHET, K. de L.; ABREU, M. S. De. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro, *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUTTON, B. C. *Coelomycetes*. Kew, Surrey: CMI, 1980. 696 p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. London: British Society for Plant Pathology, 1992. p. 1-25.

VÁRZEA, 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, Portugal.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES, C. J. Jr.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology*, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002.

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

CAPÍTULO 3

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Determinação da resistência de cultivares de café e evidenciação de raças fisiológicas no patossistema café x *Colletotrichum gloeosporioides*, no estado de Minas Gerais.** 2003. p. 47-70. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

1 RESUMO

A resistência de cultivares de café a *Colletotrichum* spp. tem sido testada por meio de inoculações de suspensões de conídios em hipocótilos. Objetivou-se, neste trabalho, determinar a resistência de cultivares de café a *Colletotrichum gloeosporioides*, caracterizar a sintomatologia após inoculação, comparar àquela ocasionada por *C. kahawae* e determinar a existência de raças fisiológicas do patógeno. Na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, o delineamento experimental foi em blocos casualizados em parcelas subdivididas, com quatro repetições. Avaliaram-se a incidência e a severidade da doença a cada cinco dias, durante 30 dias após inoculação. Neste ensaio, os primeiros sintomas de necrose nos hipocótilos foram observados aos cinco dias após inoculação. Aos dez dias foi observada morte de plântulas apenas nas cultivares Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo, procedentes de plantas com sintomas de mancha manteigosa. Alguns isolados que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa foram tipificados como patogênicos. Houve diferença significativa entre isolados, cultivares e a interação cultivar x isolado. Esta diferença significativa evidencia a presença de raças deste fitopatógeno. Nas plantas assintomáticas de café foram encontrados 100% de incidência do fungo nos talos, valores variáveis nas folhas cotiledonares e verdadeiras, sendo maior nas primeiras. Todas as cultivares de café testadas no CIFC, Oeiras, Portugal foram suscetíveis ao isolado Ca1 de *C. kahawae*. O período de incubação, sintomatologia e morte de hipocótilos de café foram similares entre os isolados de *C. kahawae* e *Colletotrichum gloeosporioides* do Brasil, nas relações compatíveis. Estudos histopatológicos realizados no CIFC permitiram observar a colonização invasiva de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos.

¹ Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu -UFLA (Orientador)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)
Mário Lúcio Vilela de Resende-UFLA (Co-orientador)

2 ABSTRACT

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Determination of the resistance of coffee cultivars and evidence of physiological races at coffee x *Colletotrichum gloeosporioides* pathosystem, in the state of Minas Gerais.** 2003. p. 47-70. Thesis (Doctorate in Agronomy, Major -Phytopathology)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Resistance of coffee cultivars to *Colletotrichum* spp. has been tested by means of inoculation of suspensions of conidia on hypocotyls. The current work was aimed at determining the resistance of coffee cultivars to *Colletotrichum gloeosporioides*, characterizing the post-inoculation symptomatology compared with that caused by *C. kahawae* and determining the existence of physiological races of the pathogen. At “Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG”, the experimental design was randomized blocks in split plots with four replicates. The incidence and severity of the disease were evaluated every five days during 30 days after inoculation. In this trial, the first symptoms of necrosis on the hypocotyls were observed five days after inoculation. At 10 days, death of seedlings was observed only for cultivars Catucaí Vermelho and Catucaí Amarelo originated from seeds harvested at plants with symptoms of buttery spot. Some isolates, which cause the buttery spot symptom, were typified as pathogenic. There were significant differences among isolates, cultivars and at the cultivar x isolate interaction. This significant interaction is an evidence for the presence of races of this pathogen. At symptomless coffee plants, 100% of incidence of the fungus was detected on stems, variable proportions on cotyledonary and true leaves, being greater in the former ones. All the cultivars tested at “Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro” (CIFC), Oeiras, Portugal were susceptible to the isolate Cal of *C. kahawae*. The incubation period and symptomatology at hypocotyls were similar for isolates of *C. kahawae* and those compatible isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from Brazil. Histopathological studies carried at CIFC allowed to observe the invasive colonization of *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee hypocotyls.

¹Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu (Adviser)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)
Mário Lúcio Vilela de Resende -UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

Testes de resistência de cultivares de café normalmente têm sido realizados pela inoculação de isolados de *Colletotrichum* spp. em hipocótilos de café na fase de "palito de fósforo" (5 a 6 semanas de idade) e a eficiência do método tem sido pesquisada com bons resultados (Murakaru, 1976; van der Vossen et al., 1977; Dorizzotto, 1993; Martínez & Zambrano, 1994; Beynon et al., 1995; Várzea, 1995; Várzea et al., 2002; Orozco et al., 2002; Nechet, 2002).

O conhecimento e detecção de raças fisiológicas em *Colletotrichum kahawae* são de grande importância nos programas de melhoramento do cafeeiro (Várzea, 1995). Nesse contexto, raças desse agente patogênico devem ser incluídas nos testes visando à resistência de cultivares.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a resistência de vários genótipos de café a isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro; caracterizar a sintomatologia após inoculação, comparar àquela ocasionada por *C. kahawae* e determinar a possível existência de raças fisiológicas nos isolados de *Colletotrichum* spp. de MG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados do fungo

Na UFLA foram utilizados 10 isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp., referidos na Tabela 1. Os isolados identificados com os números 1, 2, 11, 12, e 15 ocasionam o sintoma de mancha manteigosa; os isolados 4, 6, 14, 24 e 29 estão associados à antracnose em frutos e seca de ponteiros. No CIFC, em Oeiras, Portugal, foram testados os isolados 12, 15 e comparados aos isolados Z1, Z9, Q2, e Ca1 de *C. kahawae* em hipocótilos de Catucaí Amarelo e Vermelho procedentes de sementes colhidas em plantas com sintoma de mancha manteigosa. O isolado Ca1, proveniente dos Camarões, também foi testado em hipocótilos das cultivares descritas no item 4.2 deste capítulo. Como testemunha foi aplicada água destilada esterilizada.

TABELA 1 Procedência e relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em hipocótilos, na avaliação de resistência de cultivares de café. UFLA, 2002 e no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal, 2003.

Isolado	Órgão	Sintoma	Procedência	Data
1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, UFLA	2001
2	Folha	Mancha manteigosa	Piumhi	2001
4	Fruto	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
6	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
11	Fruto	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
12	Folha	Mancha manteigosa	Poço Fundo	2001
14	Fruto	Antracnose	Poço Fundo	2001
15	Folha	Mancha manteigosa	Turvolândia	2001
24*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
29	Ramo	Seca de ponteiros	Capelinha	2001
Z1	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1991
Z9	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1997
Q2	Fruto	Necrose	Quênia	1989
Ca1	Fruto	Necrose	Camarões ¹	1992

+ Proveniente de planta com sintoma de mancha manteigosa

* Identificado como *C. gloeosporioides* na Universidade Federal de Uberlândia/Depto. Fitopatologia. ¹ Isolados identificados, fornecidos e testados no CIFC.

4.2 Cultivares de café

Foram avaliadas hipocótilos das cultivares Rubi-MG 1192, Acaia Cerrado MG 1474, Catuai Amarelo IAC 62, Catuai Vermelho IAC 99, Mundo Novo IAC 319 - 19, Icatu IAC 3282, Katipó, Catucaí Vermelho, Tupi IAC 1669-33 e Apatã da espécie *C. canephora*. Também foram contemplados no ensaio hipocótilos de Catucaí Amarelo e Vermelho, produzidos a partir de sementes procedentes de frutos colhidos em plantas com sintomas de mancha manteigosa. As sementes foram obtidas no ensaio de avaliação e seleção de progêneses resistentes à ferrugem alaranjada do cafeeiro, projeto BIOEX/CNPq, localizado no campus da UFLA.

4.3 Produção dos hipocótilos

No ensaio realizado na UFLA, sementes das cultivares indicadas no item anterior foram lavadas com água de torneira durante três horas, desinfestadas com álcool 50% por 50 segundos e em hipoclorito de sódio 1% por um minuto e novamente lavadas com água destilada esterilizada. Essas sementes foram colocadas para germinar em bandejas de plástico em papel de filtro umedecido a 25°C. No momento de surgimento da radícula foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax® onde permaneceram por 30 dias. Para a avaliação realizada no CIFC, foi seguido o procedimento de Várzea (1995).

4.4 Inoculação de hipocótilos e delineamento experimental

No ensaio realizado na UFLA foi utilizada a metodologia de van der Vossen et al. (1977) e Várzea (1995) com modificações. Hipocótilos na fase de "palito de fósforo", de três a cinco centímetros, foram inoculados com suspensões de conídios numa concentração aproximada de 2×10^6 conídios mL⁻¹. Os hipocótilos foram mantidos em câmara úmida 24 horas antes da inoculação. As

inoculações foram feitas com o auxílio de um atomizador. Após uma incubação de 48 horas, os hipocótilos foram reinoculados pelo mesmo processo. As bandejas contendo os hipocótilos inoculados permaneceram durante o tempo da avaliação em câmara úmida, em câmara de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Foram inoculados 25 hipocótilos por cultivar utilizada como unidade experimental. O delineamento experimental foi em blocos casualizados em parcelas subdivididas, com quatro repetições. Avaliaram-se a incidência e a severidade da doença a cada cinco dias, tendo sido realizadas seis leituras. No ensaio realizado no CIFC, foi utilizada a metodologia descrita por Várzea (1995). Para este último ensaio, não foi utilizado delineamento experimental.

4.5 Avaliação de hipocótilos, intensidade da doença e susceptibilidade

A leitura de reação para determinação de classes de susceptibilidade para cada cultivar nos hipocótilos inoculados na UFLA foi efetuada 30 dias após a inoculação, segundo a escala de notas de 0 a 4, adaptada no CIFC, por Várzea (1995) (Tabela 2).

TABELA 2 Escala de avaliação utilizada em testes de inoculação de *Colletotrichum* spp. em hipocótilos (escala adaptada por Várzea, 1995), UFLA, Lavras, 2002.

Tipo de reação (classe)	Descrição
0	Ausência de sintomas
1	Pequenas e poucas (1 a 2) lesões cloróticas ou acastanhadas.
2	Mais de 2 lesões acastanhadas ou lesões coalescentes. O diâmetro das lesões excede 0,5 mm. Pontos pretos, quando presentes são raros.
3	Extensas lesões acastanhadas com numerosos pontos pretos e/ou lesões obscuras. As lesões pretas podem rodear completamente o hipocótilo, mas a parte terminal deste permanece viva.
4	Hipocótilo morto.

A interpretação dos resultados foi efetuada por meio do Índice de Intensidade de Doença (IID), calculado pela fórmula:

$$IID = \frac{\sum(N^{\circ} \text{ de hipocótilos em cada classe} \times \text{valor numérico de cada classe})}{\text{Número de hipocótilos em todas as classes} \times 4}$$

De acordo aos valores obtidos para o IID, as cultivares avaliadas com os isolados testados foram classificadas nas seguintes classes de susceptibilidade: resistente (R) $IID \leq 0,25$; moderadamente resistente (MR) $0,25 < IID \leq 0,50$; moderadamente susceptível (MS) $0,50 < IID \leq 0,75$ e susceptível (S) $IID > 0,75$.

4.6 Determinação da patogenicidade por meio de cortes histopatológicos

A partir da inoculação do fungo, foram realizados cortes dos hipocótilos inoculados em diferentes tempos. No estudo foram utilizados materiais das

cultivares Tupi e Catucaí Vermelho, a primeira tipificada como resistente e a outra como suscetível a isolados de *Colletotrichum* spp. de MG, principalmente os que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa. As sementes de Catucaí Vermelho foram provenientes de plantas com esse sintoma. Para a obtenção dos cortes, usou-se a técnica descrita por Rijo & Rodrigues (1978), que consistiu em seccionar hipocótilos com um micrótomo de congelamento; os cortes com espessura de 20-25 μm obtidos foram montados numa mistura clara de azul de algodão em lactofenol. Este último procedimento foi realizado pela Dra. Maria do Céu Silva, no CIFIC.

4.7 Análise estatística

Com os dados de incidência da doença, no ensaio realizado na UFLA, foi realizada análise de variância com o programa SISVAR. Para a comparação de médias utilizou-se o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05\%$). Dados obtidos no CIFIC foram analisados em forma descritiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sintomas e incidência da doença

No ensaio realizado na UFLA, os primeiros sintomas de necrose nos hipocótilos foram observados aos cinco dias após inoculação, apenas nos hipocótilos das cultivares Catucaí Vermelho (C11) e Catucaí Amarelo (C12), procedentes de plantas com sintomas de mancha manteigosa (MM) e inoculados com os isolados 1, 2, 11, 12 e 15, os quais ocasionam o sintoma de MM. Aos dez dias após a inoculação, foi observada alta incidência de morte de plântulas, sendo, portanto, considerada uma reação compatível (Figura 1A-B).

Em testes realizados no CIFC, com hipocótilos das mesmas cultivares e inoculados com os isolados Ca1, Z9, Z1 e Q2 de *C. kahawae*, ocorreram situações similares. Sintomas de necrose foram observados aos quatro dias após inoculação e morte de hipocótilos foi observada aos dez dias após inoculação. Os isolados Z9 e Ca1 de *C. kahawae* ocasionaram 100% de morte dos hipocótilos entre 15 a 20 dias após inoculação. Portanto, sintoma de necrose, tempo de aparecimento dos sintomas e morte de hipocótilos ocasionada por isolados de *C. kahawae* e *Colletotrichum* spp. de MG acontecem de forma análoga em cultivares de café suscetíveis a MM. Estas informações são concordantes com as observações realizadas com outros isolados e cultivares (Várzea, 1995; Beynon et al., 1995). Na Figura 2 exemplifica-se a evolução da doença com dois tipos de isolados: os originários do Brasil e os que ocasionam a CBD. Os hipocótilos utilizados eram da cultivar Catucaí Amarelo, cujas sementes originaram-se de plantas com sintoma de MM.

Na Figura 3 é apresentado um resumo dos hipocótilos mortos, observado 30 dias após inoculação dos isolados para todas as cultivares incluídas na UFLA. Observa-se que existem cultivares resistentes a alguns isolados inoculados; desta

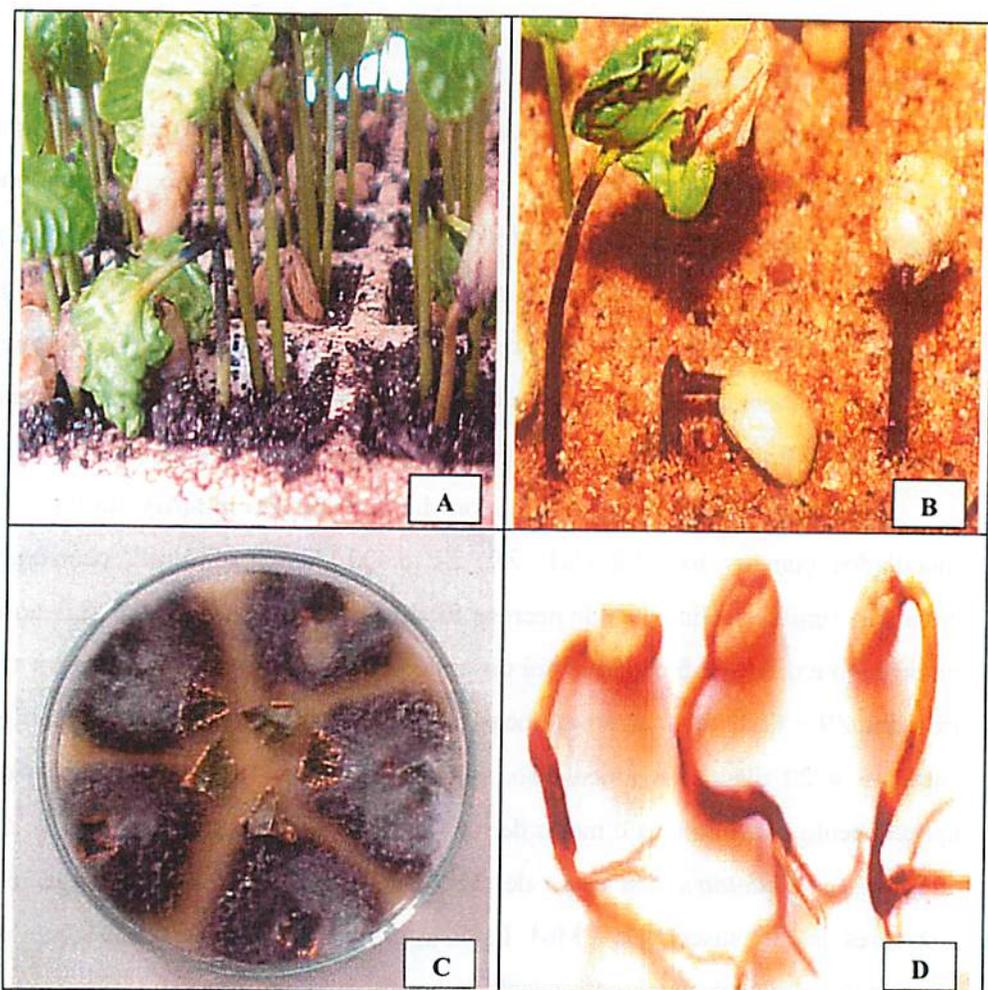
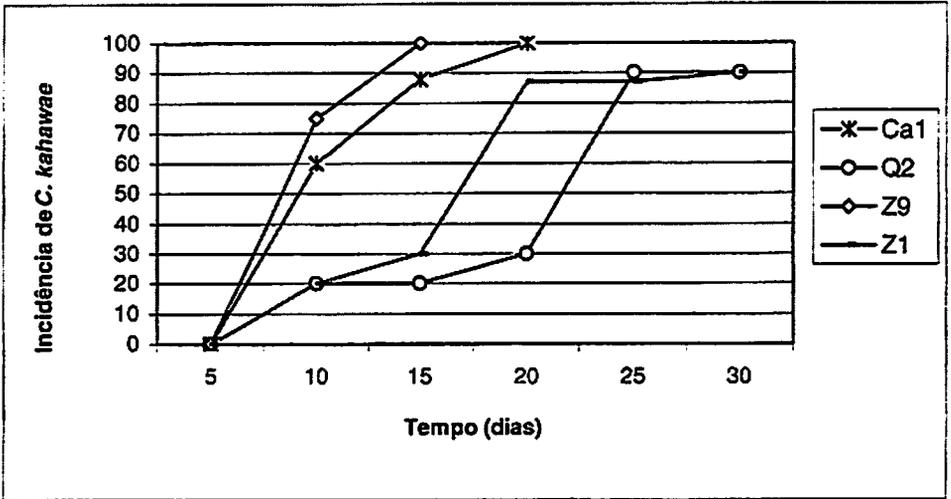
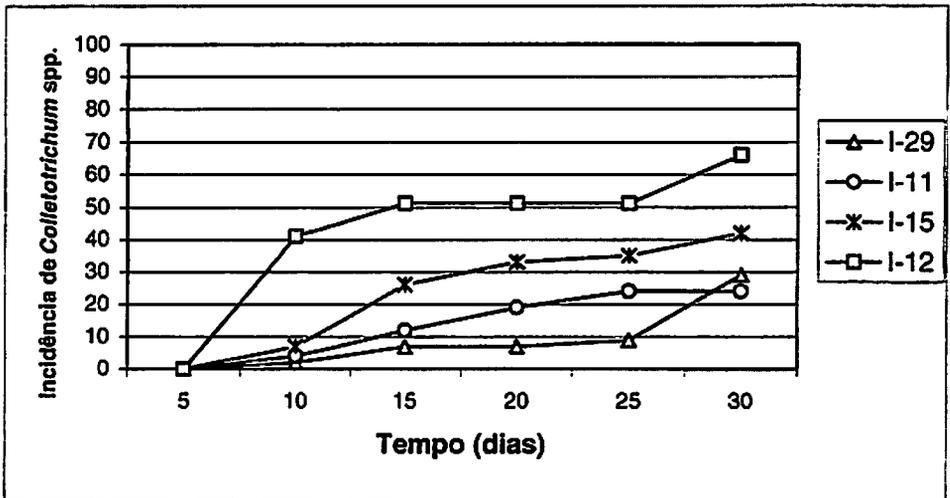


FIGURA 1 Inoculação de isolados de *Colletotrichum* spp. em hypocótilos de café: (A) hypocótilos suscetíveis da cultivar Catucaí Vermelho procedentes de sementes colhidas de plantas com sintomas de mancha manteigosa (CVMM) dez dias após inoculação; (B) sintomas de necrose e morte de hypocótilos ocasionados por *Colletotrichum* spp. com o isolado 12 procedente do Brasil; (C) re-isolamento de *Colletotrichum* spp. a partir de fragmentos de folhas verdadeiras (no centro) e cotilédones (na beira), de plantas assintomáticas; (D) sintoma de necrose em hypocótilos da CVMM ocasionado pelo isolado Ca1 de *C. kahawae*.



A



B

FIGURA 2 Evolução da incidência da doença após inoculação de isolados de *Colletotrichum kahawae* (A) ensaio no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro e *Colletotrichum* spp. (B) na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Teste realizado em hipocótilos de café Catucaí Amarelo, procedentes de plantas com sintoma de mancha manteigosa. Isolados 11, 15 e 12 provocam sintoma de mancha manteigosa. Isolado 29 ocasiona seca de ponteiros e Z1, Z9, Ca1 e Q2 ocasionam a CBD na África.

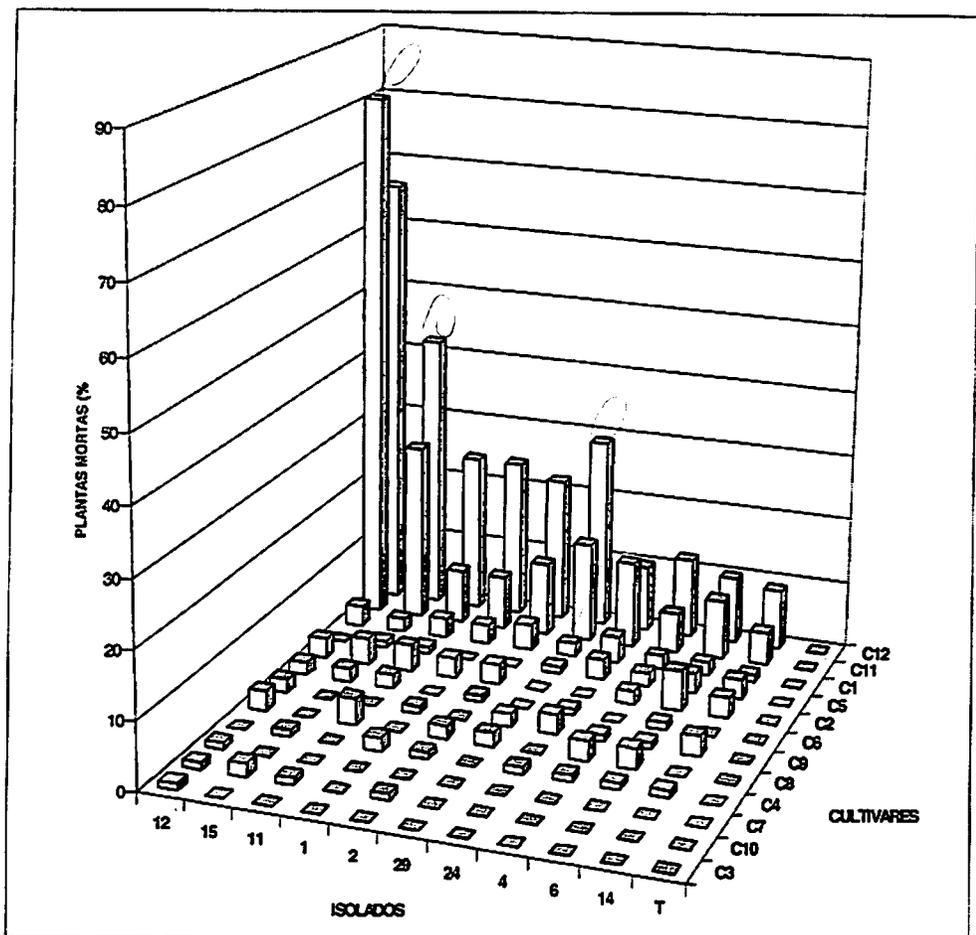


FIGURA 3 Número de plantas mortas 30 dias após inoculação dos isolados de *Colletotrichum* spp. em hipocótilos de café nas cultivares: C1 = Icatu, C2 = Catuaí Vermelho, C3 = Tupi, C4 = Katipó, C5 = Mundo Novo, C6 = Acaiaí Cerrado, C7 = Catucaí, C8=Rubi, C9 = Catuaí Amarelo, C10 = Apoatã, C11 = Catucaí Vermelho e C = 12 Catucaí Amarelo. Nas cultivares C11 e C12 as sementes foram procedentes de plantas com sintomas de mancha manteigosa. UFLA, 2002.

maneira, relações incompatíveis podem ser encontradas. Esta informação é concordante com as observações de Orozco et al. (2002).

De acordo com o critério de Waller et al. (1993), consideram-se patogênicos os isolados 12 e 15 na cultivar Catucaí Vermelho (C11) e os isolados 1, 11, 12, 15 e 29 quando inoculados em hipocótilos de Catucaí Amarelo (C12), ambas provenientes de plantas com sintomas de MM. Os isolados restantes são considerados não patogênicos (Tabela 3). Os isolados 1, 11, 12 e 15 foram provenientes de plantas com sintomas de MM e o isolado 29 ocasionando sintoma de seca de ponteiros em plantações de café em MG. Os isolados de *C. kahawae*, utilizando-se o mesmo critério, foram considerados patogênicos quando inoculados nas cultivares C11 e C12. O isolado Ca1 da espécie *C. kahawae*, que é considerado virulento no CIFC, foi testado posteriormente para várias cultivares e ocasionou altas porcentagens de morte de hipocótilos nas cultivares: Icatu, Catuaí, Catuaí Amarelo, Mundo Novo, Acaiaí Cerrado, Rubi, Katipó, Tupi e Catucaí Vermelho, assim é considerado patogênico

Os resultados obtidos na UFLA são contrastantes com os critérios de Waller et al. (1993) na distinção de isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de MG e considerados neste estudo como patogênicos. Estes autores mencionam que unicamente isolados de *C. kahawae* são patogênicos em hipocótilos de café, sendo, portanto um critério não eficiente para esse fim.

5.2 Classes de suscetibilidade por meio do índice de intensidade de doença

Com base no critério de classes de suscetibilidade, as cultivares Catucaí Vermelho, Icatu, Catuaí Vermelho e Amarelo, Mundo Novo, Acaiaí Cerrado, Rubi, Katipó, Tupi e Catucaí Vermelho e Amarelo, provenientes de plantas com sintomas de MM foram suscetíveis ao isolado Ca1 de *C. kahawae*. Para os

isolados de MG, unicamente foram tipificadas como suscetíveis as cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo provenientes de plantas com sintomas de MM quando inoculadas com os isolados 1, 2, 4, 11, 12, 15, 24 e 29 (Tabela 4). A cultivar Icatu é considerada medianamente resistente para todos os isolados testados. As cultivares Catucaí e Tupi são resistentes a todos os isolados, exceto para o isolado 12. Este critério de tipificação por suscetibilidade permitiu fazer uma melhor diferenciação, dado que é mais flexível.

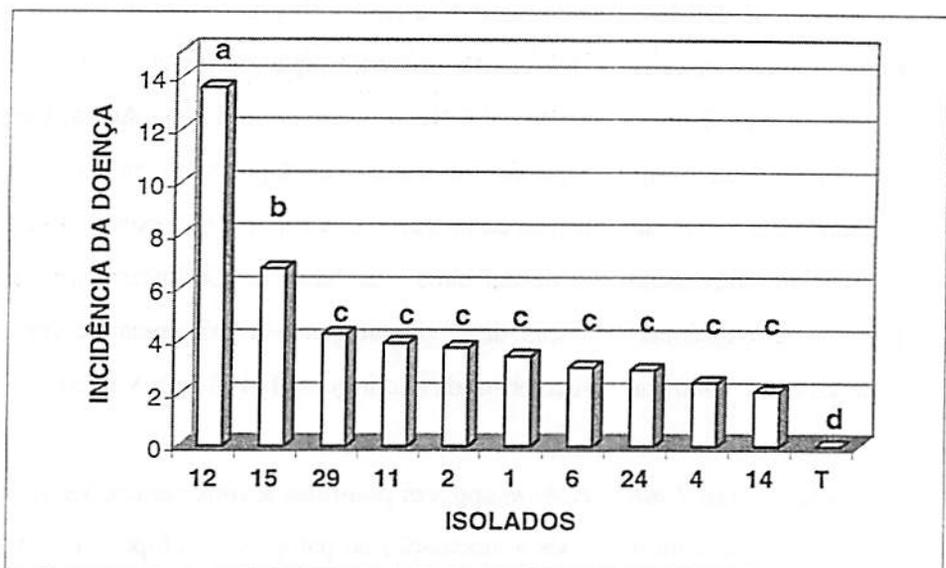
De acordo com os resultados e critérios utilizados na análise, nos isolados associados ao cafeeiro em MG existem aqueles considerados patogênicos em hipocótilos das cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo procedentes de plantas com sintoma de MM. Estes isolados foram obtidos de plantas com o sintoma de MM e seca de ponteiros, como o isolado 29. Isto mostra que, nesta interação, existem relações compatíveis e a existência de raças do patógeno. A susceptibilidade nessas cultivares de café é um caráter genético hereditário. Este último aspecto também foi observado por Vargas & Gonzalez (1972). Aqueles que foram considerados não patogênicos não ocasionam sintomas. Na maioria das cultivares neste estudo contempladas existem diferentes níveis de resistência para isolados de *Colletotrichum* spp. Mas, de acordo com as inoculações realizadas no CIFC, estas cultivares são suscetíveis a *C. kahawae*, situação que necessita ser considerada nos programas de melhoramento.

Na análise de variância da incidência da doença, houve diferença significativa entre isolados (I), cultivares (C) e a interação C x I ($p \leq 0,05$). Na comparação de médias para I de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de quatro grupos (Figura 4A). O isolado 12 ocasionou o maior número de morte de hipocótilos. Este é procedente de Poço Fundo e obtido a partir de uma planta com sintomas de MM. As cultivares Catucaí Amarelo e Vermelho, cujos hipocótilos foram procedentes de sementes retiradas de plantas

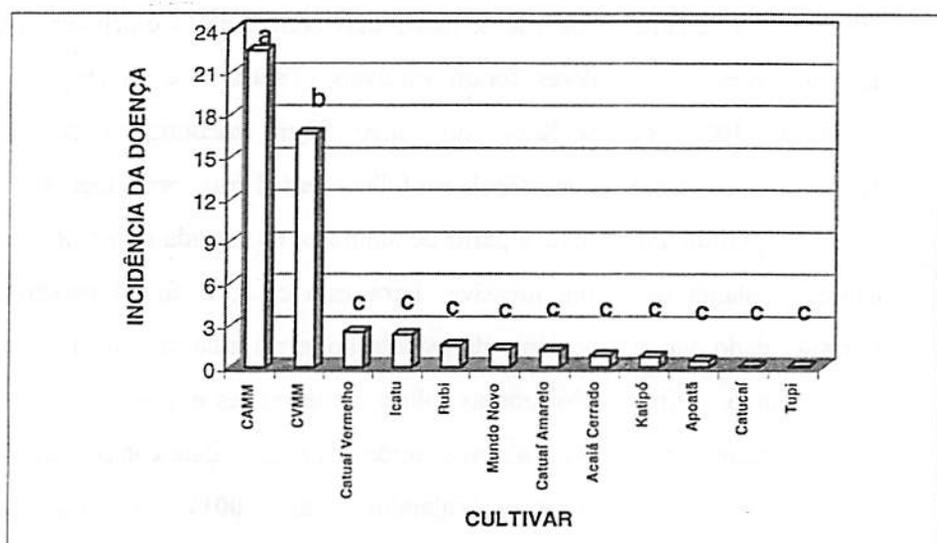
com sintomas de MM, diferem entre si e das cultivares restantes (Figura 4B) e foram as mais suscetíveis. Não existe diferença significativa entre as cultivares Catuaí, Icatu, Tupi, Rubi, Mundo Novo, Catuaí Amarelo, Acaia Cerrado, Katipó, Catucaí e Apoatã quanto ao número de hipocótilos mortos, para os isolados testados. A significância da interação C x I indica que existem interações diferenciais entre genótipos de cafeeiros e isolados de *Colletotrichum* spp. e, portanto, a existência de raças deste fitopatógeno. A existência de raças em isolados de *C. kahawae* foi demonstrada (Rodrigues et al., 1992; Várzea, 1995).

5.3 Incidência de *Colletotrichum* spp. em plântulas assintomáticas de café

Aos sessenta dias após a inoculação do patógeno nos hipocótilos de café na UFLA, a incidência de *Colletotrichum* spp. na haste das plântulas assintomáticas de café foi de 100%. Nas folhas cotiledonares e primeiro par de folhas verdadeiras, os valores foram variáveis (Tabela 5 e 6) (Figura 1C). Valores de 100% de incidência do fungo foram encontrados nas folhas cotiledonares; os valores de incidência em folhas verdadeiras foram menores. Esta informação permite inferir que, a partir de um ponto de entrada do patógeno, este coloniza a planta de forma invasiva. Para este caso, o fungo penetrou no hipocótilo, dado que, no momento da inoculação, a plântula não tinha folhas. A partir de então, o fungo colonizou as folhas cotiledonares e, após colonizou em forma ascendente em direção dos novos tecidos da planta. Este comportamento já foi observado em *C. truncatum* (Talamini et al., 2001) e *C. graminicola* (Bergstrom e Nicholson, 1999). Infecção latente e incidência variável de *Colletotrichum* spp., dependendo do órgão da planta, já foram relatados em café (Rayner, 1948). Latência tem sido relatada em tecidos inoculados durante um rápido crescimento vegetativo e como fator de sobrevivência (Bergstrom & Nicholson, 1999).



A



B

FIGURA 4 Análise combinada da resistência de 12 cultivares de café a *Colletotrichum* spp. (A) incidência da doença (hipocótilos mortos) de acordo com os isolados; (B) incidência da doença de acordo com as cultivares. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). CVMM e CMM = Caturaf Vermelho e Amarelo procedente de plantas com sintomas de mancha manteigosa.

TABELA 3 Relação de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. de acordo com testes com hipocótilos de café, segundo o critério de Waller et al. (1993)¹. UFLA, Lavras, 2002 e Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) Oeiras, Portugal, 2003.

CULTIVAR	ISOLADOS										
	1	2	4	6	11	12	14	15	24	29	Cal
Catucaí Vermelho mm	Np	Np	Np	Np	Np	P	Np	P	Np	Np	P
Catucaí Amarelo mm*	P	Np	Np	Np	P	P	Np	P	Np	P	P
Catucaí	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Icatu	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Catuai	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Catuai Amarelo	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Mundo Novo	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Acaia Cerrado	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Rubi	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Katipó	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Tupi	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	P
Apoatã**	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	Np	-

¹Os isolados são considerados patogênicos quando ocorre mais de 25% de plântulas mortas.

P = patogênico Np = Não patogênico.

*mm = hipocótilos provenientes de sementes colhidas de plantas com sintoma de mancha manteigosa

**Cultivar de *Coffea canephora*.

Isolado Cal foi fornecido e testado no CIFC em 2003.

TABELA 4 Classes de susceptibilidade de cultivares de café que mostraram interação com os isolados de *Colletotrichum* spp. em testes com hipocótilos de acordo com a escala adaptada por Várzea (1995), Universidade de Lavras, 2002 e Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) Oeiras, Portugal, 2003.

CULTIVAR	ISOLADOS										
	1	2	4	6	11	12	14	15	24	29	Ca1
Catucaí Vermelho mm	S	S	S	Mr	Mr	S	S	Ms	S	S	S
Catucaí Amarelo mm*	S	S	Ms	Mr	S	S	Ms	S	S	S	S
Catucaí	R	R	R	R	R	Mr	R	R	R	R	S
Icatu	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	S
Catuai	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Ms	Mr	R	R	S
Catuai Amarelo	Mr	R	Mr	Mr	R	Mr	Mr	R	Mr	Mr	S
Mundo Novo	R	R	Mr	Mr	Mr	R	Mr	Mr	Mr	Mr	S
Acaia Cerrado	R	Mr	R	Mr	Mr	Mr	R	Mr	Mr	R	S
Rubi	R	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	R	R	R	Mr	S
Katipó	Mr	Mr	Mr	Mr	R	R	Mr	Mr	Mr	R	S
Tupi	R	R	R	R	R	Mr	R	R	R	R	S
Apoatã**	R	Mr	R	R	Mr	Mr	R	Mr	R	R	-

R = resistente, Mr = moderadamente resistente, Ms = moderadamente susceptível, S = susceptível; *mm= hipocótilos provenientes de plantas com sintomas de mancha manteigosa; **Cultivar de *Coffea canephora*; Isolado Ca1 foi fornecido e testado no CIFC.

TABELA 5 Percentagens de incidência de *Colletotrichum* spp. em folhas cotiledonares de plântulas assintomáticas de café. Os isolamentos foram realizados a partir de fragmentos de folhas em meio BDA, sessenta dias após inoculação do fungo. Médias de 40 plantas amostradas por cultivar. UFLA, Lavras, 2002.

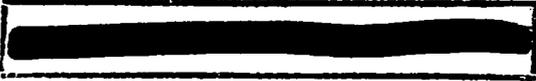
CULTIVARES	ISOLADOS										
	12	1	29	6	14	15	4	11	24	2	T
Icatu	100	60	33	70	95	100	90	80	70	30	0
Catuaí Vermelho	95	55	30	60	95	100	80	60	60	30	0
Tupi	85	75	45	65	60	65	100	20	70	50	0
Katipó	95	80	45	70	100	100	100	40	80	30	0
Mundo Novo	90	70	35	70	85	95	90	50	80	20	0
Acaia Cerrado	95	75	40	90	95	100	100	50	60	50	0
Catucaí	95	70	35	70	90	95	90	30	70	30	0
Rubi	85	70	38	65	95	100	70	30	90	50	0
Catuaí Amarelo	95	45	25	50	85	95	80	30	90	40	0
Apoatã	90	60	35	80	75	80	80	40	70	10	0

T= testemunha (sem aplicação do fungo)

TABELA 6 Percentagens de incidência de *Colletotrichum* spp. no primeiro par de folhas verdadeiras em plântulas assintomáticas de café. Os isolamentos foram realizados a partir de fragmentos de folhas em meio BDA, sessenta dias após inoculação do fungo. Médias de 40 plantas amostradas por cultivar. UFLA, Lavras, 2002.

CULTIVARES	ISOLADOS										
	12	1	29	6	14	15	4	11	24	2	T
Icatu	15	5	10	10	5	10	10	60	0	10	0
Catuaí	40	5	5	5	5	30	0	0	0	0	0
Tupi	25	15	5	10	5	60	50	0	10	0	0
Katipó	30	10	10	15	5	30	10	20	10	0	0
Mundo novo	20	0	5	5	10	30	10	0	10	0	0
Acaia cerrado	5	5	20	5	15	50	50	0	0	20	0
Catucaí	25	0	5	10	5	20	20	0	0	10	0
Rubi	10	5	15	10	15	20	10	20	10	10	0
Catuaí Amarelo	25	5	5	10	10	20	0	0	0	0	0
Apoatã	10	10	5	5	5	10	30	0	0	0	0

T= testemunha (sem aplicação do fungo)



5.4 Cortes histopatológicos e patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em café

Nove dias após inoculação de *Colletotrichum* spp. com o isolado 12 em hipocótilos susceptíveis de café da cultivar Catucaí Vermelho, foram observadas lesões pretas nos hipocótilos e esporulação do fungo.

Os cortes transversais destes hipocótilos doentes mostram que o fungo infecta a planta. As hifas do fungo colonizam os tecidos, provocando necrose e morte (Figuras 7 A-D). Cortes transversais de hipocótilos de café da cultivar Tupi considerada resistente e inoculados com o mesmo patógeno mostram que, aos dez dias após inoculação, apresentam formação de sintomas de lesões tipo crosta ("scab lesion"). Este, possivelmente, é um mecanismo de resistência ao ataque do patógeno (Figura 7E-F)

Estes resultados são concordantes aos relatos de Orozco et al. (2002). Estes autores mencionam que no patossistema *Colletotrichum* spp. café no Brasil, existem relações compatíveis e incompatíveis. Assim como demonstrado por meio destas pesquisas, nas lavouras de café no Brasil existem isolados patogênicos de *Colletotrichum* spp., situação que merece atenção.

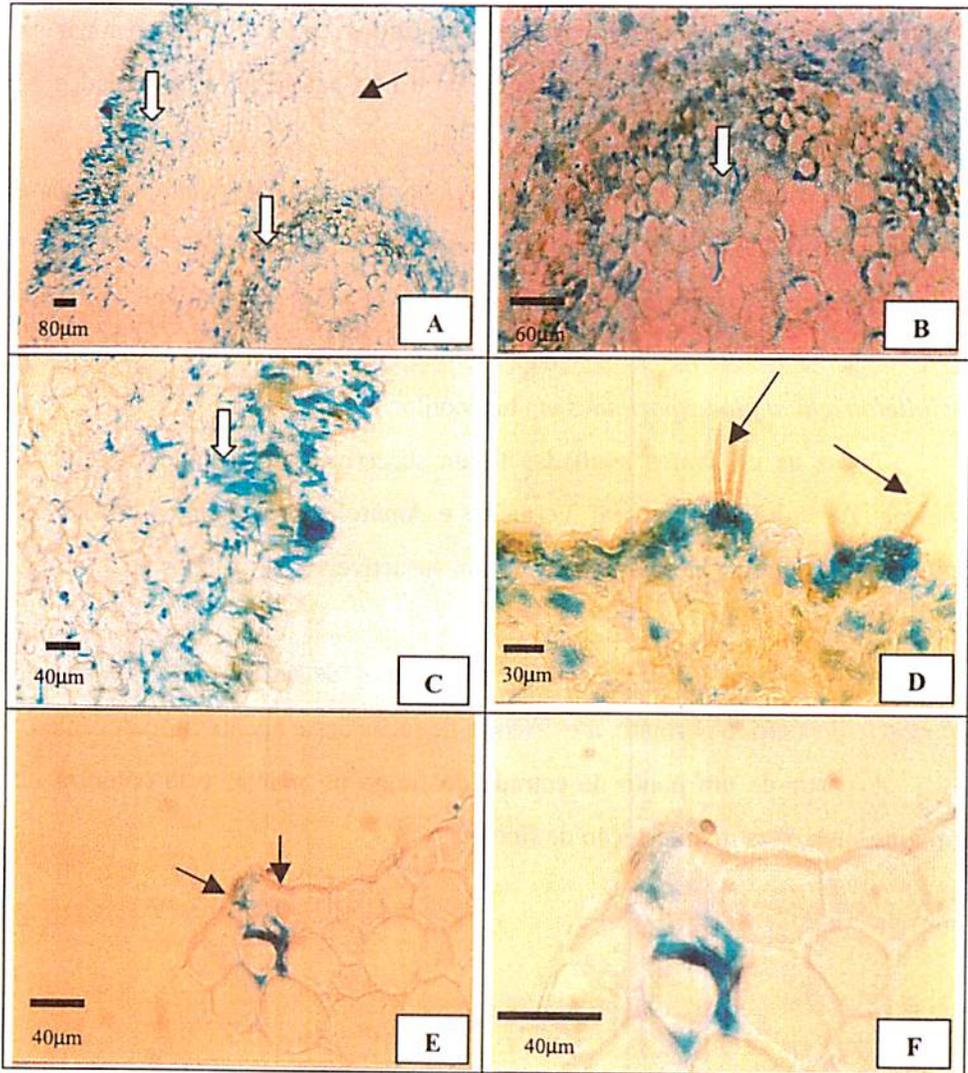


FIGURA 7 Corte transversal de hipocótilos suscetíveis de café Catucaí Vermelho infectados por *Colletotrichum* spp, isolado 12 que ocasiona a mancha manteigosa. A. seta preta sinaliza tecido vivo e as brancas as hifas do fungo e células necrosadas, aos nove dias após inoculação; B-C Detalhe da foto A; D. tecidos necrosados, setas sinalizam acérvulos; E. seção transversal de um hipocótilo da cultivar Tupi, com resistência ao patógeno, 10 dias após inoculação com o mesmo isolado, observam-se sintomas de lesões tipo crosta ("scab lesion"); F. Detalhe da foto E, setas sinalizam a crosta formada. Fotos A-F; efectuados por Dra. Maria do Céu Silva, CIFC.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os critérios utilizados para se determinar a patogenicidade, existem isolados patogênicos e não patogênicos, associados ao cafeeiro em Minas Gerais, Brasil.

Após a inoculação do fungo, O período de incubação, sintomatologia e morte de hipocótilos de café foram similares entre os isolados de *C. kahawae* e *Colletotrichum gloeosporioides* do Brasil, nas relações compatíveis. Estudos histopatológicos realizados no CIFC permitiram observar a colonização invasiva de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos.

Todas as cultivares avaliadas foram suscetíveis ao isolado Ca1 de *C. kahawae*. As cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo, provenientes de plantas com sintomas de mancha manteigosa, foram suscetíveis aos isolados 1, 2, 4, 11, 12, 15, 24 e 29.

Houve interação diferencial entre genótipos de cafeeiros e isolados de *Colletotrichum* spp. e portanto, a existência de raças deste agente fitopatogênico.

A partir de um ponto de entrada do fungo na planta, este coloniza de forma invasiva, sem manifestação de sintomas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEYNON, S. M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, B. G.; VÁRZEA, V. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, n. 6, p. 457-476, June 1995.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 7, p. 596-608, July 1999.

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

MARTÍNEZ, M.; ZAMBRANO, C. Identificación y patogenicidad de cepas del género *Colletotrichum* asociados al cultivo del café *Coffea arabica* L. en la región del centro occidental de Venezuela. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 44, n. 4, p. 567-577, oct./dic. 1994.

MURAKARU, G. N. W. Influence of age of coffee seedlings on infection by *Colletotrichum coffeanum* (Noack) (*Glomerella cingulata*) (Stonem) Sapauld e von Schrenk. **Kenya Coffee**, Nairobi, v. 41, n. 479, p. 55-57, 1976.

NECHET, K. de L.; ABREU, M. S. de. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

OROZCO MIRANDA, E. F.; PIGOZZO, P.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. de. Estudo das relações compatíveis e incompatíveis de *Colletotrichum* spp. x cafeeiro. In: CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras. **Anais....** Lavras, MG: UFLA/APG, 2002.

RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. **Nature**, London, v. 161, n. 4085, p. 245-246, Feb. 1948.

RODRIGUES, Jr., C. J.; VÁRZEA, V. M. P.; MEDEIROS, E. F. Evidence for the existence of physiological races of *Colletotrichum coffeanum* Noack *sensu* Hindorf. **Kenya Coffee**, NAirobi, v. 57, n. 672, p. 1417-1420, 1992.

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; MACHADO J.; OLIVEIRA, F. A. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidas por sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 219-248, 2001.

van der VOSSSEN, H. A. M.; KOOK, R. T. A.; MURAKARU, G. N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noak (Sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. **Kenya Coffee**, Nairobi, v. 42, n. 493, p. 133-144, 1977.

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

VÁRZEA, 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, Portugal.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES, C. J. Jr.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002.

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

CAPÍTULO 4

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. e *C. kahawae* em frutos de café.** 2003. p. 71-87 Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

1 RESUMO

Testes de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. têm sido realizados por meio de inoculações de suspensões de conídios em frutos verdes de café na fase de desenvolvimento. Objetivou-se, nesta pesquisa, determinar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos de café de diferentes cultivares, caracterizar os sintomas após inoculação e comparar àquela ocasionada por *C. kahawae*. Os ensaios foram realizados na UFLA, Lavras, Minas Gerais, em 2002 e no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal, em 2003. As porcentagens de frutos necrosados e período de incubação foram variáveis de acordo com isolados e cultivares. Na UFLA, os primeiros sintomas de necrose em frutos inoculados foram observados entre 6 a 9 dias após inoculação. Valores máximos de 28% de frutos necrosados foram observados 15 dias após inoculação com o isolado 21 na cultivar Catuaí Amarelo e de 25% com os isolados 11, 12, 13 e 15 na cultivar Mundo Novo. Estes últimos isolados ocasionam o sintoma de mancha manteigosa. Houve diferença significativa entre isolados, cultivares e a interação cultivar x isolado. Na avaliação realizada no CIFC, sintomas de necrose em frutos de café foram observados aos 4 e aos 7 dias, para os isolados que ocasionam a CBD. Para isolados procedentes de MG, os sintomas manifestaram-se 9 dias após inoculação. Os isolados que ocasionam a CBD manifestaram 100% de incidência de necrose nos frutos na cultivar Catuaí. Contudo, o isolado 15, que ocasiona sintomas de mancha manteigosa, manifestou 83% de incidência de necrose em frutos na mesma cultivar. Os sintomas de necrose foram similares para os isolados que ocasionam a CBD e os que ocasionam a mancha manteigosa. Outro sintoma observado após inoculação do fungo é o amadurecimento rápido que ocorre nos frutos sem sintomas de necrose; aqueles utilizados como testemunha permanecem verdes.

¹ Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu -UFLA (Orientador)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)
Mário Lúcio Vilela de Resende-UFLA (Co-orientador)

2 ABSTRACT

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Pathogenicity of isolates of *Colletotrichum* spp. e *C. kahawae* in coffee berries.** 2003. p. 71-87 Thesis (Doctorate in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Pathogenicity tests of *Colletotrichum* spp. have been accomplished by means of suspension inoculations of conidia in unripe coffee berries in the developmental phase. The current work was aimed at determining the pathogenicity of isolates of *Colletotrichum* spp. on coffee berries of different cultivars, characterizing the post-inoculation symptoms and comparing them to that brought about by *C. kahawae*. Two trials were conducted at UFLA in Lavras, Minas Gerais, in 2002 and in the “Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro” (CIFC), Oeiras, Portugal, in 2003. The percentages of necrosed berries and incubation period were variable according to isolates and cultivars. At UFLA, the first necrosis symptoms on inoculated berries were noticed between 6 to 9 days after inoculation. Maximum values of 28% of necrosed berries were observed 15 days after inoculation with the isolate 21 on the cultivar Catuai Amarelo and of 25% with isolates 11, 12, 13 and 15 on the cultivar Mundo Novo. These latter isolates cause symptoms of buttery spot. There was a significant difference among isolates, cultivars and within the interaction isolate x cultivar. At CIFC, necrosis symptoms on coffee berries were observed at 4 and 7 days for the isolates which caused CBD. For isolates from MG, the symptoms occurred 9 days after inoculation. The isolates, which caused CBD, gave rise to 100% of incidence of necrosis on berries of the cultivar Catuai. However, isolate 15, which causes symptoms of buttery spot displayed 83% of incidence of necrosis on berries of the same cultivar. The necrosis symptoms were similar for all isolates. Another symptom found after inoculation was the fast ripening occurring on berries without necrosis symptoms; those utilized as control remained unripe.

¹Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu (Adviser)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-adviser)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-adviser)
Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

A patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. tem sido relatada em várias ocasiões. Este fungo tem causado problemas de necrose em cafeeiro em condições de campo. Em ensaios de laboratório, têm sido observado em inoculações em frutos verdes de café na fase de desenvolvimento, diferentes comportamentos (Vargas & Gonzalez, 1972; Dorizzoto, 1993; Várzea, 1995; Nechet & Abreu, 2002; Almeida et al., 1979; Figueredo & Mariotto, 1978). Variabilidade genética entre isolados que ocasionam a doença denominada "coffee berry disease" (CBD) infectando frutos de um local a outro também já foi demonstrada (Várzea, 1995; Rodrigues et al., 1991).

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos de café de diferentes cultivares e caracterizar a sintomatologia após inoculação e comparar àquela ocasionada por *C. kahawae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados do fungo

Foram realizados dois ensaios. O primeiro na UFLA, MG em 2002, utilizando-se 27 isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp. referidos na Tabela 1. Os isolados identificados com os números 22 a 28 foram obtidos no Departamento de Fitopatologia na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os isolados 22, 23, 24 e 25 foram determinados na UFU como *C. gloeosporioides*. Os restantes foram coletados em vários locais de MG.

O segundo ensaio foi realizado no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal, em 2003. Nesse centro de pesquisa foi avaliada a patogenicidade dos isolados 12, 15, 29 e 36, procedentes de MG e Ca1 e Z9, os quais ocasionam a CBD e foram fornecidos no CIFC (Tabela 1).

4.2 Cultivares de café

Na UFLA, foram usados frutos verdes destacados das cultivares: Rubi-MG 1192, Acaiá Cerrado MG 1474, Catuai Amarelo IAC 62, Catuai Vermelho IAC 99, Mundo Novo IAC 319 - 19, Icatu IAC 3282, Katipó, Catucaí Vermelho, Tupi IAC 1669-33 e Apoatã da espécie *C. canephora*. No CIFC, utilizaram-se frutos verdes destacados de *C. arabica* da cultivar Catuai, considerada susceptível ao *C. kahawae*.

4.3 Inóculo do fungo

O inóculo foi obtido do plaqueamento dos isolados em meio MEA 2%. As culturas foram crescidas à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, para o estudo UFLA/2002. No ensaio realizado no CIFC, os isolados cresceram em placas de Petri no meio de cultura gelose de extracto de malte 3,4%. As placas com os isolamentos foram mantidas a 23°C.

TABELA 1 Relação e procedência dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados em testes de patogenicidade em frutos, na UFLA, Lavras (2002) e no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal, 2003.

Isolado	Órgão	Sintoma	Procedência	Data
1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, UFLA	2001
2	Folha	Mancha manteigosa	Piumhi	2001
3	Folha	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
4	Fruto	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
5	Folha	Necrose	Ouro Fino	2001
6	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
7	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
8	Ramo	Necrose	Boa Esperança	1998
9	Folha	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
10	Ramo	Seca de ponteiros ⁺	Nepomuceno	2001
11	Fruto	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
12 ²	Folha	Mancha manteigosa	Poço Fundo	2001
13	Fruto	Antracnose ⁺	Poço Fundo	2001
14	Fruto	Antracnose	Poço Fundo	2001
15 ²	Folha	Mancha manteigosa	Turvolândia	2001
16	Ramo	Necrose	Ibituruna	1998
18	Ramo	Necrose	Varginha	1998
19	Ramo	Necrose	Patrocínio	1999
20	Folha	Necrose	Guaxupé	1998
21	Folha	Necrose	Piumhui	1998
22	Fruto	Necrose	Araguari	1998
23*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
24*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
25*	Fruto	Necrose	Canaã	1998
26	Fruto	Necrose	Teixeiras	1998
27	Fruto	Necrose	Patrocínio	1998
28	Fruto	Necrose	Araguari	1998
29 ²	Ramo	Seca de ponteiros	Capelinha	2001
36 ²	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, UFLA	2002
Ch	Fruto	Necrose	China ¹	1994
Z1	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1991
Z9 ²	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1997
Cal ²	Fruto	Necrose	Camarões ¹	1992

+ Proveniente de planta com sintoma de mancha manteigosa

* Isolados identificados como *C. gloeosporioides* na UFU/Depto. Fitopatologia.

¹Isolados identificados e fornecidos no CIFC

²Isolados incluídos em ensaios de patogenicidade em frutos da cultivar Catuaí no CIFC.

4.4 Inoculação de frutos verdes destacados

Para o ensaio realizado na UFLA/2002, foram utilizados frutos verdes colhidos de plantas de café em fase de experimentação, nas quais não foram aplicados fungicidas (projeto BIOEX/CNPq localizado no campus da UFLA). Os frutos colhidos no campo foram levados ao laboratório, desinfestados com álcool 50% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por um minuto e lavados com água destilada esterelizada. Aqueles que apresentaram lesões foram descartados. Os frutos foram colocados em caixas plásticas (40 x 25 cm) previamente desinfestadas com álcool 50% e hipoclorito de sódio 2%, contendo areia úmida esterelizada em autoclave. A inoculação foi realizada pela pulverização dos frutos com suspensão de esporos numa concentração de 2×10^6 conídios mL^{-1} , com um pulverizador manual tipo De Vilbis. Os frutos utilizados como testemunha foram inoculados com água destilada esterelizada. Após inoculação, os frutos foram colocados em câmara úmida. O experimento foi conduzido em câmara climatizada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em parcelas subdivididas com três repetições. A unidade experimental foi constituída de 40 frutos colocados a uma distância de 2,5x1 cm. Foram avaliadas a incidência (frutos necrosados) e a severidade da doença, tendo sido realizadas cinco leituras a cada três dias após a inoculação.

No ensaio realizado no CIFC, frutos verdes em desenvolvimento destacados foram colhidos, lavados em água destilada esterelizada e colocados sobre esponjas de nylon umedecidas dentro de bandejas de plástico. Cada fruto foi inoculado com a suspensão de conídios com a concentração de 2×10^6 conídios mL^{-1} proveniente de colônias com 12 dias de idade, colocando 50 μL da suspensão por fruto com uma finapipeta. Os frutos utilizados como testemunha foram inoculados com água destilada esterelizada. As bandejas contendo os frutos

inoculados foram colocadas em câmara úmida. Estas permaneceram, durante o ensaio, numa câmara de crescimento com temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12 horas. Para cada isolado foram inoculados 12 frutos com duas repetições. Após a inoculação do patógeno, foram realizadas seis leituras da incidência da doença e dos sintomas nos frutos a cada três dias.

4.5 Análise estatística

Com os dados das leituras realizadas no ensaio realizado na UFLA, foi calculada a área abaixo da curva de incidência de doença (AACI). Os dados foram transformados em $\text{Log}_{10}x$ e realizada análise de variância para esta variável utilizando o programa SISVAR. Na comparação de médias onde houve diferença significativa, foi realizado o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05\%$). Com os dados obtidos no CIFC, foi feita análise descritiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Patogenicidade observada no ensaio realizado na UFLA, em 2002

Os primeiros sintomas de necrose em frutos de café ocasionados por alguns isolados foram observados entre 6 a 9 dias após aplicação do patógeno. Sintomas consistiram em pontuações pretas de 1-2 mm de diâmetro e estas lesões incrementam o tamanho até necrosar o fruto por completo. Na testemunha, os frutos permaneceram com a coloração verde (Figura 4B). O número de frutos necrosados foi variável de acordo com a cultivar e isolados testados. Valor máximo de 28% de frutos necrosados foi observado 15 dias após inoculação do isolado 21 na cultivar Catuaí Amarelo. Os isolados que ocasionam os sintomas de mancha manteigosa, identificados com os números 11, 12, 13 15, ocasionaram 25% de necrose na cultivar Mundo Novo. Na cultivar Tupi foram observados níveis mais baixos de necrose em frutos para a maior parte dos isolados testados neste estudo (Figura 4A). Entretanto, esta cultivar apresentou 18% de necrose quando inoculada com o isolado 15, que ocasiona a mancha manteigosa. Estes resultados são congruentes aos citados por outros pesquisadores.

Feitosa et al. (1977) estudaram vários isolados e obtiveram baixa patogenicidade, com valores máximos de 23% de frutos necrosados. Dorizzoto (1993) obteve valores variáveis de acordo com a progênie de café estudada, com valores máximos de 71% aos 35 dias após inoculação. Nechet & Abreu (2002) observaram sintomas de infecção em frutos verdes de café aos 10 dias após inoculação, com valores máximos de 51,27% aos 30 dias após inoculação, sendo os isolados considerados patogênicos.

Na análise de variância da variável AACI, houve diferença significativa entre isolados, cultivares e a interação cultivar*isolado ($p \leq 0,05$). Na comparação de médias para isolados, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a

conformação de três grupos (Figura 1). Os isolados 21, 8, 27, 12,13, 24, 10, 19, 9, 14, 16, 4, 18, 11, 6 e 3 conformam o primeiro grupo e ocasionaram os maiores valores de incidência de doença. No segundo grupo estão os isolados 22, 28, 20, 25, 15, 29, 26, 23, 5, 2 e 1. O terceiro grupo foi constituído pela testemunha.

Para cultivares, não houve diferença significativa entre as cultivares Tupi e Catucaí, e apresentaram o menor número de frutos necrosados para todos os isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados (Figura 2). Em um outro grupo, estão incluídas as cultivares Icatu e Apoatã, que são geneticamente semelhantes. A cultivar Icatu foi obtida de uma hibridação interespecífica, entre *C. canephora* e a cultivar Bourbon Vermelho de *C. arabica*; a Apoatã é uma cultivar de *C. canephora* (Mendes & Guimarães, 1997). Segundo Carvalho et al. (1976), o germoplasma de Icatu foi selecionado no Quênia por mostrar certa resistência genética ao agente da CBD. As cultivares Mundo Novo, Rubi, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Acaiá Cerrado e Katipó apresentaram o maior número de frutos necrosados.

Segundo Dorizzotto (1993), as progênes de Catimor, Sarchimor, Cavimor e cultivar Mundo Novo mostraram-se suscetíveis a um isolado que ocasiona a mancha manteigosa. A significância da interação cultivar*isolado indica que existem interações diferenciais entre frutos das cultivares de café contempladas e os isolados inoculados.

Embora esta não seja uma metodologia específica para testar a existência de raças fisiológicas do patógeno, parece promissora para tal fim e merece ser estudada. A existência de raças do patógeno que ocasiona a CBD na África já foi demonstrada em isolamentos de *C. kahawae* em cafeeiro em testes de resistência utilizando hipocótilos (Rodrigues et al., 1992; Várzea, 1995). A partir destes resultados, torna-se importante considerar este comportamento dos isolados de *Colletotrichum* spp. nos programas de melhoramento.

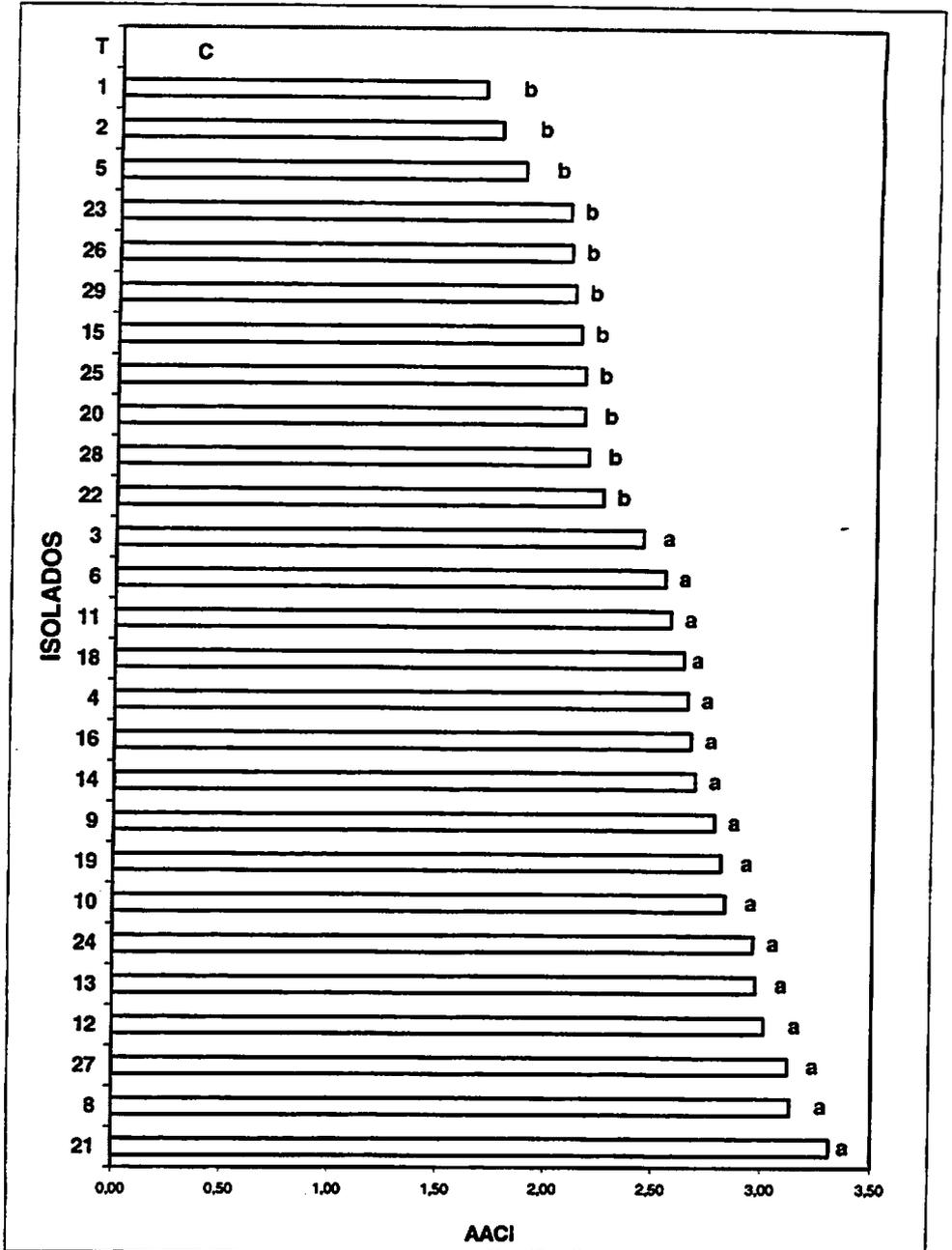


FIGURA 1 Patogenicidade de isolados *Colletotrichum* spp. em frutos verdes de café. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). AACI=área abaixo da curva de incidência da doença. UFLA, Lavras, 2002.

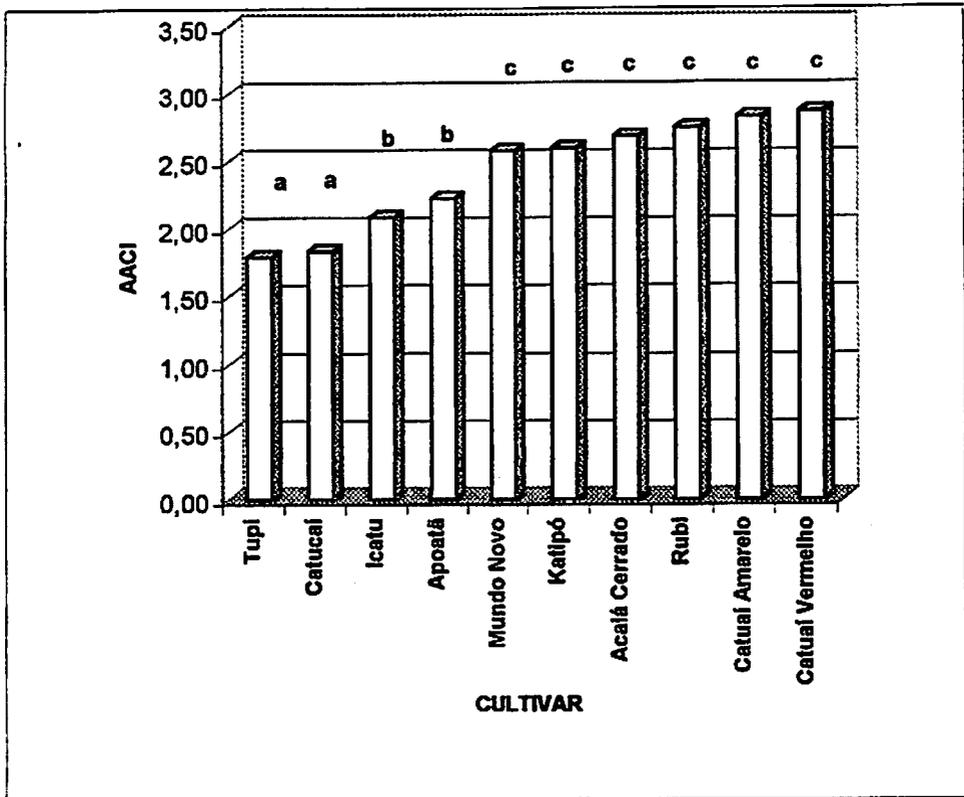


FIGURA 2 Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos verdes de cultivares de café. Comparação de médias para cultivares. Valores seguidos da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). AACI=área abaixo da curva de incidência da doença ocasionada por *Colletotrichum* spp. UFLA, Lavras, 2002.

5.2 Patogenicidade e sintomas observados no ensaio realizado no CIFC/2003

Os primeiros sintomas de necrose foram observados nos frutos inoculados com isolados de *C. kahawae* aos quatro dias após inoculação para o isolado Ca1 e aos sete dias para o isolado Z9. Os sintomas constituem pequenas lesões pretas e deprimidas que aumentam rapidamente de tamanho até necrosar completamente o fruto. Quanto aos isolamentos procedentes do Brasil, os isolados

15 e 36 ocasionaram sintomas de necrose em frutos e estes foram observados aos 9 e 16 dias após inoculação, respectivamente para cada isolado (Figura 3).

Segundo Jeffries & Dodd (1990), as diferenças entre isolados de *Colletotricum* spp. são evidentes quanto à sua relativa patogenicidade ou virulência em frutos. Contudo, os isolados 15 e 36, que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa em cafeeiros no Brasil, manifestaram sintomas de necrose similar àqueles que ocasionam a CBD (Figura 4). Segundo Várzea (1995), Hindorf (1970), isolados de *C. gloeosporioides* podem causar este sintoma. Entretanto, estes resultados são contraditórios às afirmações de Waller et al. (1993).

Baseado nos resultados, os isolados que ocasionam a CBD e o 15 e 36 de *Colletotricum* spp. contemplados nesta pesquisa foram patogênicos em frutos de café da cultivar Catuaí e diferiram no tempo de aparecimento de sintomas. Portanto, estudos histopatológicos são necessários para demonstrar como ocorre o processo de colonização de tecidos com os isolados oriundos do Brasil. Nos frutos necrosados foi também observada formação de acérvulos com presença de setas e esporulação do fungo (Figura 4E-F).

Outro sintoma observado neste experimento foi o amadurecimento rápido dos frutos após inoculação com o patógeno; frutos utilizados como testemunha e inoculados com água esterelizada permaneceram verdes.

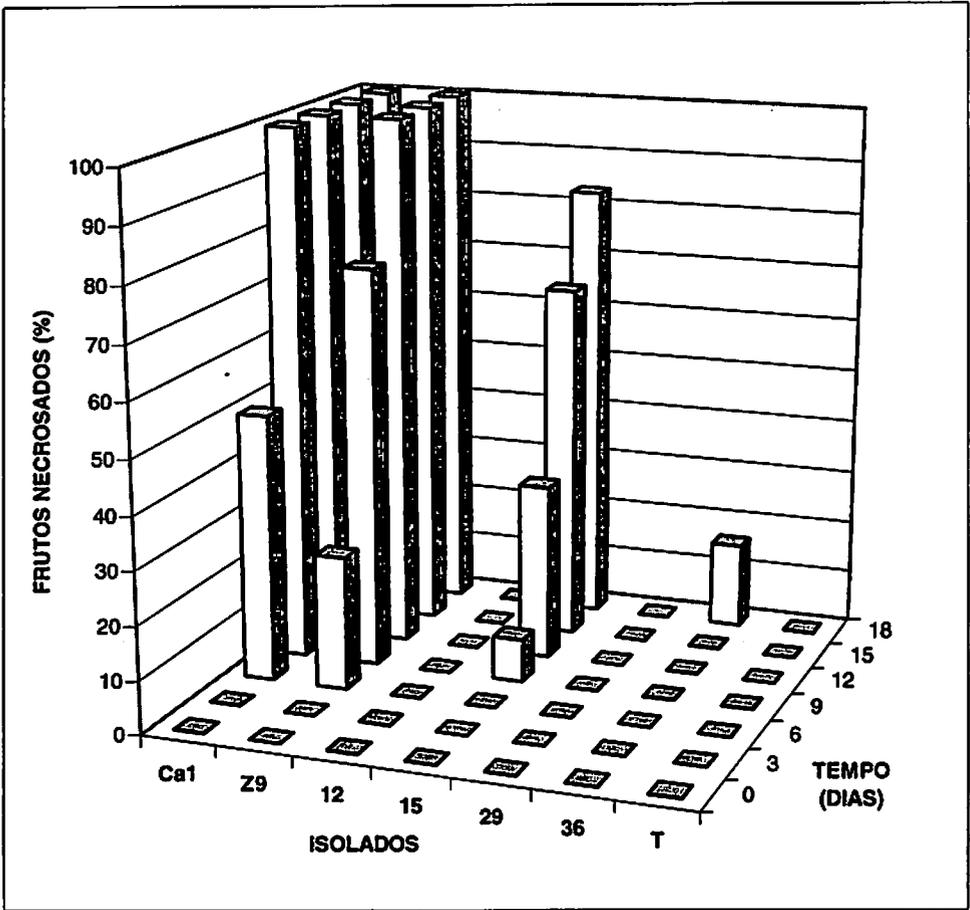


FIGURA 3 Avaliação de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em frutos verdes de café arábica (*Coffea arabica*) cultivar Catuaí. Incidência da doença e tempo de aparecimento de sintomas. Isolados Ca1 e Z9 pertencem a *Colletotrichum kahawae*; 12, 15 e 36 ocasionam o sintoma de mancha manteigosa e 29, seca de ponteiros. Oeiras, Portugal, 2003.

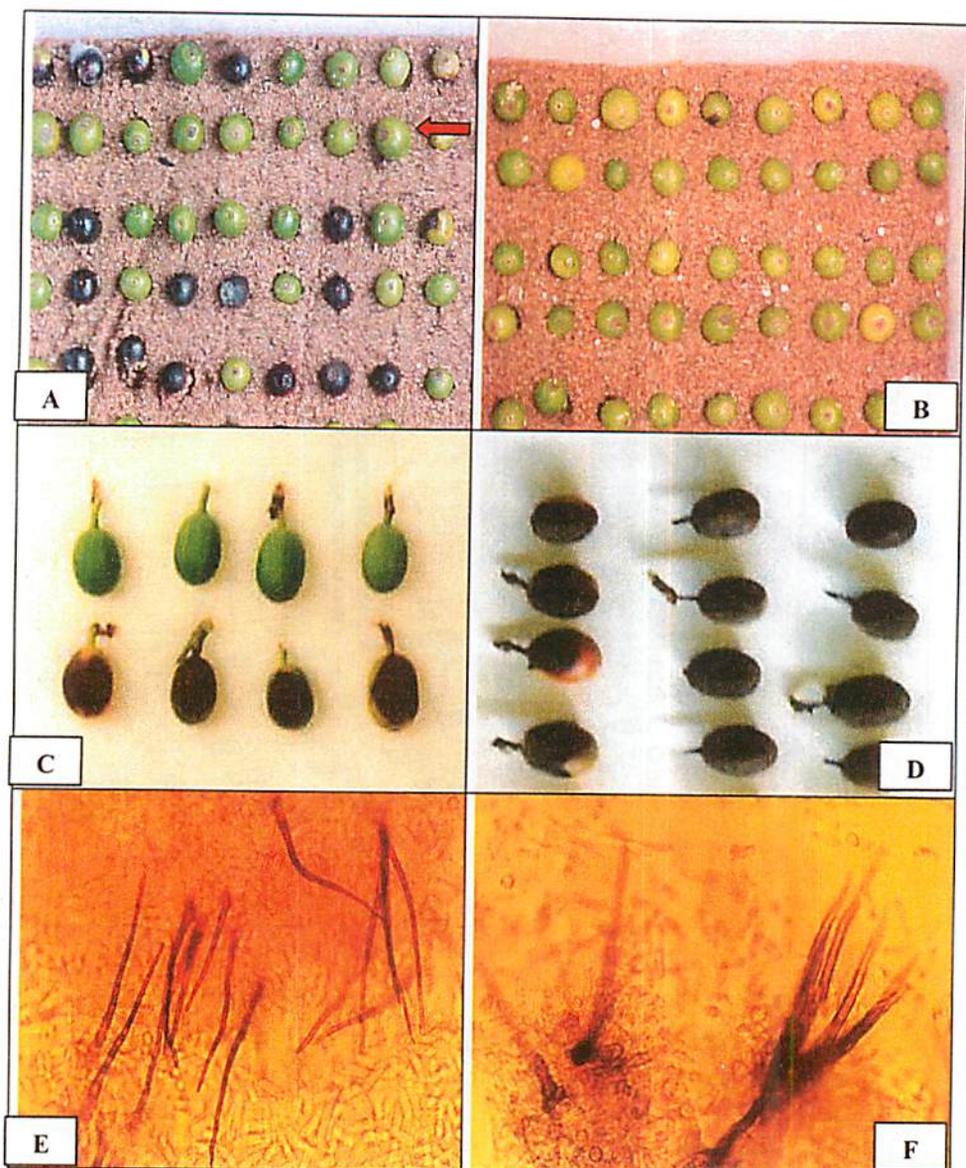


FIGURA 4 (A) Sintomas ocasionados por isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos de café 15 dias após a inoculação, seta sinaliza frutos sem necrose da cultivar Tupi; (B) testemunha; (C) sintomas do isolado Ca1 que ocasiona a CBD comparado à testemunha; (D) de direita para esquerda sintomas de necrose do isolado Ca1, Z9 de *C. kahawae* e do isolado 15 que ocasiona a mancha manteigosa no Brasil; (E) conídios e setas em frutos da cultivar Catuai, aos 18 dias após inoculação, isolado Ca1, 25x; (F) setas e conídios em frutos aos 18 dias após inoculação, isolado 15, 25x.

6 CONCLUSÕES

As porcentagens de frutos necrosados e tempo de aparecimento de sintomas foram variáveis de acordo com os isolados e a cultivar. Na UFLA, os primeiros sintomas de necrose em frutos inoculados foram observados entre 6 a 9 dias após aplicação do fungo. Valores máximos de 28% de frutos necrosados foram observados 15 dias após inoculação com o isolado 21 na cultivar Catuaí Amarelo e de 25% com os isolados 11, 12, 13 e 15 na cultivar Mundo Novo.

No CIFC, os primeiros sintomas de necrose em frutos de café foram observados aos 4 e 7 dias após inoculação para os isolados que ocasionam a CBD. Para isolados de Minas Gerais, o tempo de aparecimento de sintomas foi de 9 dias após a aplicação do patógeno. Os isolados que ocasionam a CBD provocaram 100% de incidência de necrose nos frutos na cultivar Catuaí. O isolado 15, que ocasiona sintomas da mancha manteigosa, manifestou 83% de incidência de necrose em frutos da mesma cultivar.

Os sintomas de necrose foram similares para os isolados que ocasionam a CBD e os que ocasionam a mancha manteigosa.

Os frutos inoculados com *Colletotrichum* spp., que não necrosaram, mostraram amadurecimento rápido após a inoculação com o fitopatógeno e os utilizados como testemunha e inoculados com água esterelizada permaneceram verdes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. R.; MANSK, Z.; MATIELLO, J. B.; MULLER, R. A. Observações preliminares sobre queda de frutos sob suspeita de ataque por *Colletotrichum* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá-MG. Resumos... Araxá: IBC/GERCA, 1979. p. 323-326.

CARVALHO, A.; MÔNACO L. C.; VAN DER VOSSSEN, H. A. M. Café Icatu como fonte de resistência a *Colletotrichum coffeanum*. *Bragantia*, Campinas, v. 35, n. 28, 343-347, 1976.

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

FEITOSA, M. I. et al. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33-54, 1977.

FIGUEREDO, P.; MARIOTTO, P. R. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), *O Biológico*, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 25-26, jan. 1978.

HINDORF, H. *Colletotrichum* spp. Isolated from *Coffea arabica* L. in Kenya. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Stuttgart, v. 77, p. 328-331, 1970.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, Oxford, v. 39, n. 3, p. 343-366, Sept. 1990.

MENDES, A. N.; GUIMARÃES, R. J. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade.** Lavras: UFLA-FAEPE, 1997. v. 1, p. 43-99.

NECHET, K. de L.; ABREU, M. S. De. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro, *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

RODRIGUES, Jr., C. J.; VÁRZEA, V. M. P.; MEDEIROS, E. F. Evidence for the existence of physiological races of *Colletotrichum coffeanum* Noack *sensu* Hindorf. **Kenya Coffee**, Nairobi, v. 57, p. 1417-1420, 1992.

RODRIGUES, Jr., C. J.; VÁRZEA, V. M. P.; MEDEIROS, E. F. Strains of *Colletotrichum coffeanum* Noak Causing Coffee Berry Disease in Angola and Malawi with characteristics different to the Kenya Strain. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 131, n. 3, p. 205-209, Mar. 1991.

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

VÁRZEA, 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, Portugal.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES, C. J. Jr.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee, **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002.

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

CAPÍTULO 5

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos maduros, endocarpo, sementes e sua transmissão pelas sementes de café.** 2003. p. 88-100. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

1 RESUMO

A semente é um importante veículo de transmissão, disseminação e sobrevivência de fitopatógenos. A transmissão pelas sementes do fungo *Colletotrichum* spp. já foi mencionada em outras culturas. Estudos para verificar a transmissão desse microrganismo pelas sementes de café são praticamente inexistentes e as informações disponíveis de pesquisas são escassas. O objetivo deste estudo foi determinar incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de café maduros, no endocarpo e sementes, assim como a transmissão pelas sementes. Foram contempladas as cultivares: Rubi-MG 1192, Acaiá Cerrado MG 1474, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Mundo Novo IAC 319-19, Icatu IAC 3282, Katipó, Tupi IAC 1669-33, Catucaí Vermelho sem sintomas de mancha manteigosa, Catucaí Vermelho e Amarelo com sintomas de mancha manteigosa e um genótipo de *C. canephora* da cultivar Apoatã. Frutos, endocarpo e sementes, separadamente, foram submetidos a teste de sanidade em meio BDA. A incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de café cereja maduros foi alta. Valores de 100% foram encontrados em frutos procedentes de plantas da cultivar Catucaí Amarelo e Vermelho com sintomas de mancha manteigosa. Nas outras cultivares, os valores estiveram entre 96% a 80%, exceto na cultivar Apoatã (26%). Provavelmente, *C. canephora* apresenta resistência a este fitopatógeno. A incidência encontrada no endocarpo e nas sementes foi variável, de acordo com a cultivar e lote de semente analisado. Os valores de incidência do fungo variaram entre 0%-17% nas sementes e 0%-8 % no endocarpo. Nos testes de transmissão, o fungo foi re-isolado em 100% a partir de fragmentos de raízes e talo nas plântulas procedentes de sementes tipificadas com a presença do fungo nos testes de sanidade. A incidência em frutos de café é alta, pode ou não ser re-isolado da semente, dependendo da cultivar e, quando presente, esse fitopatógeno é transmitido pelas sementes.

¹ Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu -UFLA (Orientador)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)
Mário Lúcio Vilela de Resende-UFLA (Co-orientador)

2 ABSTRACT

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Incidence of *Colletotrichum* spp. on ripe berries, endocarp, seeds and their transmission by coffee seeds.** 2003. p.88-100. Thesis (Doctorate in Agronomy, Major in Phytopathology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The seed is an important vehicle of transmission, dissemination and survival of plant pathogens. *Colletotrichum* spp. transmission by seeds has already been mentioned in other crops. Studies to verify the transmission of that microorganism by coffee seeds are practically inexistent and the available research information is scarce. The objective of this study was to determine the incidence of *Colletotrichum* spp. on ripe coffee berries, in the endocarp and seeds, as well as the transmission by seeds. The cultivars Rubi-MG 1192, Acaia Cerrado MG 1474, Catuai Amarelo IAC 62, Catuai Vermelho IAC 99, Mundo Novo IAC 319 - 19, Icatu IAC 3282, Katipó, Tupi IAC 1669-33, Catucaí Vermelho without symptoms of buttery spot, Catucaí Vermelho and Amarelo with symptoms of buttery spot and a genotype of *C. canephora* of the cultivar Apatã were assessed. Berries, endocarp and seeds alone were submitted to healthy tests in BDA medium. The incidence of *Colletotrichum* spp. in ripe cherry berries was high. Values of 100% were found on berries from plants of the cultivar Catucaí Amarelo and Vermelho with symptoms of buttery spot. For other cultivars the values laid between 96% and 80%, except for the cultivar Apatã (26%). Probably, *C. canephora* presents resistance on fruit to this pathogen. The incidence found in the endocarp and in seeds was variable, according to the cultivar and lot of seed analyzed. The incidence values of the fungus ranged from 0% to 17% in seeds and 0% to 8 % in the endocarp. The fungus was re-isolated in a 100% fragments of roots and stems of seedlings originated from seeds typified as 'with the presence of the fungus' in healthy tests. The incidence on berries is usually high, it may or may not be re-isolated from the seeds, depending on the cultivar and when present, that pathogen is transmitted by the seeds.

¹Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu (Adviser)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-adviser)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-adviser)
Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

A semente é um importante veículo de transmissão, disseminação e sobrevivência de fitopatógenos. Estes podem ser localizados em diferentes partes dela. Existem relatos de transmissão pela semente do fungo *Colletotrichum* em várias culturas (Neergaard, 1979; Machado, 1994; Tanaka & Machado, 1985; Tanaka, 1994; Talamini et al., 2001). Segundo Machado (1994), a importância da ocorrência de patógenos em sementes pode ser avaliada sob diferentes objetivos, culminando todos com o aspecto econômico que cada interação patógeno-hospedeiro determina. Na cultura do café, no Brasil, Noack (1902) relatou a presença desse fitopatógeno associado a frutos do cafeeiro. Alves & Castro (1998) mencionam que *Colletotrichum* sp. pode ser encontrado nas fases de verde-cana e cereja. Orozco et al. (2002a, b) realizaram estudos de incidência e transmissão de *Colletotrichum* spp. em frutos e sementes de café com um reduzido número de cultivares e concluíram que a presença de *Colletotrichum* spp. em frutos de café é elevada e esse fitopatógeno é transmitido pela semente.

O objetivo deste estudo foi determinar incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de café cereja maduros com e sem sintomas de antracnose, no endocarpo e semente (endosperma e embrião) e sua transmissão pela semente em cultivares de *Coffea arabica* L. e *C. canephora*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Genótipos de café e origem

Frutos maduros de café foram colhidos no ensaio de seleção de progênes resistentes à ferrugem alaranjada do cafeeiro, projeto BIOEX/CNPq, localizado no campus da UFLA. Desses frutos foram retiradas as sementes, fermentadas por 24 horas, lavadas e depois secas à sombra; essa semente foi armazenada em câmara fria a 10°C. Foram contempladas as cultivares: Rubi-MG 1192, Acaiaí Cerrado MG 1474, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Mundo Novo IAC 319 - 19, Icatu IAC 3282, Katipó, Tupi IAC 1669-33, Catucaí Vermelho sem sintomas de mancha manteigosa e um genótipo de *C. canephora* da cultivar Apoatã, e frutos e sementes da cultivar Catucaí Vermelho e Amarelo com sintomas de mancha manteigosa.

4.2 Determinação da incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos

Na determinação da incidência do fungo foram avaliados 200 frutos por cada cultivar. Os frutos foram pré-lavados em água, desinfestados um minuto em álcool 50%, três minutos em hipoclorito de sódio 1%, lavados com água destilada e esterilizada e secos em papel filtro. O experimento foi realizado em delineamento de blocos inteiramente casualizados, com oito repetições e repetido três vezes. Os frutos foram colocados em meio BDA e incubados em câmara de crescimento a 20°C, fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada aos sete dias após o plaqueamento, determinando-se a incidência do fitopatógeno nas colônias que desenvolveram no meio de cultura originadas dos frutos.

4.3 Determinação da incidência no endocarpo e semente

Os testes de sanidade foram feitos nas cultivares indicadas no item anterior. Esses testes foram realizados para o endocarpo (pergaminho) e a

semente (endosperma e embrião) de forma separada. O endocarpo foi retirado da semente de forma manual. O experimento foi realizado em delineamento de blocos inteiramente casualizados, com oito repetições e repetido duas vezes. As sementes foram pré-tratadas com álcool etílico (50%) por 30 segundos e hipoclorito de sódio (1%) por um minuto, colocados em meio BDA e incubadas em câmara de crescimento a 20°C, fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada aos sete dias após o plaqueamento. Determinou-se a incidência do fungo nas colônias que desenvolveram do endocarpo e semente no meio de cultura.

4.4 Determinação da transmissão de *Colletotrichum* spp. em sementes

Naquelas sementes das cultivares indicadas no item 4.1, nas quais foi detectada a presença do fungo, foram selecionadas e semeadas individualmente em copos contendo areia esterilizada. Estes foram colocados em condições controladas em câmara de crescimento e fotoperíodo de 12 horas a 25°C. As plântulas de aproximadamente 5-6 centímetros obtidas a partir dessas sementes na fase de "palito de fósforo" foram destacadas e seccionadas. Os fragmentos de raiz, haste e folhas foram desinfestados com álcool etílico e hipoclorito de sódio e plaqueados em meio MEA 2%, separadamente.

4.5 Análise estatística

Com os dados de incidência de *Colletotrichum* spp em frutos, foi realizada análise de variância para esta variável utilizando o programa SAS. Na comparação de médias onde houve diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). Com os dados de incidência do fungo no endocarpo, semente e transmissão foi feita análise descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos

Foram observadas porcentagens diferentes de incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de acordo com as cultivares estudadas. Conforme a análise de variância conjunta dos valores de incidência do patógeno para os três ensaios estudados, houve diferença significativa entre cultivares, ensaios e a interação cultivar*ensaio ($p \leq 0,05$). O coeficiente de variação foi de 5,5%. De acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$), para os valores de incidência de *Colletotrichum* spp., houve a separação de cultivares em cinco grupos (Figura 1).

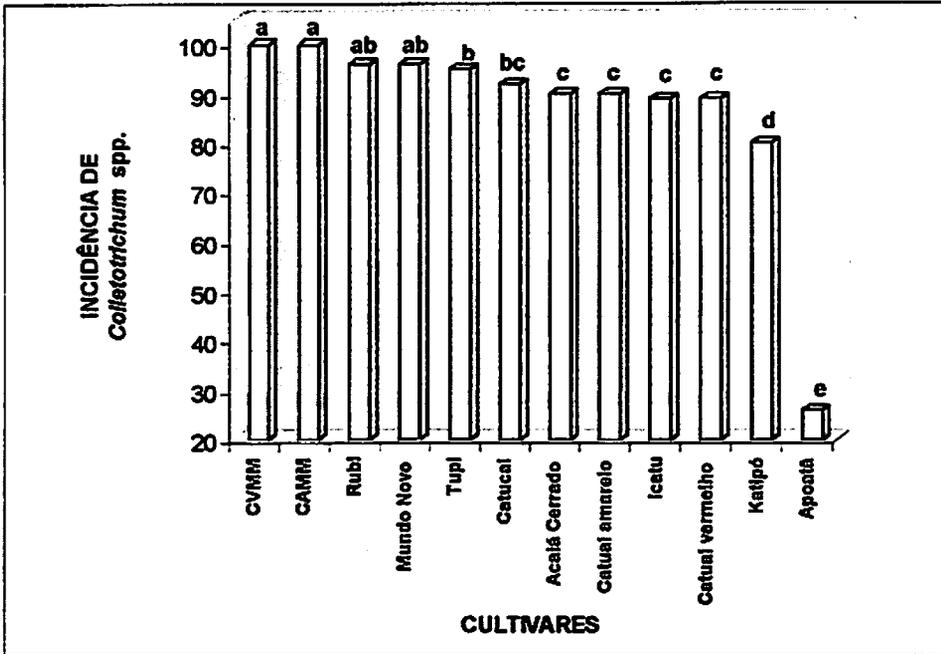


FIGURA 1 Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja de 12 cultivares de café: médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CVMM= Catuaí Vermelho procedente de plantas com sintoma de mancha manteigosa. CAMM= Catuaí Amarelo procedente de plantas com sintoma de mancha manteigosa.

Estes resultados indicam que certas cultivares de café são mais colonizadas pelo fungo e constituem melhores hospedeiras. Incidência de 100% foi encontrada nos frutos das cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo procedentes de plantas com sintomas de mancha manteigosa, sendo este material, portanto, suscetível a este patógeno. Nestas plantas, normalmente, existe uma abscisão de frutos ocasionada pelo fungo e aqueles frutos que chegam a amadurecer têm alta incidência do patógeno. Nas cultivares restantes de café arábica, os valores de incidência de *Colletotrichum* spp. variaram entre 96% a 80% considerados altos. O menor valor de incidência foi de 26%, observado na cultivar Apotã, considerado relativamente baixo em relação às outras cultivares, possivelmente tem mecanismos de resistência contra este fitopatógeno, situação que deve ser considerada para melhoramento de café visando resistência a *Colletotrichum* spp. Estes resultados concordam com estudos preliminares realizados por Orozco et al. (2002a, b).

5.2 Incidência de *Colletotrichum* spp. no endocarpo e sementes

A incidência do fungo foi variável, de acordo com a cultivar, parte estudada e lote de semente analisado. Foi maior naquelas sementes provenientes de frutos com mancha manteigosa das cultivares Catuaí Amarelo e Vermelho, Catucaí e Acaíá Cerrado. Não foi encontrada a presença do fungo nas cultivares, Catuaí Vermelho, Rubi, Katipó e Apotã. Os valores de incidência do fungo foram de 0-17% nas sementes e 0-8 % no endocarpo (Figura 2).

De acordo com análise descritiva da incidência de *Colletotrichum* spp. no endocarpo e semente de café por meio da técnica "Box Plot" no primeiro ensaio (Figura 3-A), observa-se que há evidências significativas na incidência deste fungo. Assim, existem diferenças entre as cultivares e o órgão estudado. Neste

sentido, verifica-se que a cultivar com maior variância corresponde à cultivar Catucaí Amarelo proveniente de sementes com mancha manteigosa.

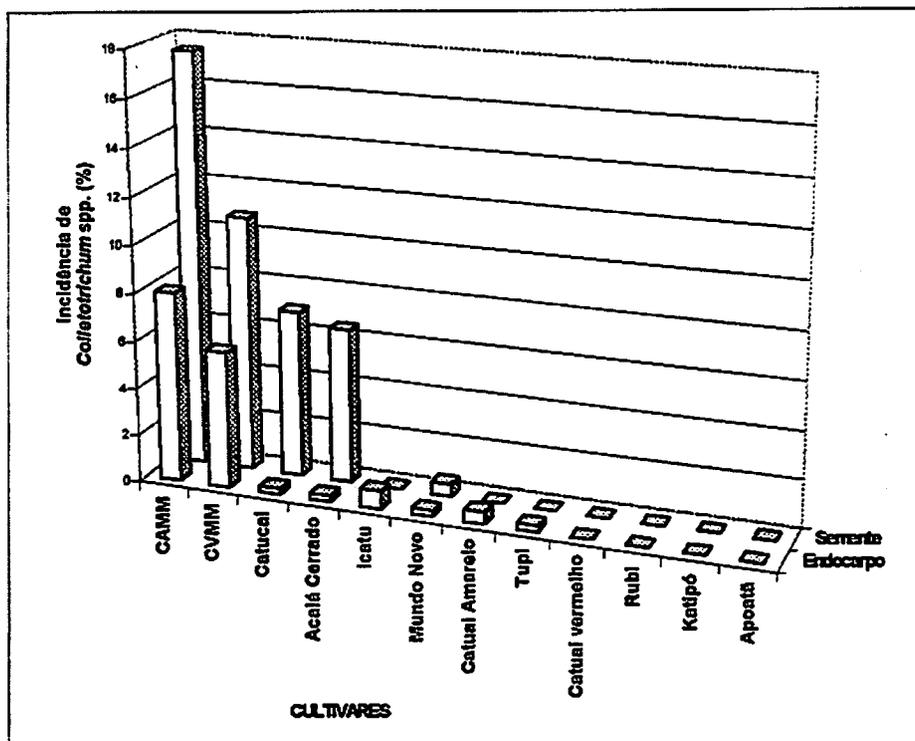
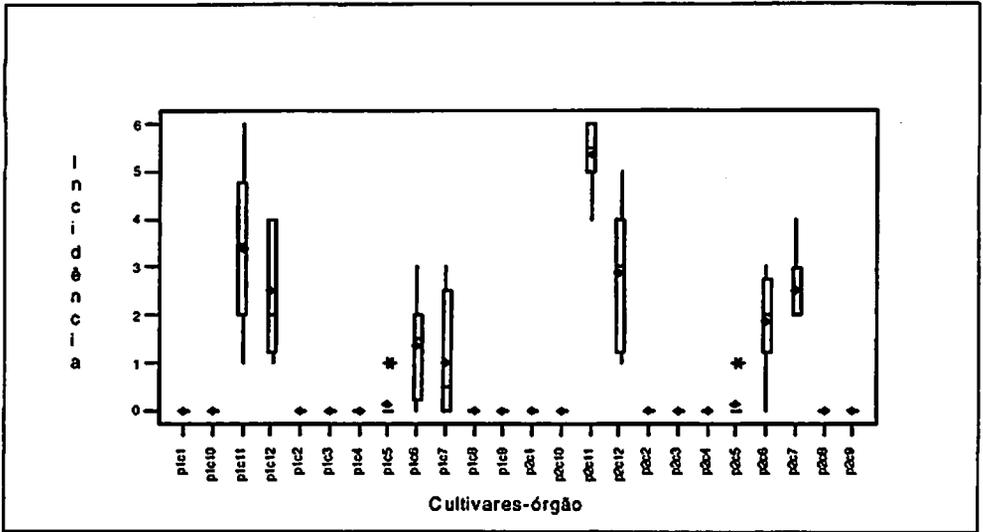


FIGURA 2 Incidência de *Colletotrichum* spp. quantificada em testes de sanidade realizados em sementes e no endocarpo (valores correspondem a 400 observações para cada). CVMM = Catucaí Vermelho procedente de plantas com mancha manteigosa. CAMM = Catucaí Amarelo procedente de plantas com mancha manteigosa.

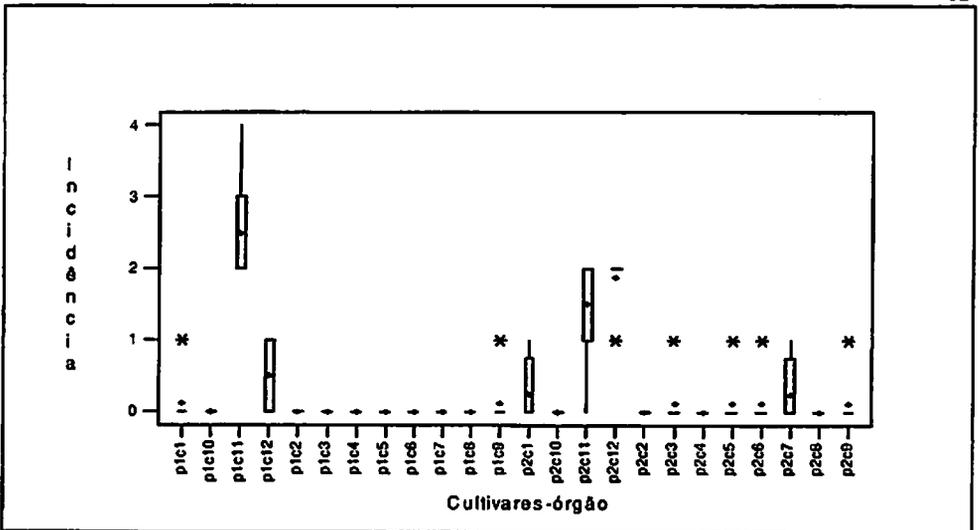
As cultivares Catucaí Amarelo proveniente de sementes com mancha manteigosa-semente (plc11), Catucaí Vermelho proveniente de sementes com mancha manteigosa-semente e endocarpo, respectivamente (plc12) (p2c12), Acaíá Cerrado-semente e endocarpo (plc6) p2c6, Catucaí-semente (plc7), e

Catucáí-endocarpo (p2c7) apresentam-se homogêneas. No caso de observações extremas ("outliers"), estas foram diagnosticadas apenas para as cultivares relacionadas a cultivar Mundo Novo, o que sugere que sementes com o fungo podem ser encontradas em forma esporádica para esta cultivar. As demais cultivares apresentaram variabilidade nula, não foi encontrada a presença do fungo.

No segundo ensaio (Figura 3-B), pode-se verificar que há evidências significativas de que as cultivares relacionadas à cultivar Catucáí Amarelo provenientes de sementes com mancha manteigosa (p1c11) (p2c11) de igual forma que no primeiro ensaio, apresentaram maior variabilidade. Para este ensaio, as cultivares apresentaram um número maior de observações extremas, "outliers" e também a maioria dos tratamentos apresentou variabilidade nula, o que impossibilita a inferência estatística.



A



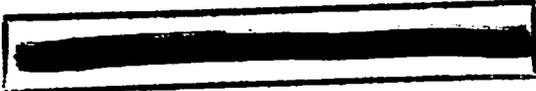
B

FIGURA 3 Análise descritiva da incidência de *Colletotrichum* spp. no endocarpo e semente de café por meio de "Box Plot". A. primeiro ensaio; B. segundo ensaio. P1 = semente, P2 = endocarpo, C = cultivar, 1 = Icatu, 2 = Catuaí Vermelho, 3 = Tupi, 4 = Katipó, 5 = Mundo Novo, 6 = Acaiaí Cerrado, 7 = Catucaí, 8 = Rubi, 9 = Catuaí Amarelo, 10 = Apoatã, 11 e 12 = Catucaí Amarelo e Vermelho, respectivamente, provenientes de plantas com sintoma de mancha mateirosa. *observações extremas = "outliers", - = mediana, · = média.

5.3 Transmissão de *Colletotrichum* spp. em sementes

O fungo foi re-isolado em 100% de todas as plântulas que foram amostradas. Essas originaram-se das sementes retiradas dos ensaios dos testes de sanidade nas cultivares onde o fungo foi encontrado, principalmente das cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo com mancha manteigosa.

De acordo com o observado, colônias do fungo *Colletotrichum* spp. desenvolveram a partir de fragmentos de raízes e talo das plântulas que foram colocados no meio MEA. Na inoculação de folhas cotiledonares não foi observado crescimento do fungo. Infecção latente e incidência variável de *Colletotrichum* spp., dependendo do órgão da planta, já foram relatadas na cultura de café (Rayner, 1948). De acordo com estes resultados, o fungo possivelmente penetra inicialmente nas raízes no momento da germinação e, após, transloca-se para o talo. Este tipo de transmissão já foi observado para a espécie *C. truncatum* (Neergaard, 1979; Talamini et al., 2001). Conforme observado nesta pesquisa, na interação *Colletotrichum* spp. x cafeeiro, esse fitopatógeno é transmitido pelas sementes. A transmissão pela semente é importante, dado que possibilita a passagem do patógeno de uma geração a outra, a partir daquelas sementes com a presença do fungo. Este fato merece atenção, pois foi determinado que as cultivares mais suscetíveis ao patógeno apresentam maior incidência do fungo nas sementes.



6 CONCLUSÕES

A incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de café maduros foi alta. Valores de 100% foram encontrados em frutos procedentes de plantas da cultivar Catucaí com sintomas de mancha manteigosa. A cultivar Apoatã, *C. canephora*, parece apresentar resistência a este fitopatógeno.

A incidência de *Colletotrichum* spp. encontrada no endocarpo e nas sementes foi variável de acordo com a cultivar e o lote de semente analisado. Os valores encontrados foram de 0%-17% nas sementes e 0%-8 % no endocarpo.

As cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo, suscetíveis a *Colletotrichum* spp., provenientes de plantas com sintomas de mancha manteigosa, apresentaram as maiores porcentagens do fungo nas sementes.

O fungo foi re-isolado 100% a partir de plaqueamento de fragmentos de raízes e talo de hipocótilos de todas as plântulas amostradas. Esse fitopatógeno é transmitido pelas sementes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, 1979. 839 p.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n. 1, jan. 1902.

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

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

RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. **Nature**, London, v. 161 n. 4085, p.245-246, Feb. 1948.

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; MACHADO J.; OLIVEIRA, F. A. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidas por sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 219-248, 2001.

TANAKA, M. A.; MACHADO, J. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, p. 219-243, 1985.

TANAKA, M.A. Patógenos causadores de tombamento do algodoeiro e seus efeitos sobre a germinação das sementes em diferentes temperaturas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, mar. 1994.

CAPÍTULO 6

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Caracterização bioquímica de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro no estado de Minas Gerais**. 2003. p. 101-112. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

1 RESUMO

A caracterização bioquímica de isolados de *Colletotrichum* spp. é utilizada como critério taxonômico. Objetivou-se, neste trabalho, estudar o comportamento de 35 isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais, quanto à capacidade de utilizar ácido cítrico e tartarato de amônio com fins de diferenciação de espécies. Ainda, foi analisado o pH do meio líquido de crescimento dos isolados. O estudo como de fontes de carbono foi realizado na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. A análise de pH foi realizada no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal, onde foram comparados isolados que ocasionam a CBD e um isolado de *C. gloeosporioides* procedente da China. No teste de ácido cítrico e tartarato, após uma semana da inoculação, no tratamento testemunha positiva (meio base + glucose), houve mudança de coloração do meio para todos os isolados, indicando sua metabolização. Na testemunha negativa (meio base, sem fonte de carbono) não houve crescimento e nem mudança de cor. Onde foi adicionado tartarato, todos os isolados tiveram a capacidade de utilizar essa fonte de carbono e a resposta foi considerada positiva. No meio base com citrato, a resposta foi negativa; os isolados foram incapazes de utilizar essa fonte de carbono. De acordo com este teste, conclui-se que os isolados caracterizados de Minas Gerais metabolizaram tartarato como única fonte de carbono, portanto, não pertencem a *Colletotrichum kahawae*. Em relação à técnica, é efetiva, dado que permite verificar a utilização dessas fontes de carbono pelos isolados. É um teste de simples execução, barato, rápido e importante na tipificação de espécies. Foi encontrada variação entre valores de pH dos isolados de *Colletotrichum* spp. e diferença significativa. Existe certa tendência dos isolados que ocasionam a CBD em acidificar o meio líquido. Na comparação de médias de pH, isolados de MG tiveram o mesmo agrupamento de isolados de *C. kahawae*. Este teste é não prático para selecionar espécies, embora esta característica possa ser mais estudada.

¹ Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu -UFLA (Orientador)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)
Mário Lúcio Vilela de Resende-UFLA (Co-orientador)

2 ABSTRACT

OROZCO MIRANDA, EDIN FRANCISCO. Biochemical characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from coffee tree in the state of Minas Gerais. 2003. p. 101-112. Thesis (Doctorate in Agronomy, Major in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The biochemical characterization of *Colletotrichum* isolates is utilized as a taxonomic criterion. The current chapter was aimed at studying the behavior of 35 *Colletotrichum* spp. isolates associated with the coffee tree in Minas Gerais in relation to their capacity of utilizing citric acid and ammonium tartarate with purposes of differentiation of species. Further, the pH of the liquid growth medium was analyzed. The study of sources of carbon was conducted at the Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. The pH analysis was done in the Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal, where isolates which cause CBD and one *C. gloeosporioides* isolate from China were compared. One week after inoculation, at the positive control treatment (basal medium + glucose), there was a change of color of the medium for all the isolates denoting its metabolization. In the negative control (basal medium without a source of carbon), there was neither growth nor color change. Where tartarate was added, all isolates had the capacity to utilize that source of carbon and the response was considered positive. In the basal medium with citrate, the response was negative, the isolates were unable to utilize that source of carbon. According to this test, isolates here characterized not belonging to *C. kahawae*, because this species can not utilize citrate or tartarate as single sources of carbon. As regards to this technique, it is effective, since it enables to verify the use of these sources of carbon by the isolates. It a test of easy accomplishment, cheap, fast and important for typifying the species. There were significant differences between the pH of the isolates grown in liquid medium. There was a trend for CBD isolates which to acidify the liquid medium. According to the pH test performed, isolates from Brazil grouped together. Therefore, this test is not practical to screen species, though, that characteristic should be more studied.

¹Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu (Adviser)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-adviser)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-adviser)
Mário Lúcio Vilela de Resende -UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

Nos países da América, *Colletotrichum* spp. tem sido associado a vários sintomas. Na maioria das publicações, o agente etiológico é relatado unicamente como *Colletotrichum* spp. (Schieber et al., 1970; Almeida et al., 1979; Dorizzotto, 1993; Alves & Castro, 1998; Nechet, 1999; Orozco et al., 2002; Dias, 2002). Entretanto, a menção da espécie deste fitopatógeno é importante, devido ao fato de que na cultura de café existem populações de espécies.

Na determinação de espécies deste fungo para café, são utilizados critérios de características patogênicas, metabólicas e culturais de isolados frescos (Waller et al., 1993, Várzea et al., 2002). Waller et al. (1993) contemplaram esses critérios para a mudança do nome de *C. coffeanum sensu* Hindorf para *Colletotrichum kahawae* J. M. Waller e P.D. Bridge, sp. nov. A proposta é utilizada, mas ainda apresenta algumas limitações para tipificar os isolados de *C. kahawae* de isolados de *C. gloeosporioides* (Várzea, 1995; Orozco, 2002). Por isso, é necessário continuar com as pesquisas nessa área.

Em relação às características bioquímicas de isolados de *Colletotrichum* spp., menciona-se que *C. kahawae* não pode utilizar citrato ou tartarato como únicas fontes de carbono (Waller et al., 1993), embora outras espécies possam (Waller et al., 1993; Várzea, 1995).

Várzea (1995) estudou o pH final do meio líquido de crescimento de isolados de *Colletotrichum* spp. tendo encontrado grande variabilidade de valores de pH entre os diferentes isolados estudados. Observou-se que isolados de *C. kahawae* tendem acidificar o meio líquido. A partir deste resultado, o autor sugere que essa característica seja mais explorada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Teste de tartarato de amônio e ácido cítrico

Foram estudados 35 isolados coletados em locais de MG (Tabela 1).

Os meios de cultura e metodologia utilizados foram de acordo com Bridge (1985) e Paterson & Bridge (1994). Foi usado o meio B (Lynch et al., 1981) como meio base, cuja composição é $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1g; KCl, 0,2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g; bromocresol púrpura, 0,05g. O meio base foi suplementado com tartarato de amônio ou ácido cítrico (1% p/v). Testemunha positiva e negativa contendo, respectivamente, glucose e nenhuma fonte adicional de carbono, foram incluídas para cada isolado. O pH de todos os meios foi ajustado a 4,5 antes da esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos. Foram colocados 10 mL dos diferentes meios líquidos em tubos de ensaio. Em cada tubo, depositaram-se 2 discos de 5 mm diâmetro contendo o fungo desenvolvido em meio B solidificado com ágar. As leituras foram realizadas visualmente, 8 dias após inoculação, observando-se a mudança de coloração dos meios.

4.2 pH do meio líquido de crescimento dos isolados de *Colletotrichum* spp.

O estudo foi realizado no CIFC, em 2003. Além dos isolados apresentados na Tabela 1, foram incluídos quatro isolados de *C. kahawae* e um isolado de *C. gloeosporioides* oriundo da China. Para cada isolado, fragmentos de cinco milímetros de diâmetro foram cortados das colônias crescidas de meio MEA 2% em placas de Petri. Foram usados para inocular 50 mL de meio líquido MEA, pH inicial de 5,4, contido em balões erlenmeyer de 250 mL. As culturas cresceram durante 15 dias sem agitação a 22°C. Para cada isolado foi lido o pH final do meio líquido com o auxílio de um potenciômetro. Foram realizadas duas repetições para cada isolado. Com os valores foi realizada análise de variância.

TABELA 1 Procedência e relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados na caracterização bioquímica. UFLA, Lavras, 2003.

Isolado	Órgão	Sintoma	Procedência	Data
1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, UFLA	2001
2	Folha	Mancha manteigosa	Piumhi	2001
3	Folha	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
4	Fruto	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
5	Folha	Necrose	Ouro Fino	2001
6	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
7	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
8	Ramo	Necrose	Boa Esperança	1998
9	Folha	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
10	Ramo	Seca de ponteiros ⁺	Nepomuceno	2001
11	Fruto	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
12	Folha	Mancha manteigosa	Poço Fundo	2001
13	Fruto	Antracnose ⁺	Poço Fundo	2001
14	Fruto	Antracnose	Poço Fundo	2001
15	Folha	Mancha manteigosa	Turvolândia	2001
16	Ramo	Necrose	Ibituruna	1998
17	Ramo	Necrose	Muzambinho	2001
18	Ramo	Necrose	Varginha	1998
19	Ramo	Necrose	Patrocínio	1999
20	Folha	Necrose	Guaxupé	1998
21	Folha	Necrose	Piumhi	1998
22*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
23*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
24*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
25*	Fruto	Necrose	Canaã	1998
26	Fruto	Necrose	Teixeiras	1998
27	Fruto	Necrose	Patrocínio	1998
28	Fruto	Necrose	Araguari	1998
29	Ramo	Seca de ponteiros	Capelinha	2001
30	Fruto	Necrose	Ouro Fino	2000
31	Ramo	Necrose	Ijaci	2001
32	Ramo	Necrose	Cristais	2002
33	Ramo	Necrose	Cristais	2002
34	Fruto	Necrose	Cristais	2002
35	Folha	Necrose	Campo Belo	2002

+ Proveniente de planta com sintoma de mancha manteigosa

* Isolados identificados como *C. gloeosporioides* na Universidade Federal de Uberlândia/Depto. de Fitopatologia.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de tartarato de amônio e ácido cítrico

No tratamento testemunha positiva (meio base + glucose), oito dias após a inoculação, houve mudança de coloração do meio para todos os isolados de *Colletotrichum* spp., indicando sua utilização. Na testemunha negativa (meio base, sem fonte de carbono) não houve crescimento nem mudança de cor do meio. No tratamento onde foi adicionado tartarato, todos os isolados tiveram a capacidade de utilizar essa fonte de carbono e a resposta foi considerada positiva. Já no tratamento em que foi adicionado citrato, a resposta foi negativa, dado que os isolados foram incapazes de utilizar essa fonte de carbono (Tabela 2). Estes resultados são análogos aos encontrados por Várzea (1995) para isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

De acordo com os resultados e o critério de caracterização bioquímica utilizado por Waller et al. (1993), para tipificar espécies de isolados de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro, conclui-se que os isolados de Minas Gerais, aqui caracterizados, podem pertencer a outras espécies, mas não a *C. kahawae*. Isto porque os isolados que ocasionam a CBD não podem utilizar citrato ou tartarato como únicas fontes de carbono.

A técnica de utilização do citrato ou tartarato para separar isolados de *Colletotrichum* spp. é efetiva, dado que permite verificar a utilização dessas fontes de carbono pelos isolados desse fungo. Contudo, é um teste de simples execução, econômico, rápido e importante na tipificação de espécies de *Colletotrichum* associadas ao cafeeiro. Pode ser utilizada de maneira imediata como rotina em laboratórios de quarentena e diagnose para indicar a presença ou ausência de isolados de *Colletotrichum kahawae* em material vegetal de café.

TABELA 2 Resultados da utilização de tartarato e de citrato por isolados de *Colletotrichum* spp. oito dias após a inoculação em meio base (testemunha negativa), meio base com glucose (testemunha positiva), em meio base com citrato e meio base com tartarato. UFLA, Lavras, 2003.

Isolados	Meio base	Meio base com glucose	Meio base Com citrato	Meio base com tartarato
1	-	+	-	+
2	-	+	-	+
3	-	+	-	+
4	-	+	-	+
5	-	+	-	+
6	-	+	-	+
7	-	+	-	+
8	-	+	-	+
9	-	+	-	+
10	-	+	-	+
11	-	+	-	+
12	-	+	-	+
13	-	+	-	+
14	-	+	-	+
15	-	+	-	+
16	-	+	-	+
17	-	+	-	+
18	-	+	-	+
19	-	+	-	+
20	-	+	-	+
21	-	+	-	+
22	-	+	-	+
23	-	+	-	+
24	-	+	-	+
25	-	+	-	+
26	-	+	-	+
27	-	+	-	+
28	-	+	-	+
29	-	+	-	+
30	-	+	-	+
31	-	+	-	+
32	-	+	-	+
33	-	+	-	+
34	-	+	-	+
35	-	+	-	+

+ = metabolização, - = não metabolização

Pode ser útil como técnica complementar na caracterização morfológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp., dado que uso de um critério pode apresentar limitações para tipificar isolados de *C. kahawae* de isolados de *C. gloeosporioides*, tal como indicado por Várzea (1995) e Orozco, et al. (2002a).

5.2 pH do meio líquido de crescimento dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Na avaliação do pH final do meio líquido, foi encontrada variação entre valores de pH dos isolados de *Colletotrichum* spp. estudados. Conforme a análise de pH, houve diferença significativa entre isolados ($p \leq 0,05$). Na comparação de médias, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$), houve a conformação de três grupos (Figura 1). No grupo com valores de menor acidez, o isolado Q2 de *C. kahawae* apresentou o menor valor de pH com 3,3 e o isolado 15 apresentou 7,7 no grupo de isolados que tiveram maior pH. Este último isolado ocasiona sintomas de mancha manteigosa.

Com base nos resultados, observa-se que existe certa tendência dos isolados que ocasionam a CBD acidificar o meio líquido, tal como relatado por Várzea (1995). Entretanto, de acordo ao teste Scott Knott ($p \leq 0,05$) realizado na comparação de médias de pH, isolados procedentes do Brasil têm o mesmo agrupamento. Por exemplo, os isolados Q2, Z2 e Z1 de *C. kahawae* estão dentro do grupo cujo pH variou de 3,4 (isolado Q2) a 5 (isolado 34) (Figura 1). Já no segundo grupo, o isolado Ca1 de *C. kahawae* está agrupado entre isolados do Brasil; o pH deste grupo variou de 5,8 (isolado 4) a 6,9 (isolado 18). O terceiro grupo abrange isolados do Brasil e o isolado Ch procedente da China. O pH deste último grupo variou entre 7 (isolado 19) a 7,7 (isolado 15). Assim, esse teste é pouco prático para selecionar espécies, embora esta característica possa ser mais estudada.

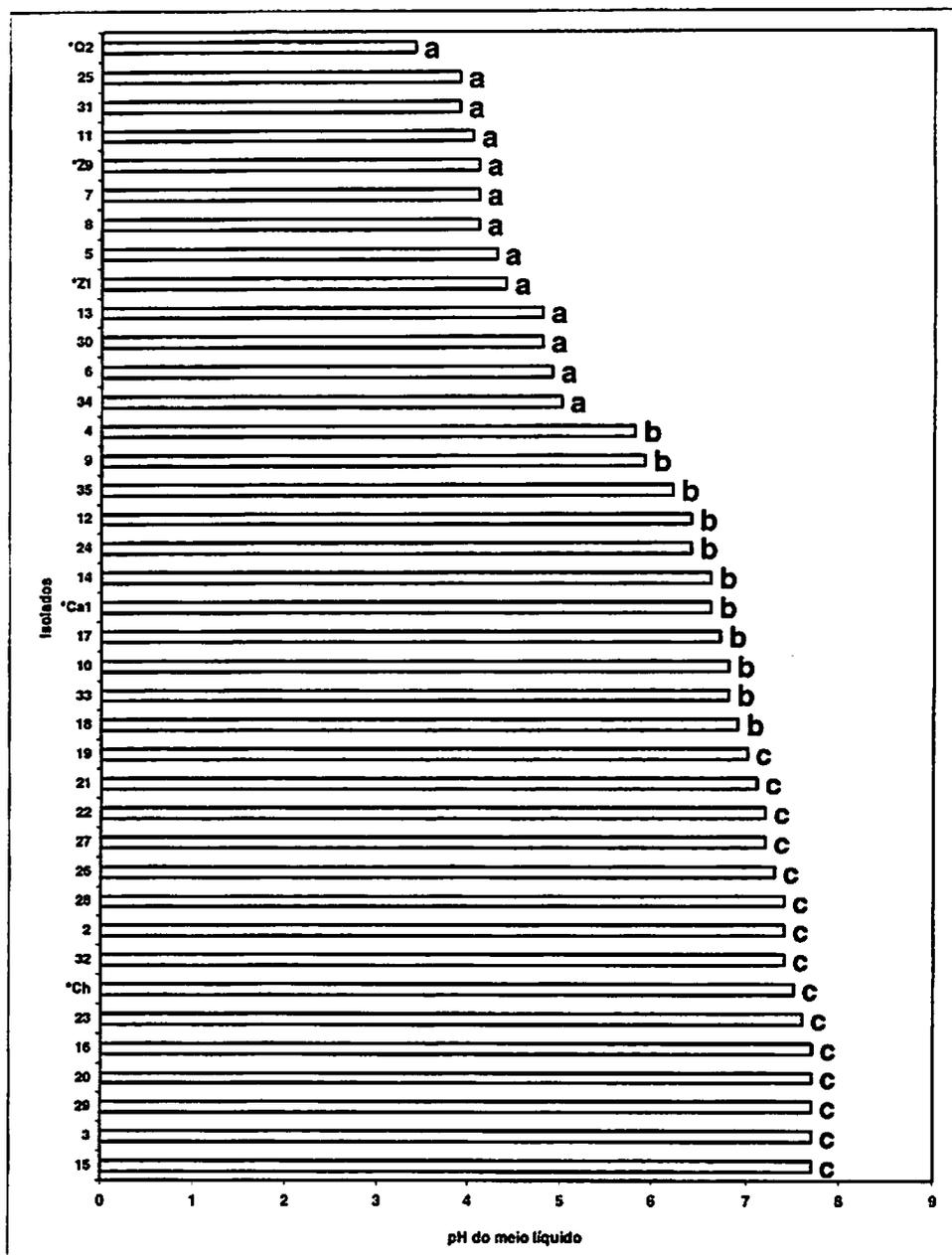


FIGURA 1 Comparação de pH final do meio extrato de malte 2% líquido de crescimento de isolados de *Colletotrichum* spp. Valores seguidos da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). *Isolados de *C. kahawae*. UFLA, Lavras, 2003.

6 CONCLUSÕES

Os isolados caracterizados de Minas Gerais metabolizaram tartarato como única fonte de carbono, portanto, não pertencem a *Colletotrichum kahawae*.

A técnica de citrato e tartarato como fontes de carbono para tipificar isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro é efetiva, dado que permite verificar a utilização dessas fontes de energia pelos isolados. É um teste de simples execução, econômico e rápido.

Foi encontrada variação entre valores de pH dos isolados de *Colletotrichum* spp. estudados e na análise de variância houve diferença significativa para essa variável.

Existe certa tendência dos isolados que ocasionam a CBD em acidificar o meio líquido, mas alguns isolados de Minas Gerais tiveram o mesmo agrupamento. Portanto, este teste é pouco prático para selecionar espécies deste fungo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. R.; MANSK, Z.; MATIELLO, J. B.; MULLER, R. A. Observações preliminares sobre queda de frutos sob suspeita de ataque por *Colletotrichum* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá-MG. Resumos... Araxá: IBC/GERCA, 1979. p. 323-326.
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 4-7, jan./mar. 1998.
- BRIDGE, P. D. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* Subsection *Fasciculata*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 131, n. 8, p. 1887-1895, Aug. 1985.
- DIAS, M. D. Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* L. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DORIZZOTTO, A. Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais. 1993. 67p. Dissertação –(Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LYNCH, J. M.; SLATER, J. H.; BENNETT, J. A.; HARPER, S. H. T. Cellulose activities of some aerobic micro-organisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 127, n. 2, p. 231-236, Feb. 1981.
- NECHET, K. de L. Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- OROZCO M. , E. F.; PIGOZZO, P.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. de. Estudo das relações compatíveis e incompatíveis de *Colletotrichum* spp. x cafeeiro. In: CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras, Anais... Lavras, MG: UFLA/APG, 2002.

PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. Surrey: International Mycological Institute, Surrey. 1994. 55p. (Technical Handbooks; n. 1).

SCHIEBER, E.; SENTMYER, G. A.; MITCHELL, D. J.; ROHEIM, J. Coffee berry necrosis in Guatemala and Costa Rica. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 11, p. 1542, Nov. 1970.

VÁRZEA, 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, Portugal.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES, C. J. Jr.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002.

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

CAPÍTULO 7

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. **Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. e *Colletotrichum kahawae* obtidos de cafeeiro, por meio de marcadores RAPD e SSR.** 2003. p.113-138. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração Fitopatologia)-UFLA, Lavras, MG¹.

1 RESUMO

Colletotrichum spp. é um patógeno importante associado à cultura do café. *C. kahawae* ocasiona a CBD na África, porém, não foi confirmada sua presença na América. Objetivou-se, neste trabalho, realizar a caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro por meio de marcadores RAPD ("random amplified polymorphic DNA") e SSR ("simple sequence repeats") para determinar a variabilidade genética e o parentesco entre os isolados do fungo no Brasil e alguns isolados que ocasionam a CBD. Assim, 30 isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de Minas Gerais (MG), Brasil, um isolado de *C. gloeosporioides* da China (Ch) e quatro isolados de *C. kahawae* foram estudados. As similaridades genéticas foram estimadas a partir das bandas polimórficas geradas por oito e dois "primers" para RAPD e SSR, respectivamente. Os resultados obtidos com a técnica RAPD estabelecem um coeficiente de similaridade maior de 80% para o grupo *C. kahawae*; nos isolados de MG, o coeficiente de similaridade variou entre 12% a 97%; entre isolados de *C. kahawae* e de *Colletotrichum* spp. oriundos de MG, 12-15%; entre o Ch e os isolados de MG, 48% e entre o Ch e *C. kahawae*, 12%. Os resultados obtidos por SSR estabelecem um coeficiente de similaridade de 100% para o grupo *C. kahawae*; nos isolados de MG o coeficiente de similaridade variou entre 67% a 100%, entre os isolados de *C. kahawae* e de *Colletotrichum* spp. de MG, 63%; entre o Ch e os isolados de MG, 96% e entre o Ch e *C. kahawae* 67%. Ambas as técnicas permitiram a separação clara dos isolados procedentes de MG e aqueles que ocasionam a CBD. Os isolados de MG, incluindo os que ocasionam a mancha manteigosa, apresentam um grau de variabilidade genética considerável e agrupam-se juntamente com o isolado de *C. gloeosporioides* da China. Com base no agrupamento dos isolados determinados na análise fenética, nos padrões consistentes de polimorfismos genômicos obtidos com as técnicas de RAPD e SSR e na associação de caracteres morfológicos dos isolados estudados, pode-se inferir que no grupo de isolados de MG existem duas espécies. *C. acutatum*, isolados 5, 7 e 17 e *C. gloeosporioides* para os demais.

¹ Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu -UFLA (Orientador)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-orientadora)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-orientador)
Mário Lúcio Vilela de Resende-UFLA (Co-orientador)

2 ABSTRACT

OROZCO MIRANDA, Edin Francisco. Molecular characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. and *Colletotrichum kahawae* obtained from the coffee tree by means of RAPD and SSR markers. 2003. p.113-138. Thesis (Doctorate in Agronomy, Major in Phytopathology)-UFLA, Lavras, MG¹.

Colletotrichum spp. is an important pathogen associated with coffee. In Africa, *C. kahawae* causes CBD, attacking developing unripe berries and it is the main factor limiting production. However, its presence was not confirmed in America. The current chapter was aimed at performing the molecular characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with coffee (*C. arabica*), by means of RAPD markers (random amplified polymorphic DNA) and SSR (simple sequence repeats) in order to determine the genetic variability and the relationship between fungal isolates from Minas Gerais (MG), Brazil and some isolates which cause CBD. Thus, 30 isolates of *Colletotrichum* spp. from different locations of MG, one isolate of *C. gloeosporioides* from China (Ch) and four isolates of *C. kahawae* were studied. The genetic similarities were estimated from the polymorphic bands generated by eight and two primers for RAPD and SSR, respectively. The results obtained with the RAPD technique established a coefficient of similarity greater than 80% for the group of *C. kahawae*; amongst isolates from MG, the similarity coefficient ranged from 12% to 97%; amongst isolates of *C. kahawae* and of *Colletotrichum* spp. from MG, 12-15%; amongst Ch and isolates from MG, 48% and between the Ch and *C. kahawae*, 12%. The results obtained by SSR established a similarity coefficient of 100% for the *C. kahawae* group; within isolates of MG, the similarity coefficient ranged from 67% to 100%, amongst the isolates of *C. kahawae* and *Colletotrichum* spp. from MG, 63%; amongst Ch and the isolates from MG, 96% and between Ch and *C. kahawae*, 67%. Both techniques enabled the clear separation of the isolates from Brazil and those which caused CBD. The isolates from MG, including those causing buttery spot, showed a marked degree of genetic variability and formed a group together with the isolate of *C. gloeosporioides* from China. Based on grouping of the isolates determined with the genetic analysis, in the solid patterns of genomic polymorphisms obtained with RAPD and SSR, and in the association of morphologic characters of the isolates, it is inferred that, within the group of isolates from Minas Gerais, there are two species. *C. acutatum* for isolates 5, 7 and 17 and *C. gloeosporioides* for the remaining ones.

Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu (Adviser)
Ana Isabel Faria Ribeiro-CIFC (Co-adviser)
Vitor Manuel Pinto Várzea-CIFC (Co-adviser)
Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

O relato original de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro no Brasil foi feito por Noack, em 1901 (Noack, 1902). Na África, *C. kahawae* ocasiona a doença conhecida como “coffee berry disease” (CBD), que ataca frutos verdes em desenvolvimento e é o principal fator limitante da produção (Beynon et al. 1995; Waller et al., 1993). Apesar da presença dessa espécie ainda não ter sido relatada na América, a ocorrência de *Colletotrichum* spp. é generalizada nas regiões cafeeicultoras brasileiras. No entanto, as poucas pesquisas já realizadas no Brasil para esse fitopatógeno, incluindo testes de patogenicidade com vários isolados de fungo em plântulas, mudas e frutos, não permitiram ainda esclarecer a importância do gênero *Colletotrichum* spp. como patógeno do cafeeiro e nem identificar as espécies a que pertencem aquelas populações do fungo presentes nas lavouras brasileiras.

Uma vez que o patossistema *Colletotrichum* spp. x cafeeiro no Brasil ainda não se encontra bem elucidado, estudos nas diversas áreas do conhecimento serão essenciais para a prevenção de problemas econômicos sérios que poderão ser ocasionados, caso a doença venha a tornar-se epidêmica nos países produtores de café da América.

Menciona-se que heterocariose e parassexualidade são fatores determinantes na heterogeneidade fenotípica de *Colletotrichum* spp. (Jeffries & Dodd, 1990). Assim, o conhecimento do grau de variabilidade genética e a determinação das relações filogenéticas entre as populações de *Colletotrichum* spp. constituem a base para o delineamento de estratégias de controle da doença e da taxonomia do fungo (Lopez, 2001).

A caracterização e a identificação das espécies requerem um sistema de marcadores flexível e confiável, capaz de resolver com elevado rigor questões

taxonômicas e filogenéticas. Este tipo de estudos baseia-se na avaliação de características morfológicas, bem como na utilização de técnicas moleculares que constituem hoje em dia um forte complemento à caracterização morfológica das espécies. Ao contrário dos métodos taxonômicos clássicos, os métodos moleculares permitem a análise de grandes populações num curto espaço de tempo, com sensibilidade e especificidade. A caracterização molecular faz a análise global do genoma por meio de técnicas de detecção de semelhanças e/ou diferenças genômicas, como a hibridação do DNA, os polimorfismos de restrição e os polimorfismos genômicos.

Entre as principais técnicas moleculares relatadas para análise genética de fungos, encontra-se o uso de isoenzimas, RFLP (“restriction fragment length polymorfism”), AFLP (“amplified fragment length polymorfism”), RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) e SSR (“simple sequence repeats”) (Beynon et al., 1995; Majer et al., 1996; Edel, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Nechet (1999) estudou a variabilidade em *Colletotrichum* spp. procedente do Brasil, com análise eletroforética das isoenzimas ADH (álcool desidrogenase), ACP (fosfatase ácida), EST (esterase) e MDH (malato desidrogenase), tendo concluído que, com essa técnica, foi possível diferenciar os isolados estudados. Vários autores (Rodriguez & Redman, 1992; Sreenivasaprasad et al., 1993; Edel, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998) relataram a utilização de técnicas moleculares, como RFLP, RAPD, ITS (“internally transcribed spacer”) e SSR, em estudos de variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. Por exemplo, Sreenivasaprasad et al. (1993) utilizaram as técnicas RFLP de DNA ribossomal e mitocondrial, RAPD e seqüenciamento da região ITS para elucidar a variação molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de diferentes espécies vegetais, tendo concluído que ambas as

técnicas permitiram o agrupamento de isolados de *C. kahawae* e a sua diferenciação dos isolados de *C. gloeosporioides*. Rodriguez & Redman (1992) e Edel (1998) mencionam que a técnica de RAPD está sendo amplamente utilizada para análise de genoma de *Colletotrichum*, dado que é sensível e permite a identificação das diferenças entre isolados, assim como de espécies. Segundo Rocheta et al. (1999), a utilização de SSR e RAPD permitiu a diferenciação intra e interespecífica de *Colletotrichum* spp. Utilizando as técnicas RFLPs, Beynon et al. (1995) estudaram a variação genética entre 25 isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes de diferentes locais da África, concluindo não ter sido detectado polimorfismo entre esses isolados. Porém, a técnica permitiu a separação de isolados de *C. kahawae* dos isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Silva et al. (1998) estudaram as características genéticas de 17 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de Minas Gerais, Brasil, com técnica de RAPD e, com base nos polimorfismos detectados, concluíram que existem vários patótipos infectando as lavouras de café nessa região.

Na seqüência da análise bioquímica dos isolados do Brasil, (Capítulo 6, desta tese) foi realizada a caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. e *Colletotrichum kahawae* obtidos de cafeeiro, por meio de marcadores RAPD e SSR. O trabalho teve como objetivo a determinação da variabilidade genética e do parentesco entre isolados do fungo existentes no estado de Minas Gerais e alguns isolados que ocasionam a CBD.

Na descrição do trabalho serão utilizadas as seguintes abreviações: SSR= "simple sequence repeats" = seqüências simples repetidas = microssatélite e RAPD = "random amplified polymorphic DNA" = DNA polimórfico amplificado ao acaso.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados estudados e culturas utilizadas

Foram utilizados trinta isolados coletados em vários locais do estado de Minas Gerais. Para comparação, foram incluídos quatro isolados de *C. kahawae* provenientes de países africanos e um isolado de *C. gloeosporioides* oriundo da China. Estes últimos foram fornecidos pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), local onde foi realizado o estudo, no ano 2003.

O micélio utilizado para extração de DNA para a análise molecular foi proveniente de culturas monospóricas de isolados de *Colletotrichum* spp. A origem dos isolados estudados, assim como o órgão da planta e sintoma a que estava associado, são apresentados na Tabela 1. Na maioria dos casos, os isolados foram provenientes de lavouras de café com problemas relevantes na produtividade.

4.2 Preparação dos isolados e extração de DNA

Os isolados cresceram separadamente em 50 mL de meio líquido contendo malte 3% e peptona 0,5%, esterilizado em autoclave a uma atmosfera de pressão e 120°C por 20 minutos. Foram realizadas duas repetições para cada isolado. No meio líquido, foram colocados cinco fragmentos contendo o micélio do fungo previamente crescido em meio malte ágar (3%). As culturas foram incubadas à temperatura de 20°C ± 2°C em earlenmeyers de 250 mL, durante 12 dias. Após crescimento, o micélio dos isolados foi coletado e filtrado em gaze. Imediatamente, foi congelado com nitrogênio líquido, macerado e armazenado a -80°C até sua utilização. O DNA das amostras foi extraído utilizando-se a metodologia citada por Raeder & Broda (1985).

TABELA 1 Procedência e relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados na caracterização molecular realizados no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, Portugal, 2003.

Isolado	Órgão	Sintoma	Procedência	Data
2	Folha	Mancha manteigosa	Piumhi	2001
3	Folha	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
4	Fruto	Necrose	Sto. Antônio do Amparo	2001
5	Folha	Necrose	Ouro Fino	2001
6	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
7	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras, UFLA	2001
8	Ramo	Necrose	Boa Esperança	1998
9	Folha	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
10	Ramo	Seca de ponteiros ⁺	Nepomuceno	2001
11	Fruto	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
12	Folha	Mancha manteigosa	Poço Fundo	2001
13	Fruto	Antracnose ⁺	Poço Fundo	2001
14	Fruto	Antracnose	Poço Fundo	2001
15	Folha	Mancha manteigosa	Turvolândia	2001
16	Ramo	Necrose	Ibituruna	1998
17	Ramo	Necrose	Muzambinho	2001
18	Ramo	Necrose	Varginha	1998
19	Ramo	Necrose	Patrocínio	1999
21	Folha	Necrose	Piumhi	1998
23*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
24*	Fruto	Necrose	Araguari	1998
25*	Fruto	Necrose	Canaã	1998
26	Fruto	Necrose	Teixeiras	1998
28	Fruto	Necrose	Araguari	1998
29	Ramo	Seca de ponteiros	Capelinha	2001
30	Fruto	Necrose	Ouro Fino	2000
31	Ramo	Necrose	Ijaci	2001
32	Ramo	Necrose	Cristais	2002
34	Fruto	Necrose	Cristais	2002
35	Folha	Necrose	Campo Belo	2002
36	Folha	Mancha manteigosa	Lavras, UFLA	2002
Ch	Fruto	Necrose	China ¹	1994
Z1	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1991
Z9	Fruto	Necrose	Zimbabwe ¹	1997
Ca1	Fruto	Necrose	Camarões ¹	1992

+ Proveniente de planta com sintoma de mancha manteigosa

* Isolados identificados como *C. gloeosporioides* na Universidade Federal de Uberlândia (UFU)/Depto. Fitopatologia. UFLA= Universidade Federal de Lavras.

¹Isolados identificados e fornecidos no CIFC

4.3 "Primers" para RAPD

Foram testados 44 "primers" dos "kits" A, C, D, F (Operon Technologies Inc., USA), nos isolados 5, 7, 12, 34 e 28 da lista indicada na Tabela 1. Com base no polimorfismo e definição de bandas, selecionaram-se os "primers": OPD3, OPD5, OPD6, OPD7, OPD8, OPD12, OPF1, OPF3, OPF4, OPF6, OPF7, OPF11, OPF12, OPF14, OPF20, OPC14 e OPC16. Estes "primers" foram, então, testados para os 35 isolados em estudo. Com base nos critérios de polimorfismo, definição de bandas e repetitividade dos resultados em 50% dos isolados, foram utilizados os "primers" OPC14, OPD5, OPD6, OPD8, OPD12, OPF1, OPF4 e OPF6 para este estudo.

4.4 "Primers" para SSR

Foram testados quatro "primers" GAGGGTGGCGGTTCT, (GTGC)₄, (TGTG)₅ e (GACA)₄, provenientes de Gibco-BRL, Life Technologies, UK. Com base na definição de bandas, polimorfismo e repetitividade dos resultados em 50% dos isolados, foram selecionados os "primers" (GTGC)₄ e GAGGGTGGCGGTTCT (M13) para análise final.

4.5 PCR e eletroforese

O protocolo para PCR foi adaptado de Williams et al. (1990) para o método de RAPD e de Martin et al. (1998) para SSR. As reações para PCR foram realizadas com uma mistura de Tris-HCl pH 8,4 a 20 mM; KCl a 50 mM; MgCl₂ a 3 mM; dNTPs a 0,2 mM; "primer" a 0,3 μM; 50 ng de DNA genômico e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, UK), num volume total de 25 μL. Para cada "primer" usado, foi incluído um controle negativo, no qual não foi colocado DNA molde. As reações de PCR foram efetuadas num termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando-se o seguinte programa: denaturação

inicial (RAPD: 2 min a 94°C; SSR: 5 min a 94°C); 40 ciclos: denaturação (1 min a 94°C), anelamento (RAPD: 1 min a 35°C; SSR: 1 min a 58°C para o "primer" (GTGC)₄ e a 55°C para o "primer" M13) e extensão (2 min a 72° C); extensão final (5 min a 72°C).

As bandas amplificadas por PCR foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1% , corado com 0,5µg/mL brometo de etídio, em tampão TAE 1x, a 100 V, por 90 minutos. Foi utilizado como marcador de peso molecular λ/Pst I (11.5-0.015 Kb). A visualização dos produtos de PCR foi realizada colocando o gel sobre uma fonte de luz UV e as imagens fotográficas adquiridas com uma máquina Polaroid DS 34.

4.6 Número total de bandas, polimorfismo, bandas exclusivas e poder de resolução dos "primers"

A partir dos padrões eletroforéticos obtidos para cada um dos "primers", efetuou-se a contagem do número total de bandas e determinou-se a porcentagem de bandas polimórficas. A determinação dos "fingerprintings" foi realizada visualmente. Foram excluídas as bandas tênues e as bandas amplificadas também nas reações controle, contemplando-se na análise estatística, as bandas com boa definição. Foram consideradas como bandas exclusivas aquelas presentes em apenas um dos isolados. O cálculo do poder de resolução dos "primers" foi determinado de acordo com Prevost & Wilkinson (1999), por meio da fórmula $R_p = \sum I_b$ em que I_b ("informativeness band") = $1 - [2x(0.5-p)]$, p = proporção de isolados testados contendo a banda.

4.7 Análise fenética

Com base nos "fingerprintings" obtidos, construíram-se matrizes retangulares individuais para cada um dos "primers" utilizados. A construção das

matrizes foi baseada em presença (1) ou ausência (0) de cada uma das bandas em todos os isolados. A análise das matrizes foi realizada com o aplicativo SIMQUAL do NTSYSpc versão 2,02h (Applied Biostatistics Inc., USA). Em seguida, foi aplicado o método de aglomeração pela média aritmética (UPGMA), baseado no coeficiente de semelhança de Dice (Priest & Austin, 1993), utilizando-se para tal o aplicativo SHAN do NTSYSpc. O agrupamento dos isolados foi obtido com o aplicativo TREE do NTSYSpc, sob a forma de dendrogramas. O coeficiente de correlação cofenética foi calculado com o programa MXCOMP do NTSYSpc. Coeficientes de correlação cofenética $r > 0,9$ foram considerados como sendo bons.

A análise fenética foi efetuada com base nas matrizes individuais geradas por cada “primer”, nas matrizes totais de cada um dos métodos, resultantes da junção das matrizes individuais, e na matriz total, resultante da combinação de todas as matrizes individuais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação por RAPD

Com base no cálculo dos poderes de resolução (Tabela 2), os “primers” OPF1, OPD8, OPC14, OPF6, e OPD12 revelaram ser os mais eficientes para discriminar geneticamente os isolados de *Colletotrichum* spp. aqui estudados. O número total de bandas amplificadas por RAPD variou entre 7 e 14, sendo o menor para os “primers” OPF4 e OPD6 e o maior para o “primer” OPF6. Em geral, os fragmentos amplificados para os “primers” estudados situaram-se entre 3 e 0,3 Kb. Conforme indicado na Tabela 2, 76 bandas polimórficas reproduzíveis foram obtidas e 9 bandas exclusivas (Figura 1) foram gerados a partir dos oito “primers” testados. Os padrões de bandas exclusivas obtidos neste estudo poderão constituir ferramentas para o desenvolvimento de marcadores moleculares de tipificação intraespecífica de *Colletotrichum* spp. Os padrões de amplificação obtidos com os “primers” OPF6 e OPC14 são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

De forma geral, observa-se que o padrão de bandas apresentado pelo grupo de isolados que ocasionam a CBD é bem definido e exclusivo em relação aos isolados do Brasil. Da mesma forma, o padrão de bandas amplificado nos isolados 36, 2, 9, 10, 11, 12, 13, e 15, que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa, é bastante similar. A semelhança dos padrões de amplificação (“fingerprintings”) e as características morfológicas entre os isolados do Brasil causadores da mancha manteigosa e do isolado chinês (Ch) parecem sugerir que estes isolados pertencem à mesma espécie.

TABELA 2 Número total de bandas (TB), bandas polimórficas (BP), percentagem de bandas polimórficas (P %), número de isolados diferentes (ID), poder de resolução (Rp) e número de bandas exclusivas (BE) obtidos com cada "primer", CIFC, 2003.

"PRIMER"	TB	BP	P (%)	ID	Rp	BE
OPC14	9	9	100	1	4,53	0
OPD5	9	9	100	2	3,20	2
OPD6	7	7	100	4	2,62	1
OPD8	10	10	100	4	4,88	2
OPD12	11	11	100	3	4,21	1
OPF1	9	9	100	2	4,88	1
OPF4	7	7	100	2	2,57	1
OPF6	14	14	100	5	4,71	1
Total RAPD	76	76	100	23	31,6	9
(GCGC) ₄	10	10	100	2	3,36	1
M13	12	12	100	4	4,38	2
Total SSR	22	22	100	6	7,74	3
RAPD + MS	98	98	100	29	39,34	12

ID = nº de isolados com um "fingerprinting" único/exclusivo

A semelhança dos "fingerprints" dos isolados 5, 7 e 17 corrobora os resultados da caracterização morfológica (Capítulo 2 desta tese). Esses isolados são de coloração rósea e crescimento micelial lento, o que leva a inferir que pertencem a *C. acutatum*. Para os isolados restantes de Minas Gerais, devido à semelhança que apresentam entre características morfológicas e moleculares com o isolado chinês, parecem pertencer a *C. gloeosporioides*. Estes resultados também são suportados pelas observações realizadas na UFU, onde foram classificados os isolados 23, 24 e 25 como *C. gloeosporioides*.

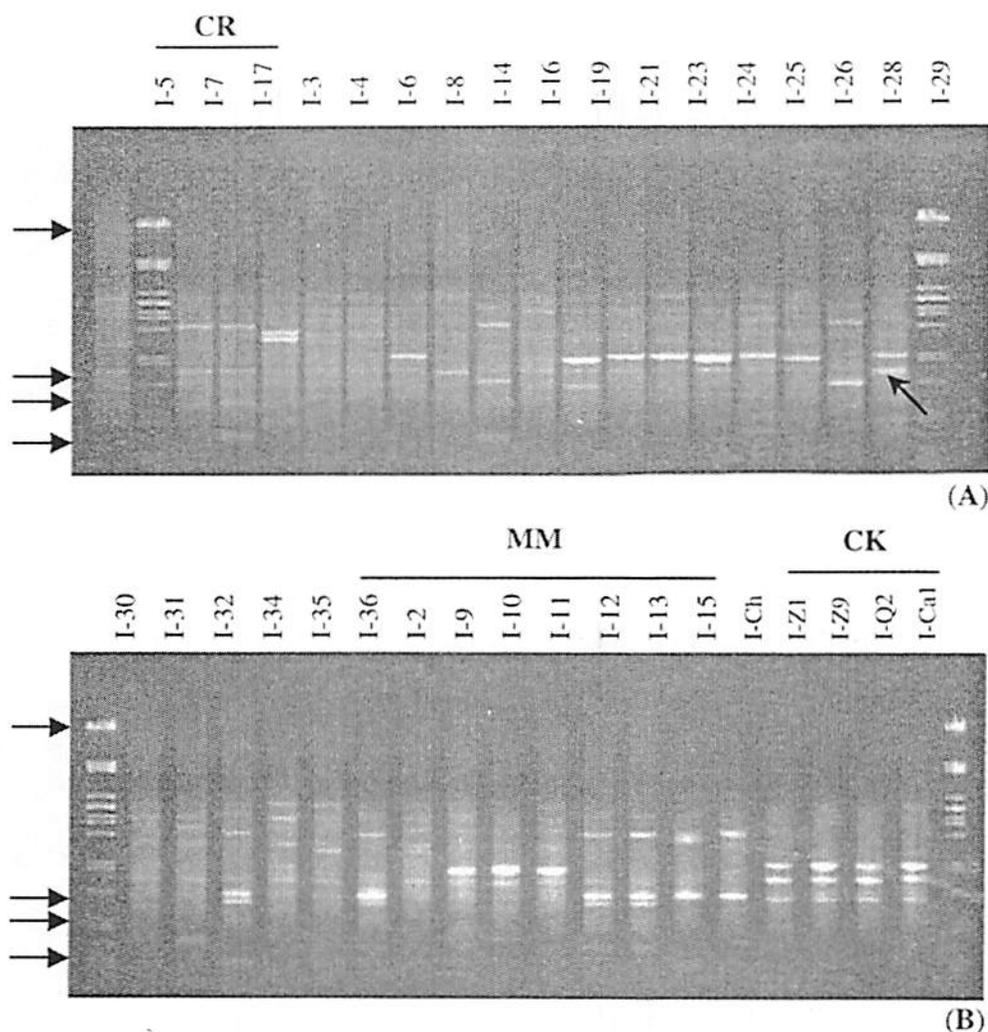


FIGURA 1 Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp., associados ao cafeeiro: marcadores RAPD, "primer" OPF6. I=isolado, Ch, isolado *Colletotrichum gloeosporioides*. Poços 2 e 20 (A), 1 e 20 (B) correspondem ao marcador de peso molecular λ /Pst I. De cima para baixo, as setas à esquerda apontam para as bandas com os seguintes tamanhos: 11,5, 1,2, 0,8 e 0,22 Kb. CK=padrão de bandas para os isolados de *C. kahawae*, MM= padrão de bandas para os isolados que ocasionam sintomas de mancha manteigosa no Brasil e CR= padrão de bandas para os isolados de coloração rósea. Seta no I-29 sinaliza banda exclusiva.

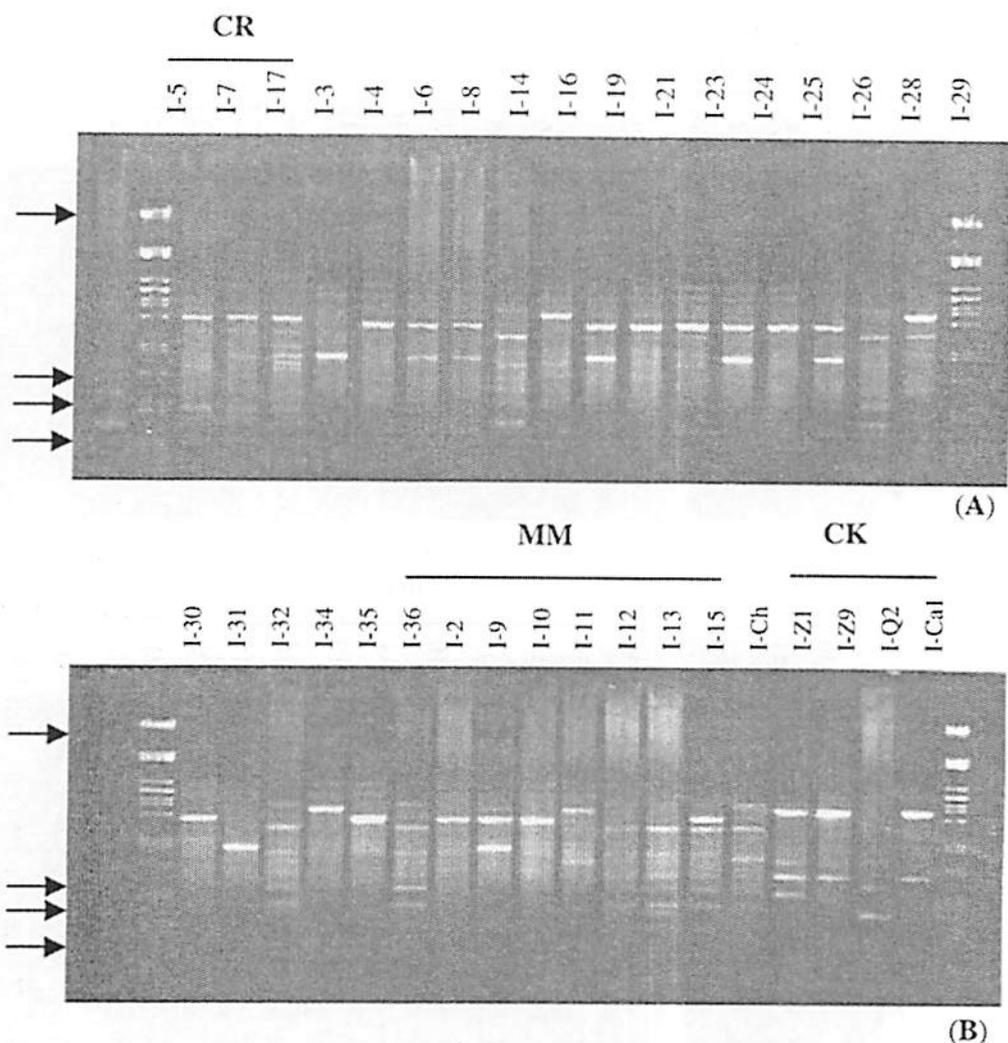


FIGURA 2 Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp., associados ao cafeeiro: marcadores RAPD, primer OPC14. I=isolado, Ch, isolado *Colletotrichum gloeosporioides*. Poços 2 e 20 (A), 1 e 20 (B) correspondem ao marcador de peso molecular λ Pst I. De cima para baixo, as setas à esquerda apontam para as bandas com os seguintes tamanhos: 11,5, 1,2, 0,8 e 0,22 Kb. CK=padrão de bandas para os isolados de *C. kahawae*, MM=padrão de bandas para os isolados que ocasionam sintomas de mancha manteigosa no Brasil e CR=padrão de bandas para os isolados de coloração rósea.

5.2 Análise fenética dos RAPD

Resultados da análise fenética conjunta para RAPD permitiram a tipificação dos isolados estudados. Conforme se pode constatar no dendrograma apresentado na Figura 3, existem dois grandes grupos, que se subdividem em dois e quatro subgrupos, respectivamente, que, de forma geral, corroboram os resultados obtidos nas observações morfológicas que foram discutidas no Capítulo 2 desta tese.

Os isolados 5, 7 e 17 pertencem ao primeiro subgrupo, Figura 3, que foram considerados morfológicamente idênticos, por apresentarem micélio de coloração rósea, crescimento micelial lento e caracteres de conídios retos, fusiformes. De acordo com a separação na análise fenética do grupo total de isolados estudados do Brasil e suas respectivas características morfológicas, estes enquadram-se em *Colletotrichum acutatum*. O coeficiente de similaridade deste grupo foi de cerca de 55%.

O segundo subgrupo engloba os isolados 14, 12, 13, 32, 36, 15, 28 e Ch de *C. gloeosporioides* procedente da China. Este resultado permite inferir que isolados de Minas Gerais, neste subgrupo, pertencem a *C. gloeosporioides*. Os isolados 12, 13, 15 e 36 ocasionam o sintoma de mancha manteigosa; os isolados 14, 28 e 32 causam outros sintomas em frutos e ramos. O coeficiente de similaridade entre estes isolados variou entre 48% a 97% e, de acordo com o dendrograma, apresentam alta variabilidade.

O subgrupo 3 abrange os isolados: 3, 4, 16, 19, 26, 24, 25, 30, 35, 31, 34, 21, 23, 6, 8, 2, 10, 9 e 11. Estes isolados foram coletados em diferentes locais de MG, associados a vários sintomas e com características morfológicas bastante parecidas, excetuando-se os isolados 2, 10, 9 e 11, que ocasionam o sintoma da mancha manteigosa. Os isolados 23, 24 e 25, identificados como sendo da espécie

C. gloeosporioides e que foram cedidos no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), ficaram dentro deste subgrupo. O coeficiente de similaridade entre os isolados deste grupo foi maior que 53%.

O quarto subgrupo é formado unicamente pelo isolado 29, procedente do Brasil, caracterizado por ser um dos poucos isolados que formam estruturas da fase teleomórfica de *C. gloeosporioides* em meio de cultura.

O subgrupo 5 reúne os isolados que ocasionam a CBD, pertencentes à espécie *C. kahawae*. Estes isolados tiveram coeficiente de semelhança maior que 80%, sendo geneticamente semelhantes.

O grupo de isolados de *C. kahawae* apresenta-se altamente homogêneo, com um coeficiente de similaridade maior que 80%. O coeficiente de similaridade dos isolados procedentes do Brasil variou entre 12% e 97%, enquanto o grau de variabilidade genética entre isolados de *C. kahawae* e de *Colletotrichum* spp. oriundos do Brasil, atingiu os 85% (coeficiente de semelhança de 15%). Entre o Ch e os isolados do Brasil, o coeficiente de similaridade foi de 48%; entre o Ch e *C. kahawae*, 12%.

De forma geral, verifica-se que existe uma considerável variabilidade genética entre os isolados de *Colletotrichum* spp. estudados. Houve concordância entre observações morfológicas e da análise molecular. Estes resultados corroboram com os obtidos por Begnon et al. (1995), Silva et al. (1998) e Rocheta et al. (1999) utilizando a mesma técnica e patossistema.

Além da variabilidade genética observada nos isolados de *Colletotrichum* spp. com o marcador RAPD, a técnica permitiu a separação clara dos isolados oriundos do Brasil e os pertencentes a *C. kahawae* procedentes da África. A informação obtida neste estudo parece confirmar que a espécie *C. kahawae*, que ocasiona a CBD, não existe no Brasil na cultura do café. Esta informação é congruente com as afirmações de Waller et al. (1993) baseadas em estudos de

morfologia, metabolismo e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* e de Sreenivasaprasad et al. (1993) utilizando marcadores RFLP.

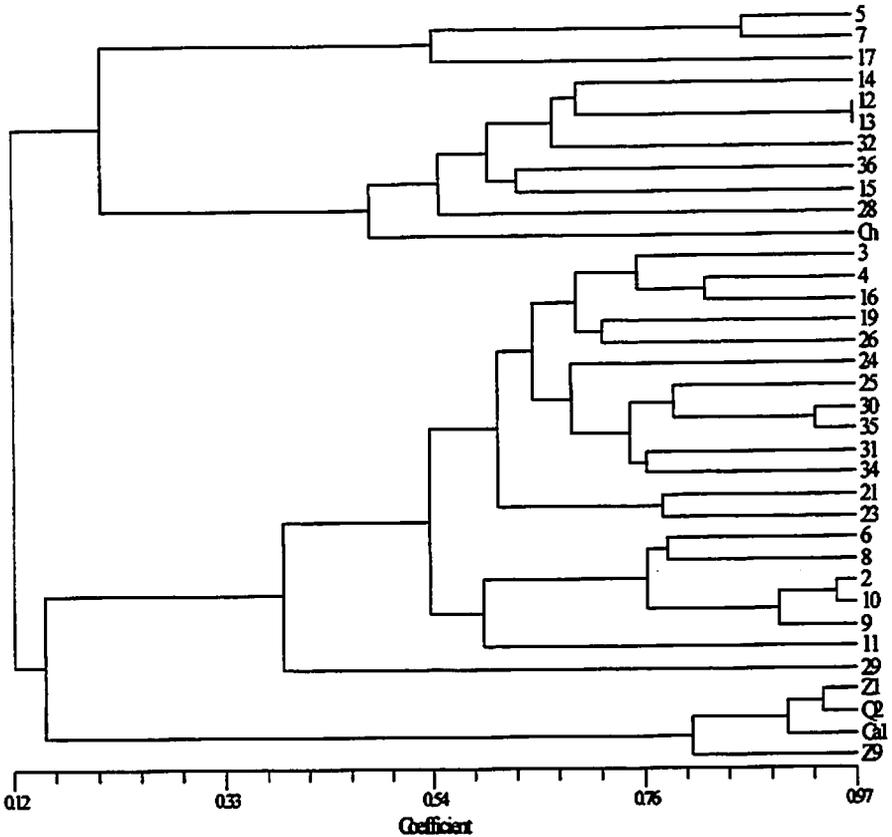


FIGURA 3 Dendrograma obtido por meio da análise conjunta com oito "primers" marcadores RAPD, mostrando as inter-relações de isolados de *Colletotrichum* spp., utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA. I = isolado, Ch = isolado *Colletotrichum gloeosporioides* procedente da China; Z1, Z9, Q2 e Ca1 = isolados de *Colletotrichum kahawae*.

5.3 Amplificação por SSR

O poder de resolução, determinado de acordo com Prevost & Wilkinson (1999), foi de 4,38 e 3,36 para os "primers" (M13) e (GTGC)₄, respectivamente.

De acordo com estes valores, o "primer" M13 permitiu a melhor discriminação dos isolados estudados. Conforme indicado na Tabela 2, 22 bandas polimórficas reproduzíveis foram observadas com dois "primers", sendo 10 e 12 o número de bandas correspondentes aos "primers" (GTGC)4 e M13, respectivamente. O tamanho de bandas amplificadas variou entre 3 a 0,3 Kb. Foram obtidas 1 e 2 bandas exclusivas para os mesmos "primers", respectivamente (Figura 4).

Nos "fingerprints" do "primer" (GTGC)4, observa-se que o padrão de bandas apresentado pelo grupo de isolados do grupo *C. kahawae*, dos isolados 2, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 36 que ocasionam a mancha manteigosa e dos isolados 5, 7 e 17 caracterizados por posuírem micélio rósea, foi bem definido (Figura 4). Os "fingerprints" obtidos com o "primer" M13 (resultados não apresentados) foram quase idênticos em todos os isolados. Mesmo não sendo específicos para isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro, estes "primers" revelaram um padrão consistente de polimorfismos genômicos conduzindo à amplificação de bandas características para os isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes do Brasil e para os isolados de *C. kahawae*.

5.4 Análise fenética de SSR

Resultados da análise fenética conjunta para SSR permitiram um agrupamento dos isolados semelhante ao obtido por meio de RAPD.

No dendrograma gerado foram obtidos dois grandes grupos a partir dos 35 isolados estudados (Figura 5). O primeiro grupo subdividiu-se em seis subgrupos (subgrupo 1 a 6) e o segundo grupo inclui apenas um subgrupo (subgrupo 7) que apenas engloba os *C. kahawae*. No primeiro subgrupo, ficaram os isolados 5, 12, 13, 7 e 17, com um coeficiente de similaridade de 85%; os isolados 12 e 13, que ocasionam o sintoma da mancha manteigosa, têm 100% de semelhança. No segundo, ficaram os isolados 3, 16, 35 e 34, com um coeficiente

de semelhança de 94% e os isolados 24, 4, e 25, com coeficiente de 87%. No terceiro grupo, os isolados 6, 8, 29, 30, 21, 26, 19, 2, 31, 10, 9 e 11 apresentaram-se bastante idênticos com coeficiente de semelhança mínimo de 85%; os isolados 2, 9, 10 e 11 também ocasionam o sintoma de mancha manteigosa. O isolado 23, classificado na Universidade Federal de Uberlândia como *C. gloeosporioides*, constitui o quarto subgrupo. O subgrupo 5, com um alto nível de parentesco (95% de semelhança), abrange os isolados 32, 36, 15 e Ch de *C. gloeosporioides* procedente da China. As relações filogenéticas obtidas entre o isolado chinês e os isolados que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa (36 e 15) sugerem que os isolados que ocasionam esse sintoma no cafeeiro pertencem a *C. gloeosporioides*. Este resultado está de acordo com o resultado obtido com a técnica RAPD. No sexto subgrupo, os isolados 14 e 28 têm coeficiente de similaridade de 82%. No sétimo subgrupo, com um alto nível de relacionamento (100% de semelhança), estão os isolados Z1, Ca1, Q2 e Z2, pertencentes à espécie *C. kahawae*, um grupo totalmente diferente daqueles isolados do Brasil e China.

Ao contrário dos isolados de *C. kahawae*, procedentes da África, observou-se considerável variabilidade genética entre os isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes do Brasil. Neste caso, o coeficiente de semelhança variou entre 67% e 100% e entre os isolados de *C. kahawae* e de *Colletotrichum* spp. oriundos de Minas Gerais, 62%. A discrepância observada entre os coeficientes de similaridade obtidos pelos dois métodos poderá ser atribuída ao reduzido número de “primers” usado na análise ou ainda a um menor poder discriminante da técnica SSR. Mesmo assim, o uso de marcadores moleculares SSR para este estudo permitiu o agrupamento de isolados pelo sintoma que ocasionam, pelas características morfológicas e espécies. Os resultados obtidos sugerem que esta técnica parece ser eficiente para caracterizar

isolados de *Colletotrichum* spp. Contudo, para este estudo, o uso de RAPD foi de maior eficiência na definição dos padrões para os isolados caracterizados.

5.5 Análise conjunta dos dados de marcadores RAPD e SSR

A análise conjunta dos resultados de RAPD e SSR foi feita para gerar um dendrograma baseado num maior número de “primers” e obter uma melhor tipificação dos isolados e consistência nos resultados. O dendrograma gerado na análise conjunta de dados (Figura 6) foi análogo ao obtido com RAPD.

As técnicas RAPD e SSR mostraram-se apropriadas para tipificar os isolados de *Colletotrichum* spp. Os resultados obtidos com ambas as técnicas permitiram constatar que os isolados de *Colletotrichum* spp. aqui estudados e associados às lavouras de cafeeiro em Minas Gerais não pertencem à espécie *C. kahawae*. Ainda, os “fingerprints” típicos observados para *C. kahawae* facilitarão a detecção rápida desta espécie em estudos futuros, caso a doença apareça no Brasil.

Com base no agrupamento dos isolados determinados na análise fenética, nos padrões consistentes de polimorfismos genômicos obtidos com as técnicas de RAPD, SSR e na associação de caracteres morfológicos dos isolados estudados, infere-se que no grupo de isolados de Minas Gerais, Brasil existem duas espécies. *C. acutatum* (isolados 5, 7 e 17) e *C. gloeosporioides* para os restantes. A elevada variabilidade genética observada nos isolados considerados como *C. gloeosporioides*, associados a sintomas de mancha manteigosa, seca de ponteiros e necrose em frutos, pode explicar a existência de raças patogênicas dessa espécie, tal como demonstrado nos Capítulos 3 e 4 desta tese.

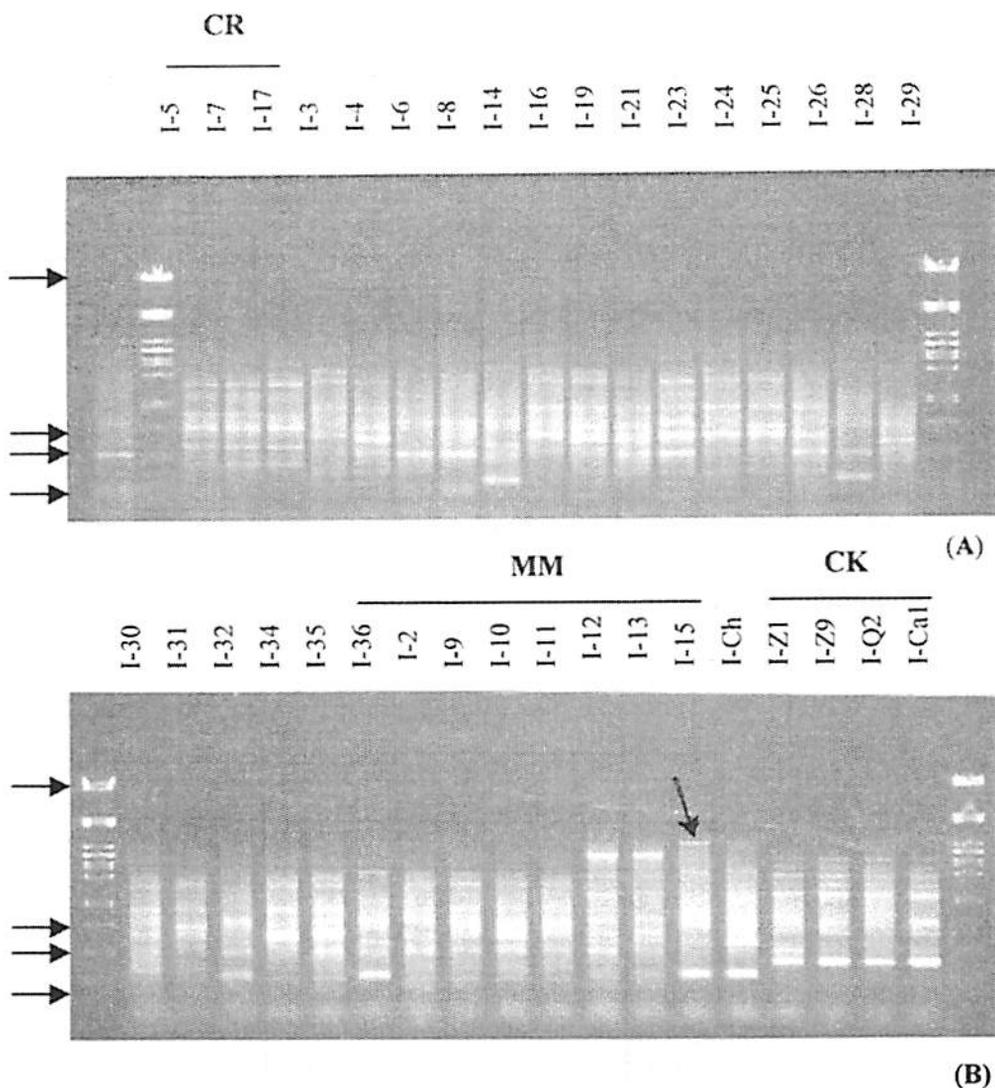


FIGURA 4 Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro: marcadores SSR, "primer" (GTGC)₄. I = isolado, Ch, isolado de *C. gloeosporioides*. Poços 2 e 20 (A), 1 e 20 (B) correspondem ao marcador de peso molecular λ /Pst I. De cima para baixo, as setas à esquerda apontam para as bandas de tamanho 11,5, 1,2, 0,8 e 0,22 Kb. CK = padrão de bandas para os isolados de *C. kahawae*, MM = padrão de bandas para os isolados que ocasionam sintomas de mancha manteigosa no Brasil e CR = padrão de bandas para os isolados de coloração rósea. Seto no I-15 sinaliza banda exclusiva.

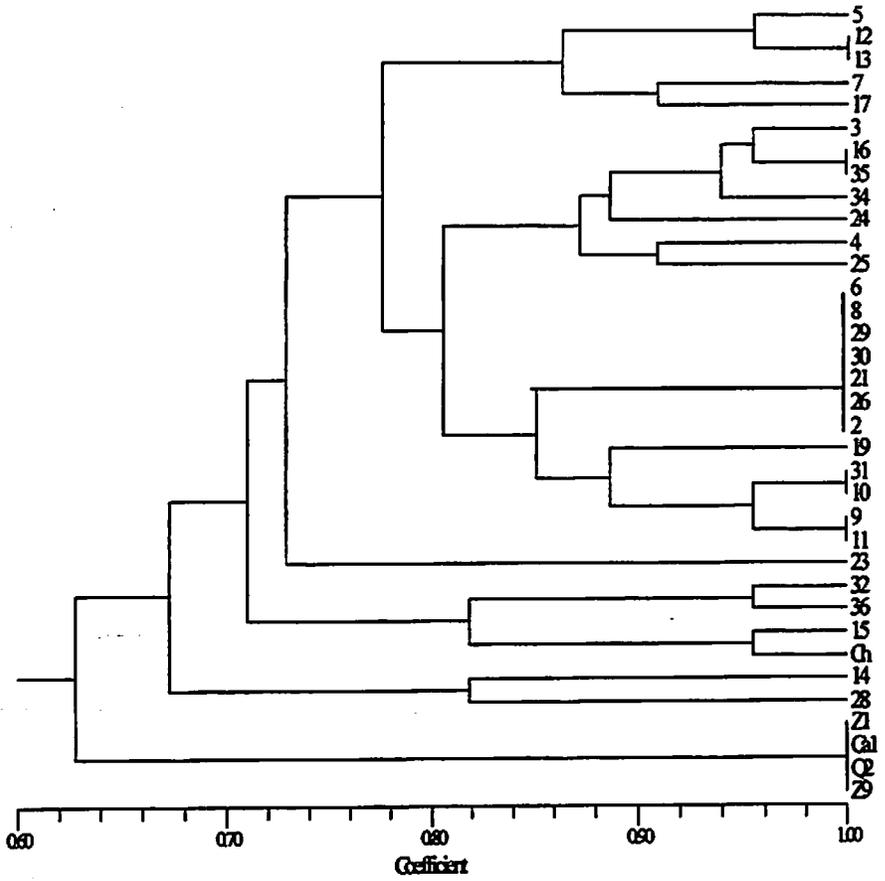


FIGURA 5 Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp., dendrograma de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos com marcadores SSR, utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA. I = isolado, Ch = isolado *Colletotrichum gloeosporioides* procedente da China; Z1, Z9, Q2 e Cal = isolados de *Colletotrichum kahawae*.

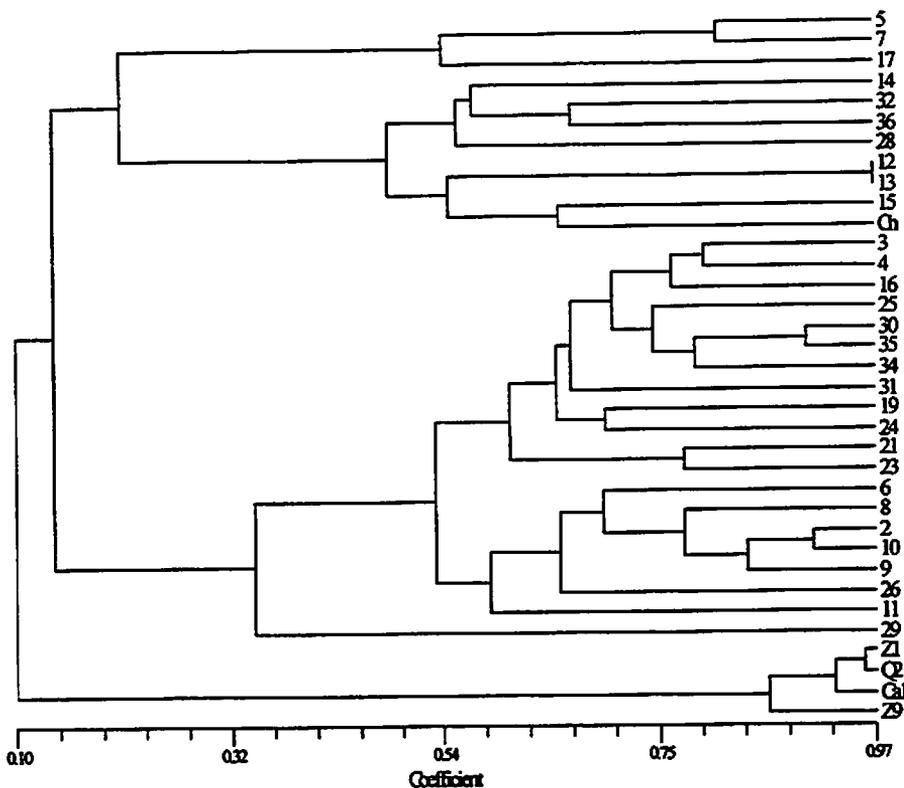


FIGURA 6 Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp., dendrograma de análise conjunta de oito e dois "primers" de RAPD e SSR, respectivamente, utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA. I = isolado, Ch = isolado *Colletotrichum gloeosporioides* procedente da China; Z1, Z9, Q2 e Ca1 = isolados de *Colletotrichum kahawae*.

6 CONCLUSÕES

As técnicas RAPD e SSR mostraram-se apropriadas para tipificar os isolados de *Colletotrichum* spp. Os isolados de *Colletotrichum* spp. aqui estudados e associados às lavouras de cafeeiro em Minas Gerais não pertencem à espécie *C. kahawae*.

Na técnica RAPD, os “primers” OPF1, OPF6, OPD8, OPC14 e OPD12 foram os mais eficientes para discriminar geneticamente isolados de *Colletotrichum* spp.; no caso da SSR, o “primer” M13 apresentou o maior poder discriminante.

O dendrograma gerado na análise conjunta de dados de RAPD e SSR foi análogo ao obtido com RAPD.

O elevado coeficiente de similaridade determinado na análise fenética entre o grupo de isolados de *C. kahawae* indica que este grupo parece ser geneticamente muito homogêneo. No caso dos isolados procedentes do Brasil, os coeficientes de similaridade tiveram maior variação. O isolado chinês apresentou maior semelhança genética com o grupo de isolados do Brasil.

Baseado nas relações filogenéticas, determinadas na análise fenética com as técnicas RAPD e SSR, entre o isolado chinês e os isolados que ocasionam o sintoma de mancha manteigosa, pode-se inferir que os isolados associados a esse sintoma no cafeeiro pertencem a *Colletotrichum gloeosporioides*.

De acordo com os resultados da caracterização molecular e associação com os estudos morfológicos, conclui-se que os isolados de Minas Gerais, 5, 7 e 17 pertencem a *C. acutatum* e os demais a *C. gloeosporioides*.

A elevada variabilidade genética observada nos isolados considerados como *C. gloeosporioides*, associados a sintomas de mancha manteigosa, seca de ponteiros e necrose em frutos, pode explicar a existência de raças patogênicas desta espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEYNON, S. M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, B. G.; VÁRZEA, V. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, n. 6, p. 457-476, June 1995.
- EDEL, V. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. **A applications of PCR in mycology**. London: CAB International, 1998. p. 1-20.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CNPGRGB, 1998. 220 p.
- JEFFRIES, P.; DODD, J. C. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 343-366, Sept. 1990.
- 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.
- MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B.; VOS, P.; OLIVER, R. The use of AFLP fingerprinting for detection of genetic variation in fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 9, p. 1107-1111, Sept. 1996.
- MARTIN, F.; COSTA, G.; DELARUELLE, C.; DIEZ, J. Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. In: VARMA, A. (Ed.). **Mycorrhiza Manual**. Berlin: Springer, 1998. p. 463-474.
- NECHET, K. de L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n. 1, jan. 1902.

PREVOST, A.; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical Applied in Genetics**, Berlin, v. 98, p. 107-112, 1999.

PRIEST, F.; AUSTIN, B. **Modern bacterial taxonomy**. 2. ed. London: Chapman Hall, 1993. Chap. 2: Numeral taxonomy, p. 14-49.

RAEDER, V.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied in Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

ROCHETA, M.; COELHO, T.; BESSA, A.; DIAS, A.; VÁRZEA, V.; RODRIGUES JR., C.; TENREIRO, R. Obtenção de marcadores moleculares em *Colletotrichum* spp. isolados de cafeeiro (*Coffea arabica*). SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. Anais... Londrina, Brasil: Instituto Agronômico de Paraná. p. 129-132.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Molecular transformation and genome analysis of *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. British Society for Plant Pathology, 1992. p. 47-63.

SILVA, C. C. N.; JULIATTI, F.; POSSA, E.; GIOVANINI, M.; SILVA, S. Características fisiológicas e genéticas de isolados de *Colletotrichum* sp. coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica*) de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CAFEICULTURA IRRIGADA, 1., 1998, Araguari - MG, 1998. p. 97-100.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, New York, v. 97, n. 8, p. 995-1000, Aug. 1993.

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

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro no estado de Minas Gerais é muito importante e complexo. Tratam-se de populações de espécies de *Colletotrichum* associadas ao café, ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma invasiva sem manifestação de sintomas. Os isolados contemplados neste estudo foram provenientes de material vegetativo com sintomas de antracnose em folhas, frutos, mancha manteigosa, queda de flores e frutos e seca de ponteiros.

Com base nas características morfológicas, culturais, bioquímicas, na caracterização molecular e nos ensaios de patogenicidade em frutos verdes e com hipocótilos, conclui-se que os isolados de *Colletotrichum* spp. estudados, provenientes de cafeeiro em Minas Gerais, Brasil, pertencem as espécies *C. acutatum* (isolados 5, 7 e 17) e *C. gloeosporioides* (restantes isolados). Os isolados considerados como *C. gloeosporioides*, que ocasionam os sintomas de mancha manteigosa, seca de ponteiros e necrose em frutos, constituem raças patogênicas desta espécie, tal como foi demonstrado no Capítulo 3 desta tese. Propõe-se que, a partir destes estudos, seja utilizada a denominação *Colletotrichum gloeosporioides* raça mancha manteigosa, para todos os isolados do fungo que ocasionam aquele sintoma.

Por meio das técnicas de caracterização molecular, bioquímica e algumas características morfológicas, demonstrou-se que os isolados do Brasil diferem claramente de *C. kahawae*. O fato de não pertencer a essa espécie não implica que estes isolados não sejam patogênicos. Resultados dos testes de resistência em hipocótilos e cortes histopatológicos (Capítulo 3 desta tese) e testes de patogenicidade em frutos (Capítulo 4) permitiram concluir que existem isolados associados ao cafeeiro em MG que são patogênicos. Isto contrapõe-se àquelas

afirmações segundo as quais os isolados deste fungo associados ao cafeeiro no Brasil são “não patogênicos, secundários, saprófitas ou oportunistas”. Várzea (1995) menciona que determinados isolados *C. gloeosporioides* comportam-se como patogênicos sob condições ambientais especiais. Sabe-se que toda doença é produto de uma interação entre o patógeno, hospedeiro e o ambiente favorável para que ocorra. Possivelmente, as condições ambientais em Minas Gerais, principalmente o clima, não são as adequadas para o desenvolvimento de epidemias. Isto deve ser estudado com trabalhos epidemiológicos e outras áreas do conhecimento de maneira interdisciplinar para a prevenção de problemas futuros.

Estudos de patogenicidade em frutos de café arábica livres de *Colletotrichum* realizados no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal, permitiram observar a patogenicidade do isolado 15 (ocasiona sintoma de mancha manteigosa) de forma similar àquela manifestada pelos isolados Ca1, Z1 e Z9 que ocasionam a CBD, mesmo não sendo das mesmas espécies.

Estudos histopatológicos realizados no CIFC permitiram também observar que o patógeno infecta a planta quando existe suscetibilidade, como no caso da cultivar Catucaí Vermelho, suscetível a isolados que ocasionam mancha manteigosa (por exemplo, isolado 12). O fungo invade os tecidos da planta, as hifas colonizam os tecidos provocando necrose e morte. Cortes transversais de hipocótilos de café da cultivar Tupi, que foi considerada resistente (Capítulo 3 desta tese), mostram que, aos dez dias após inoculação com o isolado 12 considerado patogênico, houve formação de lesões tipo crosta (“scab lesion”). Este, possivelmente, é um mecanismo de resistência ao ataque do patógeno e deve ser mais explorado por meio de histopatologia e aproveitado pelos programas de melhoramento para orientar as pesquisas de resistência a este fitopatógeno.

Algumas das técnicas utilizadas para caracterizar os isolados e determinar as espécies, individualmente mostraram-se eficientes, porém, a utilização destas de forma conjunta é necessária para dar solidez aos resultados.

Na caracterização morfológica foi encontrada grande variação das características estudadas. Assim, alguns critérios utilizados com este método clássico para determinação de espécies têm limitações. Por exemplo, a coloração dos isolados que ocasionam a mancha manteigosa no Brasil foi semelhante à coloração de alguns isolados de *C. kahawae* (Figura 6A, Capítulo 2). Contudo, este critério foi usado por Waller et al. (1993) para distinção de isolados de *C. kahawae* de isolados de *C. gloeosporioides*, associadas ao cafeeiro. O crescimento micelial da maioria dos isolados foi considerado como rápido (8,5 a 10,6 mm d⁻¹ a 25°C). Foi útil na tipificação dos isolados de MG aqui estudados, pelo fato de os isolados de *C. kahawae* serem de crescimento lento (2-4 mm d⁻¹ a 25°C) (Waller et al., 1993). A temperatura influencia muito as características desse microrganismo. A melhor temperatura para o crescimento micelial desses isolados foi a 25°C.

Tamanho e forma de conídios foram variáveis e não foram considerados bons critérios para caracterização dos isolados. Por exemplo, no agrupamento pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$) para dimensões de conídios, isolados que ocasionam a CBD foram agrupados com alguns dos isolados do Brasil. Assim, são caracteres pouco confiáveis para tipificar espécies, embora sejam critérios utilizados por Sutton (1980). Formação e forma dos apressórios foram constantes para todos os isolados. Observou-se presença ou ausência de formação de acérvulos e de estruturas da fase teleomórfica. Esta última característica deve ser mais estudada como critério para diferenciação de isolados, principalmente os que ocasionam mancha manteigosa. A formação do teleomorfo deve ser considerada como outra importante característica para tipificação de espécies, por não ser

comum em isolados de *C. kahawae* (Waller et al., 1993; Várzea, 1995). Também porque permite variabilidade do fungo, geração de novas raças e adaptação ao ambiente. Provavelmente, esta característica está ligada à patogenicidade observada nos isolados que ocasionam mancha manteigosa. Assim, para esta pesquisa, os caracteres morfológicos não foram utilizados de forma individual para discriminar os isolados de *Colletotrichum* associados ao cafeeiro, porém, de forma conjunta permitiram a identificação de espécies.

Na determinação da resistência de cultivares de café (Capítulo 3 desta tese), foi evidenciada a existência de raças fisiológicas. Este fato já foi observado para os isolados que ocasionam a CBD (Várzea et al., 2002), sendo esta outra característica biológica comum entre as espécies de *Colletotrichum* associadas ao cafeeiro na África e América. Ainda, nas inoculações de hipocótilos realizadas no CIFC, o tempo de aparecimento dos sintomas, sintomatologia e morte de hipocótilos de café foram análogos entre os isolados de *C. kahawae* e *Colletotrichum* spp. do Brasil, nas relações consideradas compatíveis. Nos ensaios conduzidos na UFLA, de novo, foi constatada a colonização invasiva do fungo sem manifestação de sintomas nas plântulas de café. Este último aspecto foi observado e citado por Orozco et al. (2002c). A partir destes resultados, testes em hipocótilos deverão ser realizados com vários isolados. Os métodos de controle devem considerar a biologia deste fitopatógeno. Por exemplo, recepa de plantas doentes com mancha manteigosa não solucionam o problema dado que existe um fator de suscetibilidade no hospedeiro e associação do patógeno. As aplicações de produtos fungicidas de contacto podem ter pouco sucesso e os sistêmicos devem ser previamente testados para serem recomendados. Melhoramento orientado à resistência vertical não é prático, dado que se trata de uma cultura perene.

Os testes de inoculação do fungo em hipocótilos também permitiram demonstrar que nas cultivares utilizadas pelos agricultores, existem variedades com diferentes graus de resistência e existem aquelas suscetíveis. No CIFC, foi determinado que todas as cultivares comerciais utilizadas pelos agricultores no Brasil foram suscetíveis ao isolado Ca1 de *C. kahawae*. Este fato é preocupante, pois não existem fontes de resistência à CBD, caso algum dia esta doença apareça na América.

Os testes de patogenicidade dos isolados em frutos verdes de café permitem obter uma estimativa da patogenicidade dos isolados de acordo com os sintomas de necrose que são observados. Porém, têm a limitante de que alguns frutos colhidos no campo chegam com presença de *Colletotrichum*. Isto pode prejudicar as avaliações e ocasionar erros. Entretanto, em ensaios realizados no CIFC com frutos livres do patógeno, sintomas de necrose em frutos de café foram observados 4 e 7 dias para os isolados que ocasionam a CBD. Para isolados procedentes de MG, os sintomas manifestaram-se nove dias após infecção do patógeno. Os isolados que ocasionam a CBD ocasionaram 100% de incidência de necrose nos frutos na cultivar Catucaí e o isolado 15, que ocasiona a mancha manteigosa no Brasil, manifestou 83% de incidência de necrose em frutos na mesma cultivar, diferindo no tempo de ocorrência da doença.

Com isto, fica demonstrada a patogenicidade de alguns isolados do Brasil e testes de patogenicidade em frutos verdes tornam-se efetivos. A produção controlada de frutos para esse objetivo evitaria esses problemas. Ainda, os sintomas de necrose observados em frutos foram similares para os isolados que ocasionam a CBD e os que ocasionam a mancha manteigosa. O amadurecimento rápido que ocorre quando os frutos são inoculados com o fungo deve ser pesquisado *in situ* para avaliar o efeito na produtividade. Estes resultados são

coerentes com o primeiro alerta de patogenicidade de *Colletotrichum* em cafeeiro, dado por Dorizzotto & Abreu (1993), em MG.

Foi determinada alta incidência do fungo em frutos maduros e semente. A partir dessas observações, estes órgãos são importantes veículos de disseminação, sobrevivência e transmissão de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro. O fungo é encontrado no endocarpo e na semente em porcentagens variáveis de acordo com a resistência da cultivar. Pode ser transmitido pela semente de café, tal como relatado por Orozco et al. (2002a, b) e como acontece em outras espécies botânicas, com outras espécies deste fungo. Este fato chama a atenção para aqueles isolados que são patogênicos; por ser o inóculo primário, há colonização do fitopatógeno na planta e trata-se de um fungo policíclico. Testes de sanidade, níveis de tolerância e qualidade na produção de mudas são necessários, visando qualidade das mudas para os agricultores.

Como os isolados de *C. kahawae* não têm capacidade de utilizar ácido cítrico e tartarato de amônio como fontes de carbono (Waller et al., 1993), o uso desta técnica torna-se efetiva porque permite diferenciar isolados de *C. kahawae* de outras espécies. Porém, tem a desvantagem de não permitir diferenciar espécies como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Neste sentido, os critérios de morfologia podem solucionar esta limitante. O estudo de pH também pode ser mais explorado.

Na parte molecular, as técnicas RAPD e SSR mostraram-se apropriadas para tipificar os isolados de *Colletotrichum* spp., concluindo-se que os isolados aqui estudados e associados às lavouras de cafeeiro no Brasil não pertencem à espécie *C. kahawae*. Portanto, estas técnicas podem ser utilizadas com sucesso na caracterização de isolados em pesquisas futuras. O isolado chinês pertencente a *C. gloeosporioides*, que foi incluído no estudo, apresentou maior semelhança genética com o grupo de isolados do Brasil, confirmando, dessa forma, a relação

dos isolados do Brasil dentro das espécies consideradas. Ainda, os “fingerprints” típicos observados para *C. kahawae* facilitarão a detecção rápida desta espécie em estudos futuros, caso a doença apareça no Brasil. Também, a caracterização molecular de isolados associados ao cafeeiro por meio destas técnicas é um critério importante para tipificar espécies deste fungo. Constataram-se semelhanças com trabalhos efetuados anteriormente em caracterizações de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro (Sreenivasaprasad et al., 1993; Rocheta et al., 1999; Silva et al., 1998). A conclusão de que a espécie *C. kahawae* que ocasiona a CBD não existe em MG e a determinação das espécies existentes no patossistema *Colletotrichum* x café nessa região, econômica e politicamente, é importante para a cafeicultura nacional, dado que o Brasil é o maior produtor mundial de café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOAK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, ago. 1993. Resumos. Suplemento.
- OROZCO MIRANDA, E.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas- MG. **Anais... Sete Lagoas**, 2002a. p. 59.
- OROZCO MIRANDA, E.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M. S. Transmissão de *Colletotrichum* spp. por sementes de café arábica (*Coffea arabica*) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas- MG. **Anais... Sete Lagoas**, 2002b. p. 93.
- OROZCO MIRANDA, E. F.; PIGOZZO, P.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. de. Estudo das relações compatíveis e incompatíveis de *Colletotrichum* spp. x cafeeiro. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras, **Anais... Lavras**, MG: UFLA/APG, 2002c.
- ROCHETA, M.; COELHO, T.; BESSA, A.; DIAS, A.; VÁRZEA, V.; RODRIGUES JR., C.; TENREIRO, R. Obtenção de marcadores moleculares em *Colletotrichum* spp. isolados de cafeeiro (*Coffea arabica*). SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais... Londrina**, Brasil: Instituto Agronômico de Paraná. p. 129-132.
- SILVA, C. C. N.; JULIATTI, F.; POSSA, E.; GIOVANINI, M.; SILVA, S. Características fisiológicas e genéticas de isolados de *Colletotrichum* sp. coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica*) de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CAFEICULTURA IRRIGADA, 1., 1998, Araguari - MG, 1998. p. 97-100.
- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, New York, v. 97, n. 8, p. 995-1000, Aug. 1993.

SUTTON, B. C. *Coelomycetes*. Kew, Surrey: CMI, 1980. 696 p.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES, C. J. Jr.; LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology*, Oxford, v. 51, n. 2, p. 202-207, Apr. 2002.

VÁRZEA, 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, Portugal.

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

