

**COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E
SEXUAL DO COMPLEXO *Glomerella-
Colletotrichum* ASSOCIADO AO CAFEIEIRO E
ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS**

IGOR SOUZA PEREIRA

2005



59108

050411

IGOR SOUZA PEREIRA

**COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E SEXUAL DO COMPLEXO
Glomerella-Colletotrichum ASSOCIADO AO CAFEIEIRO E ESTUDOS
HISTOPATOLÓGICOS**

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

Orientador

Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004



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

Pereira, Igor Souza

Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos / Igor Souza Pereira. —Lavras : UFLA, 2005.

92 p. : il.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Café. 2. Mancha manteigosa. 3. *Coffea arabica*. 4. VCG. 5. Antracnose I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

IGOR SOUZA PEREIRA

**COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E SEXUAL DO
COMPLEXO *Glomerella-Colletotrichum* ASSOCIADO AO CAFEIEIRO
E ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS**

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

APROVADA em 28 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende DFP-UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves DFP-UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG-CTSM


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

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Mario Sobral de Abreu, faço um agradecimento especial pelo incentivo ao meu ingresso na Fitopatologia, ensinamentos transmitidos, pela valiosa orientação e apoio na realização deste e de outros trabalhos.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de graduação em Agronomia e de mestrado em Fitopatologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida e ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento – Café, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Mário Lúcio Vilela de Rezende, pela ajuda e pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Eduardo Alves, pela orientação nos trabalhos envolvendo a microscopia e ensinamentos transmitidos durante o curso.

À Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza, pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Vicente, Prof. Machado, Prof. Ricardo, Prof. Ludwig e Prof. Edson, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao Prof. Edin F. Orozco Miranda, Profa. Líliliana A. P. Pasin e Profa. Moab D. Dias, pelos ensinamentos transmitidos durante a iniciação científica

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial à Eloísa, Ana, Maria de Lourdes, Ruth, Renata, Ângela, Edinho e Tarley.

Aos amigos de turma, Elisandra B. Zambenedetti, Daniel R. Amaral, Pedro M. Ribeiro Júnior e Sylvia R. G. Moraes, pelo companheirismo e ajuda durante a realização deste trabalho, em especial ao grande colaborador Josimar B. Ferreira, pela ajuda incondicional, incentivo e ânimo com nossos estudos.

Ao colega Cristiano S. Lima, pelo incentivo e ajuda na elaboração dos experimentos.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia, Dejânia, Patrícia, Fred, Anderson, Ricardo, Fernando, Juliana, Juliana Campos, João, Carol, Deila, Jadir, Val, Ênia, Ellen, Júlio, Robertinho e Alessandra, pela agradável convivência.

Aos bolsistas e estagiários que ajudaram na condução dos experimentos.

Aos amigos de república e do curso de agronomia, pela convivência e companheirismo.

Aos meus tios, primos e amigos da Fazenda Aqueça Sol, pelo incentivo, dúvidas e ensinamentos práticos em agricultura.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução geral.....	02
2 Referencial teórico.....	05
2.1 <i>Colletotrichum</i> spp. em café.....	05
2.2 Taxonomia de <i>Colletotrichum</i> spp associados ao cafeeiro.....	07
2.3 Compatibilidade vegetativa aplicada ao estudo da variabilidade de <i>Colletotrichum</i> spp.	09
2.4 Microscopia eletrônica aplicada ao estudo de <i>Colletotrichum</i>	14
2.5 Estudos histopatológicos de <i>Colletotrichum</i> spp.: eventos de pré-penetração e penetração.....	15
2.6 Estudos histopatológicos de <i>Colletotrichum</i> spp.: infecção e colonização dos tecidos.....	17
3 Referências bibliográficas	19
CAPÍTULO 2 Caracterização de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i> provenientes do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.) com base na compatibilidade vegetativa e sexual.....	28
1 Resumo.....	29
2 Abstract.....	30
3 Introdução.....	31
4 Material e métodos.....	34
4.1 Instalação dos experimentos.....	34
4.2 Caracterização de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. quanto à compatibilidade vegetativa	34

4.2.1 Origem dos isolados.....	34
4.2.2 Meios de cultura	36
4.2.3 Geração de mutantes <i>nit</i>	37
4.2.4 Caracterização fenotípica dos mutantes <i>nit</i>	38
4.2.5 Análise de autocompatibilidade vegetativa	39
4.2.6 Testes de complementação para formação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG).....	40
4.3 Avaliação da compatibilidade sexual de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de cafeeiros.....	41
4.3.1 Origem dos isolados.....	41
4.3.2 Obtenção da fase sexuada.....	42
5 Resultados e discussão.....	44
5.1 Eficiência na recuperação de mutantes <i>nit</i>	44
5.2 Identificação dos fenótipos dos mutantes <i>nit</i>	47
5.3 Análise da auto-compatibilidade	51
5.4 Testes de complementação	53
5.5 Avaliação da formação de <i>Glomerella</i>	57
6 Conclusões.....	59
7 Referências bibliográficas.....	60
CAPÍTULO 3 Estudos histopatológicos da interação <i>Colletotrichum</i>-cafeeiro.....	64
1 Resumo.....	65
2 Abstract.....	66
3 Introdução.....	67
4 Material e métodos.....	69
4.1 Instalação dos experimentos.....	69
4.2 Experimento I: Observação dos eventos de pré-infecção de <i>Colletotrichum</i> spp. sobre hipocótilos de cafeeiro inoculados.....	69

4.2.1 Obtenção de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> de café	69
4.2.2 Produção de hipocótilos	70
4.2.3 Preparo e inoculação de hipocótilos	70
4.2.4 Coleta das amostras para microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	71
4.2.5 Preparo das amostras para MEV.....	71
4.3 Experimento II: Observações da infecção de ramos do cafeeiro por <i>Colletotrichum</i> spp. em MEV.....	72
4.3.1 Coleta e seleção do material.....	72
4.3.2 Preparo das amostras para MEV	72
4.4 Experimento III: Observações da infecção de frutos do cafeeiro por <i>Colletotrichum</i> spp. em MEV.....	73
4.4.1 Coleta e seleção do material	73
4.4.2 Preparo dos frutos para observação superficial.....	73
4.4.3 Preparo dos frutos para observação interna	73
4.4.4- Preparo das amostras para MEV.....	74
5 Resultados e discussão	75
5.1 Experimento I: Observação dos eventos de pré-infecção de <i>Colletotrichum</i> spp. sobre hipocótilos de cafeeiro inoculados	75
5.2 Experimento II: Observações da infecção de ramos do cafeeiro por <i>Colletotrichum</i> spp. em MEV.....	79
5.3 Experimento III: Observações da infecção de frutos do cafeeiro por <i>Colletotrichum</i> spp. em MEV	83
6 Conclusões	87
7 Referências bibliográficas.....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91

RESUMO

PEREIRA, Igor Souza. **Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos.** Lavras: UFLA, 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).*

Existem ainda muitas lacunas para o melhor entendimento do complexo *Colletotrichum*-cafeeiro. Destacam-se, entre elas, a origem da variabilidade encontrada entre os isolados de *C. gloeosporioides* e o seu modo de colonização. Em se tratando de variabilidade, a técnica que utiliza mutantes *nit* para estudos de grupos de compatibilidade vegetativa, adaptada para estudos com o gênero *Colletotrichum*, tem demonstrado resultados satisfatórios. Quanto aos estudos histopatológicos, a microscopia eletrônica é uma importante ferramenta na compreensão dos processos de pré e pós-infecção, entretanto, pouco usada no referido complexo. Objetivou-se, neste trabalho, examinar a variabilidade da população de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por meio da compatibilidade vegetativa e sexual e realizar estudos histopatológicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os experimentos foram realizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG) no período de janeiro a dezembro de 2004. Pode-se comprovar a alta variabilidade genética de *C. gloeosporioides*, representada por 16 grupos de compatibilidade vegetativa. Observou-se a formação da fase ascogênica em alguns isolados de *C. gloeosporioides* do cafeeiro, demonstrando ser esta uma espécie tanto homotática quanto heterotática. Comprovou-se, dessa forma, a origem da alta variabilidade, dado o elevado número de VCGs e a constatação da fase ascógena. Utilizando-se a MEV, pode-se observar a colonização por *Colletotrichum* em frutos de café, no tecido próximo à epiderme, em diferentes estádios de maturação. Os ramos murchos apresentaram colonização, tanto nos vasos do xilema quanto floema. Quando se inoculou *C. gloeosporioides* sobre hipocótilos, pôde-se observar germinação nos hipocótilos feridos 6 horas após a inoculação. Os conídios ficaram aderidos preferencialmente nas regiões depressivas dos hipocótilos e evidenciavam um ou dois tubos germinativos terminais. Apressórios globosos a subglobosos e de contorno regular surgiram 12 horas após a inoculação. Até 72 horas, não se observou a formação de acérvulos.

¹Comitê de Orientação: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

PEREIRA, Igor Souza. **Vegetative and Sexual compatibility of complex *Glomerella-Colletotrichum* associated to coffee trees and histopathological studies.** Lavras: UFLA, 2005. 96p. Dissertation (Masters Degree in Phytopathology).*

A lot of gaps still exist for the best understanding of the complex *Colletotrichum*-coffee trees. They stand out among them the origin of the variability found between the isolated of *C. gloeosporioides* and your colonization way. For the study of variability, the technique of *nit* mutants for evaluation of vegetative compatibility groups (VCGs), has demonstrated satisfactory results, when adapted for studies with the genus *Colletotrichum*. Regarding histopathological studies, the electron microscopy is an important tool for understanding pre and post infectional processes, however it is poorly used in the referred disease-complex. The objectives of this work ware to examine the variability of the population of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, through the vegetative and sexual compatibilities and to accomplish histopathologic studies through scanning electron microscopy (SEM). The experiments were carried out at Plant Pathology Department of the Federal University of Lavras (Lavras - MG state) in the period from January to December of 2004. It was possible to observe the great genetic variability of *C. gloeosporioides* represented by 16 groups of vegetative compatibility. The formation of the ascogenic phase was observed in some isolates of *C. gloeosporioides* of the coffee tree, demonstrating that a species can be either homotalic or heterotalic. Can be proven this way the origin of the great variability, given the high number of VCGs and verification of the ascogenic phase. By SEM, *Colletotrichum* colonization could be observed in fruits of coffee, in tissues near to the fruit epidermis, and in different maturation stages. Branches with wilted leaves presented colonization both in the xilem and floem. When *C. gloeosporioides* was inoculated on hypocotyls, the germination could be observed in wounded hypocotyls 6 hours after inoculation. Better adhesion of conidia was evident at surface depressions of the hypocotyls and germination started by emission of one or two terminal tubes germ. Round or sub-round shaped apressoria appeared 12 hours after the inoculation. Up to 72 hours, the acervulus formation was not observed.

*Adviser Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Advisor); Eduardo Alves – UFLA (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é uma das importantes fontes de divisas para o nosso país, que se destaca como o principal produtor e exportador mundial com uma produção estimada em 38.667 mil sacas (60 kg) na safra de 2004/2005. O estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, com 18.777 mil sacas (60 kg); com 10.046 mil sacas numa área estimada em 507.597 ha, as regiões Sul e Oeste Mineiro contribuem com mais da metade desta produção (Conab, 2004).

Entretanto, uma série de doenças pode levar à diminuição desta produção (Matiello & Almeida, 1997), como a ferrugem (*Hemilea vastatrix* Berk & Br.), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke) e a mancha de phoma (*Phoma* spp.), entre outras.

Nos últimos anos, tem-se destacado a preocupação com aquelas doenças causadas por *Colletotrichum* spp. no cafeeiro (Dorizzotto, 1993; Chen 2002; Nechet & Abreu, 2002; Orozco *et al.*, 2002a, b; Orozco, 2003). As principais doenças ocasionadas por esse fungo em cafeeiro citadas mundialmente são: antracnose em frutos, folhas e ramos, mancha manteigosa e a CBD (Noack, 1902; Mc Donald, 1926; Nutman & Roberts, 1969 a, b; Vargas & Gonzalez, 1972; Rodrigues *et al.*, 1991; Waller *et al.*, 1993; Orozco *et al.*, 2002 b; Orozco *et al.*, 2003a).

A *coffee berry disease* (CBD), doença mais importante do cafeeiro no continente africano (Varzea *et al.*, 2002a), cujo agente etiológico é o *C. kahawae* não foi correlacionado a nenhuma daquelas doenças que ocorrem no Brasil (Orozco, 2003; Orozco *et al.*, 2003 a, c). *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foram as duas espécies associadas ao cafeeiro, encontrando-se populações patogênicas, além da evidência da presença de raças deste patógeno (Orozco *et al.*, 2002 b; Orozco, 2003; Orozco *et al.*, 2003 b). Isto se contrapõe àquelas

afirmações segundo as quais os isolados deste fungo associado ao cafeeiro no Brasil seriam “não patogênicos, secundários, saprófitas ou oportunistas”.

O patógeno *C. gloeosporioides* possui elevada variabilidade genética, constituindo um complexo composto por vários patossistemas. Esta variabilidade é observada nos isolados associados a sintomas de mancha manteigosa, seca de ponteiros e necrose de frutos, por meio de caracterização morfológica e molecular utilizando-se os marcadores RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e SSR (*simple sequence repeats*) (Orozco, 2003; Orozco *et al.*, 2003c).

A fim de que sejam aprofundados estudos sobre a diversidade genética e a estrutura das populações naturais dos isolados existentes no Brasil, a análise dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) é uma boa ferramenta.

Esses estudos são particularmente interessantes em anamorfos de ascomicetos, como *Colletotrichum* spp., em virtude dos grupos de compatibilidade subdividirem a população em grupos que podem trocar informações genéticas via heterocariose e ciclo parassexual (Brooker *et al.*, 1991). Há, ainda, a possibilidade da separação de raças ou grupos patogênicos por meio dos grupos de compatibilidade vegetativa (Leslie, 1993), baseando-se na hipótese de que isolados num mesmo grupo patogênico, por exemplo, *formae specialis*, raça, etc., estão em um ou poucos VCGs (Puhalla, 1985).

Até o presente, este tipo de estudo para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de cafeeiros no Brasil eram inexistentes. Tal fato torna-se mais interessante ao constatar-se que Orozco *et al.* (2003b) afirmam a existência de uma raça fisiológica para *C. gloeosporioides* proveniente de plantas com mancha manteigosa.

Outro modo de compreender esse complexo é por meio dos estudos histopatológicos, permitindo elucidar o processo de infecção, assim como os fatores que o influenciam: adesão de conídios, relação com a topografia do

hospedeiro, tipo de penetração, formação de apressório e modo de colonização. Além disso, os estudos histopatológicos são considerados um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias de controle.

Este trabalho teve como objetivos examinar a variabilidade da população de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de cafeeiros, por meio da compatibilidade vegetativa e sexual e realizar estudos histopatológicos em hipocótilos, ramos e frutos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Colletotrichum* spp. em café

As doenças relacionadas ao complexo *Colletotrichum* x cafeeiro têm recebido vários nomes: antracnose do cafeeiro, queima castanha (*brown blight*), mancha manteigosa, *die-back*, *elon die-back* e CBD.

No continente africano, onde, no complexo *Colletotrichum* x cafeeiro, predomina o agente etiológico *C. kahawae*, a doença mais séria é a CBD, cujas perdas sobre a produtividade são da ordem de 50% a 80% (Griffiths *et al.*, 1971; Varzea *et al.*, 2002b; Chen, 2002). O fungo infecta frutos verdes em todos os estádios de desenvolvimento, as flores e, ocasionalmente, inflorescências não abertas e folhas (Firman & Waller, 1977). Os frutos podem cair prematuramente ou permanecer mumificados na planta (Chen, 2002).

No continente americano, não se conhece nenhum relato confirmado da ocorrência da CBD (Chalfoun, 1997; Varzea *et al.*, 2002a e Orozco, 2003). No Brasil, *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro provoca a antracnose em folhas, frutos, mancha manteigosa e seca de ponteiros, entre outros (Almeida *et al.*, 1979; Dorizzotto e Abreu, 1993a; Nechet, 1999; Paradela Filho *et al.*, 2001; Orozco, 2003). A antracnose nas folhas do cafeeiro apresenta-se como manchas irregulares, grandes, de coloração castanha a castanho-acinzentada, ocorrendo comumente nas margens das folhas (Paradela Filho *et al.*, 2001; Orozco, 2003). Segundo Paradela Filho *et al.* (2001), as lesões mais críticas e prejudiciais para o cafeeiro são aquelas em que o fungo incide sobre gemas, flores e chumbinho, provocando sua morte e queda, e enegrecimento e morte de ramos. Esses autores relatam, ainda, que os sintomas não estão relacionados com plantas injuriadas ou

culturas mal manejadas; pelo contrário, eles são mais intensos e evidentes em culturas novas e muito bem desenvolvidas.

A mancha manteigosa é outra doença causada por *Colletotrichum* spp. cujos sintomas são manchas de coloração verde-claro em folhas novas, 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. Num estágio final, as manchas apresentam o centro necrótico e coalescem, causando a queda prematura das folhas. As brotações novas que surgem são novamente atacadas, ocorrendo a morte prematura das plantas. Os ataques mais intensos ocorrem nas folhas e ramos novos em plantas adultas, durante a fase de maior vegetação (Bitancourt, 1958; Mansk & Matiello, 1977). Em cafeeiros com mancha manteigosa, a produção pode ser grandemente afetada (Costa *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004).

Segundo Orozco (2003), o patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro no Brasil é composto por populações de espécies de *Colletotrichum* associadas ao café, ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma invasiva sem manifestação de sintomas. Orozco *et al.* (2002b; 2003b) afirmam ainda a existência de raças patogênicas para os isolados da espécie *C. gloeosporioides* que ocasionam os sintomas de mancha manteigosa, seca de ponteiros e necrose em frutos. Esses resultados foram encontrados após teste de patogenicidade realizados no Brasil na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e em Portugal, no Centro de Investigações sobre a Ferrugem do Cafeeiro (CIFC) e em estudos histopatológicos realizados no CIFC.

Enfim, são três as espécies isoladas de frutos, folhas e ramos de cafeeiro: *C. kahawae* Waller & Bridge, *C. gloeosporioides* Penz e *C. acutatum* Simmonds (Waller *et al.*, 1993; Varzea *et al.*, 2002a; Chen 2002; Orozco 2003).

2.2 Taxonomia de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro

O primeiro relato de *Colletotrichum* em cafeeiro foi feito por Noack, em 1901, aqui no Brasil. Inicialmente, foi classificado como *C. coffeanum* e, por mais de 70 anos, todos os isolados de cafeeiro foram assim designados. Mas, como há diferenças discrepantes entre aqueles isolados causadores de CBD e os outros isolados do cafeeiro, como características morfológicas, metabolismo do carbono, patogenicidade (Waller *et al.*, 1993) e, mais recentemente, pôde-se observar diferenças por meio de técnicas moleculares (Sreenivasaprasad *et al.*, 1993; Beynon *et al.* 1995; Orozco *et al.*, 2003c) e de estudos de compatibilidade vegetativa (Beynon *et al.*, 1995; Varzea *et al.*, 2002b), várias propostas de classificação para os isolados de *Colletotrichum* spp. foram apresentadas ao longo dos anos.

Rayner (1948, 1952) classificou os isolados que ocasionam CBD no Quênia como *C. coffeanum* var. *virulans*. Em 1969, Gibbs (1969) diferenciou em meio malte-ágar (MEA): C.B.D. (= *C. coffeanum* var. *virulans*, Rayner, 1948), ccp (= *C. coffeanum*, *pink*), ccm (= *C. coffeanum*, *mycelial form*) e cca (= *C. coffeanum*, *acervuli form*). Hindorf (1970) conduziu estudos morfológicos detalhados com isolados do Quênia e os classificou como *C. coffeanum* Noack (*sensu strictu*), sendo este equivalente ao CBD var. *virulans* de Rayner e CBD de Gibbs; *C. acutatum* Simmonds, equivalente ao ccp de Gibbs; *C. gloeosporioides* Penz. *white mycelium form* que equivale ao cca de Gibbs, produzindo o seu teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schronk e *C. gloeosporioides* Penz. *greenish mycelium form* e *Glomerella cingulata*. Neste trabalho, Hindorf descreveu *C. coffeanum* (*sensu strictu*) em MEA e mencionou que a forma teleomórfica nesta espécie não foi observada. Posteriormente, *C. coffeanum* Noack (*sensu strictu*) passou a ser designado por todos os autores como *C. coffeanum sensu* Hindorf.

Os isolados de CBD variam grandemente quando mantidos em cultura, alterando sua cor e formação de acérvulo, entre outras características, levando à confusão para distingui-los de *C. gloeosporioides* (Rodrigues Jr. *et al.*, 1991; Varzea, 1995). Em 1991, Rodrigues Jr. *et al.* (1991) observaram que isolados de frutos coletados em Angola e Malawi, apresentavam acérvulos e setas em MEA, opondo-se às descrições feitas por Hindorf (1970) para isolados do Quênia. Waller *et al.* (1993) propuseram, então, uma série de características (Tabela 1) para separar estas duas espécies, além da mudança do nome de *C. coffeanum sensu* Hindorf para *C. kahawae* J.M. Waller & P.D. Bridge.

TABELA 1. Características que permitem distinguir isolados de *C. kahawae* de isolados de *C. gloeosporioides*.

<i>C. kahawae</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
1) Características da colônia (culturas frescas de isolados monoconidiais em MEA)	
Crescimento lento (2-4 mm.d ⁻¹ a 25 °C); abundante micélio cinzento esverdeado azeitona a esverdeado escuro sem acérvulos e esporulação em hifas simples.	Crescimento rápido (3-6 mm.d ⁻¹ a 25 °C), micélio branco a cinzento claro e esporulação em acérvulos ou hifas simples.
2) Metabolismo	
Não pode utilizar citrato ou tartarato como únicas fontes de carbono.	Pode utilizar tartarato, citrato ou ambos como únicas fontes de carbono.
3) Patogenicidade	
Patogênico a frutos verdes no estado de expansão e hipocótilos de <i>C. arabica</i> .	Não patogênico a frutos verdes em expansão ou hipocótilos.

Fonte: Waller *et al.* (1993)

Entretanto, as características apresentadas por Waller *et al.* (1993) apresentam, ainda, algumas limitações (Varzea, 1995; Varzea, 2002a; Orozco *et al.*, 2003a). Alguns pesquisadores sugerem o uso da temperatura de 30°C para melhor distinção entre as duas espécies (Varzea, 1995; Varzea *et al.*, 2002a), enquanto outros sugerem que o agente etiológico da CBD passe a ser considerado, num nível subespecífico, como *C. gloeosporioides* f.sp. *kahawae*, baseados em estudos utilizando técnicas moleculares (Sreenivasaprasad *et al.*, 1993). Entretanto, em estudos posteriores foi possível separar *C. kahawae* de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por técnicas de RFLP, mas não conseguiram definir subgrupos para *C. kahawae* (Beynon *et al.*, 1995).

Orozco *et al.* (2003b) sugerem a existência de raças fisiológicas de *C. gloeosporioides*, uma vez que observaram ocorrência de interação diferencial entre os genótipos de cafeeiro e *C. gloeosporioides*. Em testes de patogenicidade utilizando-se plântulas, as cultivares Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo, provenientes de plantas com mancha manteigosa, foram susceptíveis a *C. gloeosporioides*. Orozco (2003) sugere, ainda, que a denominação *C. gloeosporioides* patótipo mancha manteigosa seja utilizada para todos os isolados do fungo que ocasionam aquele sintoma.

2.3 Compatibilidade vegetativa aplicada ao estudo da variabilidade de *Colletotrichum* spp.

Compatibilidade vegetativa refere-se à capacidade de uma hifa vegetativa em formar anastomose e heterocário estável. Em espécies com a fase anamórfica prevaiente ou única, a formação de heterocários entre diferentes indivíduos é um importante componente no seu ciclo de vida, podendo servir como primeiro passo no ciclo parassexual. A heterocariose é um meio pelo qual fungos haplóides podem desfrutar dos benefícios do diplóide, como em

complementação ou heterose (Leslie, 1993). Isolados que são compatíveis vegetativamente uns com os outros são descritos como membros de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) podendo, portanto, trocar informações genéticas via processo parassexual (Glass & Kuldau, 1992; Leslie, 1993).

Em 1991, Brooker *et al.* (1991) adaptaram a técnica utilizada para produção de mutantes *nit* na identificação de VCGs em outros fungos filamentosos para estudos com *Colletotrichum*, uma vez que a maior dificuldade na sua identificação é determinar quais isolados são compatíveis com os outros e os que não o são (Dias, 2000). A melhor evidência da compatibilidade é geralmente obtida por forçar um heterocário prototrófico (com crescimento tipo selvagem) resultante da anastomose de hifas entre dois mutantes auxotróficos (com crescimento mínimo) complementares (Leslie, 1993), permitindo observações macroscópicas deste heterocário.

Esta técnica consiste na utilização de mutantes produzidos em meio de cultura contendo clorato de potássio ($KClO_3$) (análogo do nitrato), que são incapazes de utilizar o nitrato como única fonte de nitrogênio (mutantes *nit*) (Correl *et al.*, 1987; Brooker *et al.*, 1991). Setores com crescimento rápido, resistentes ao clorato de potássio ($KClO_3$), são então selecionados. O modo de ação do clorato não é ainda perfeitamente conhecido, mas todos os mutantes resistentes ao clorato podem apresentar deficiência em qualquer dos genes que regulam a assimilação do nitrato (Varzea *et al.*, 2002a).

Os mutantes *nit* apresentam, assim, crescimento ralo, com pouco ou nenhum micélio aéreo, em meios contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Estes mutantes podem conter lesões genéticas estruturais ou regulatórias no locus do catabolismo do nitrato ou em rotas co-relatas (Marzluf, 1981; Klittich & Leslie, 1988 e Klittich & Leslie, 1989). Pelo crescimento em meio seletivo, mutantes *nit* são então classificados em quatro classes fenotípicas.

Dois desses fenótipos são designados segundo mutações em um único locus, como: *nit 1* - locus estrutural da nitrato redutase e *nit 2* - locus regulador do metabolismo do nitrogênio. As outras duas classes fenotípicas podem ocorrer em mais de um locus, como: classe *nit M* - resultante da mutação dos vários *loci* responsáveis pela reunião do cofator molibdênio requerido durante a atividade da nitrato redutase e purina desidrogenase e classe *nit 3* - locus regulador específico do metabolismo da nitrito redutase (Correl, 1987; Brooker *et al.*, 1991).

Quando as colônias de dois mutantes *nit* de diferentes classes fenotípicas, crescendo em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, têm a capacidade de formar um heterocarionte (micélio normal na zona de contato entre as duas colônias), diz-se que os isolados correspondentes àqueles mutantes *nit* pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (Leslie, 1993).

Utilizando-se esta técnica, mutantes *nit*, resistentes ao clorato de potássio, foram recuperados de *C. gloeosporioides* (Brooker *et al.*, 1991; Varzea, 2002b), *C. gloeosporioides* f.sp. *jussiaea*, *C. fragariae*, *C. malvarum*, *C. destructivum*, *C. trifolii* (Brooker *et al.*, 1991), *C. acutatum*, *C. kahawae* (Beynon *et al.*, 1995; Varzea *et al.*, 2002b), *C. orbiculare* (Wasilwa *et al.*, 1993), *C. dematium* (Correl *et al.*, 1993) e *C. coccodes* (Nitzan *et al.*, 2002). Estes mutantes recuperados foram classificados dentro de uma das quatro classes fenotípicas (*nit 1*, *nit 2*, *nit 3* e *nit M*) (Correl *et al.*, 1993). A frequência dos fenótipos recuperados foi variável dentro das diferentes espécies de *Colletotrichum* estudadas (Correl *et al.*, 1993). Varzea *et al.* (2002b) não conseguiram recuperar *nit 2* em vários dos seus isolados de *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* e Correl *et al.* (1993) relatam, ainda, que não conseguiram recuperar mutantes de dois isolados de *C. dematium* provenientes de cebola. Assim, pode-se concluir que esta técnica é viável para o estudo da

compatibilidade vegetativa das diferentes espécies desse patógeno, podendo, entretanto, ocorrer algumas restrições em casos específicos.

A compatibilidade vegetativa provou ser um instrumento muito útil para examinar a diversidade genética e a estrutura de populações naturais (Varzea, 2002a; Leslie, 1993). Isolados dentro de um mesmo VCG são mais similares em relação àqueles pertencentes a outros VCGs, sendo comprovado por estudos biométricos (Butcher, 1968; Butcher, 1969; Butcher *et al.* 1972) e por marcadores moleculares (Bosland & Williams, 1987; Gordon & Okamoto, 1992; Jacobson & Gordon, 1991; citados por Leslie, 1993).

Nitzan *et al.* (2002), estudando a variabilidade genética e patogênica de 110 isolados de *C. coccodes* provenientes de países diferentes (Holanda, Israel e França), separaram-no em 4 VCG distintos e 27% dos isolados não puderam ser enquadrados em nenhum destes quatro grandes grupos, perfazendo, assim, outros 30 VCGs. Esses quatro grandes grupos foram encontrados nos diferentes países amostrados, com exceção de dois que são ausentes na França, provavelmente devido à menor adaptação daqueles VCGs não encontrados ou, ainda, por erro nas amostragens. Já a presença desses grandes grupos tanto na Europa quanto Israel, pode ser explicada pelo alto intercâmbio de batata semente entre essas localidades. Esses grupos puderam ainda ser separados quanto a patogenicidade de seus isolados.

Em estudo semelhante com 215 isolados de *C. dematium* patogênicos a espinafre, causando dois tipos de lesões, 3 provenientes de cebola e 2 de tomate, Correl *et al.* (1993) puderam separá-los em quatro VCGs, sendo aqueles patogênicos a espinafre agrupados em dois grandes VCGs (VCG1 e VCG2) e o restante em dois outros grupos separados entre si (VCG3 – tomate e VCG4 – cebola). Somente VCG1 e VCG2 (de ambos tipos de lesão) foram patogênicos ao espinafre, fato este que suporta a designação de *formae specialis* para esta espécie usada por von Arx (*C. dematium* f.sp. *spinaciae*). Além de refutar a

hipótese de que existam duas espécies distintas de *Colletotrichum* que causem a antracnose em espinafre na América do Norte, em função dos tipos de sintomas encontrados.

Portanto, a correlação entre VCG e patogenicidade a hospedeiros específicos, bem como a determinação de patótipos, é uma aplicação útil da compatibilidade vegetativa. Isto pôde ser comprovado para algumas *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*, como *F. oxysporum* f.sp. *apii*, *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans*, *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (Leslie, 1993) e *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Dias, 2002). Entretanto, há casos em que a correlação entre grupos patogênicos e VCG não são bem relacionados, tais como *F. oxysporum* f.sp. *asparagi* (Elmer & Stephens, 1989) e *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Elias & Schneider, 1991).

Desse modo, a compatibilidade vegetativa mostra-se como um instrumento útil para o estudo da diversidade genética ou, ainda, para distinguir isolados patogênicos de não patogênicos (Varzea, 2002a) no gênero *Colletotrichum*.

Com base em testes de patogenicidade, características morfológicas e bioquímicas, Varzea *et al.* (2002b) classificaram os isolados provenientes de café em *C. kahawae*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Em seguida, agruparam os isolados de cada espécie num VCG distinto. *C. kahawae*, representado por 18 isolados, foi agrupado em somente um VCG, indicando a baixa variabilidade genética dentro desta espécie, possivelmente pela ausência de ciclo sexual em condições naturais. Os isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes países africanos e da China foram agrupados em três VCGs, indicando a sua elevada diversidade genética.

A distinção entre diferentes isolados de *Colletotrichum* em diferentes VCGs pode responder a uma série de questões quanto à sua variabilidade, além

da possibilidade do seu agrupamento em nível subespecífico, fato importante no manejo das doenças ocasionadas pelo patógeno.

2.4 Microscopia eletrônica aplicada ao estudo de *Colletotrichum*

A microscopia eletrônica tornou-se uma útil ferramenta para a compreensão dos eventos de pré-penetração e penetração de patógenos de plantas. Há dois tipos de microscopia eletrônica: a microscopia eletrônica de varredura (MEV) que se destina basicamente ao exame de superfície das amostras e a microscopia eletrônica de transmissão (MET), a qual destina-se à observação de estruturas e fenômenos que ocorrem no interior das células, tecidos e órgãos das plantas (Alves, 2004).

A grande vantagem da microscopia eletrônica está no seu poder de resolução. Em MEV, o poder de resolução é da ordem de 10 Å (1 nm) e do MET, ao redor de 1-2 Å (0,1-0,2 nm), enquanto a de um microscópio de luz é de aproximadamente 200 nm (Alves, 2004).

Dentro do gênero *Colletotrichum*, a microscopia eletrônica já foi utilizada para o estudo histopatológico de diversos patossistemas, tais como *C. acutatum* f.sp. *pineae*, em *Pinus radiata* (Nair & Corbin, 1981); *C. fragariae*, em morango (Milholland, 1982), *C. gloeosporioides*, em mamão (Chau & Alvarez, 1983) e *C. trifolii*, em alfafa (Porto *et al.* 1988), entre outros. Entretanto, trabalhos com o complexo *Colletotrichum* x cafeeiro são escassos, gerando uma lacuna para o entendimento destes patossistemas em nosso país.

2.5 Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp.: eventos de pré-penetração e penetração

O conhecimento do processo de infecção das espécies de *Colletotrichum* em seus hospedeiros, assim como os fatores que influenciam tais processos, é um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle, fornecendo informações para a elaboração de modelos de previsão, auxiliando na seleção e aplicação de estratégias de controle (Bailey *et al.*, 1992).

Infecção típica de *Colletotrichum* envolve uma seqüência comum de eventos. Inicialmente tem-se a adesão dos conídios ou ascósporos dispersos sobre a planta, sendo este um processo passivo e inespecífico (Bailey *et al.*, 1992; Lopez, 2001). Posteriormente, conídios e ascósporos germinam como tubos germinativos indiferenciados ou passando por uma diferenciação complexa, a fim de se formar apressório (Parbery, 1981). Apressórios são considerados essenciais à infecção e morfologicamente característicos dentro do gênero, podendo ser globosos ou subglobosos e de contorno regular ou com variados graus e frequência de rugosidades (Lenné, 1978; Sutton, 1992). Materiais exógenos, tais como grãos de pólen, ácidos orgânicos e sideróforos, podem influenciar a germinação conidial e sua diferenciação em apressórios. Na presença de nutrientes, o índice de germinação de esporos é acentuado, porém, baixas concentrações frequentemente inibem a formação de apressórios (Mercer *et al.*, 1971, Bailey *et al.*, 1992; Skipp *et al.*, 1995).

No gênero *Colletotrichum*, a germinação é altamente influenciada por temperatura e umidade. Em *C. kahawae*, a germinação não ocorre na ausência de uma película de água, mesmo quando a umidade atmosférica está próxima de 100%. A temperatura ótima para a germinação desta espécie é de cerca de 22°C. Temperaturas inferiores a 10°C e superiores a 30°C inibem completamente a sua germinação (Varzea *et al.*, 2002a). Espécies de *Colletotrichum* em *Citrus* spp.,

que causam queda de frutos jovens, têm acentuada germinação de seus conídios sob condições de temperaturas acima de 25°C e umidade atmosférica em torno de 80%. Neste patossistema, há maior índice de doença quando ocorre elevada precipitação pluviométrica seguida por um prolongado período de umidade atmosférica alta (Denham & Waller, 1981).

A topografia da superfície do hospedeiro é relatada também afetando a formação de apressórios (Lapp & Skoropad, 1978). Em *C. orbiculare*, é necessário que o tubo germinativo alcance junções das células antes da formação de apressórios (Anderson & Walker, 1962). Segundo Lapp e Skoropad (1978), a formação de apressórios em *C. graminicola* é dependente da estrutura física da superfície foliar, havendo maior formação de apressórios nas suas depressões.

Quanto à penetração de *Colletotrichum*, vários modos são possíveis: por aberturas naturais, tais como estômatos, por ferimentos e diretamente pela cutícula. O modo mais comum de penetração é diretamente pela cutícula da planta, havendo, entretanto, casos em que ferimentos são essenciais, tais como podridão da coroa e do pedicelo em banana (*Musa* sp.), causados por *C. musae* (Krantz *et al.*, 1978) e podridão em mandioca, causada por *C. gloeosporioides* (Van der Bruggen & Maraite, 1987; Van der Bruggen *et al.*, 1990). Para a maioria das espécies de *Colletotrichum*, especialmente aquelas que atacam tecidos jovens, sua habilidade para penetrar a cutícula diretamente é de extrema importância. A força mecânica, degradação enzimática por cutinases ou a combinação de ambos processos são os mecanismos de penetração da cutina propostos (Mercer *et al.*, 1971).

Mercer *et al.* (1971) comprovaram que *C. lindemuthianum* exerce força suficiente para penetrar uma cutícula, fato evidenciado quando este patógeno foi capaz de romper membranas de Formvar®, insensíveis à hidrólise por enzimas fúngicas. Por outro lado, a penetração pode requerer enzimas que dissolvam ou enfraqueçam a cutícula do hospedeiro. Várias espécies de *Colletotrichum*

produzem esterases capazes de degradar cutina. Mutantes de *C. gloeosporioides* deficientes na produção de cutinase não foram patogênicos a frutos de mamão intactos, entretanto, quando feridos ou superficialmente tratados com cutinase, lesões normais foram produzidas (Dickman & Patil, 1986). Similarmente, lesões não foram produzidas quando inibidores químicos de cutinase foram misturados com conídios de *C. gloeosporioides* (Dickman *et al.*, 1983). Em outro caso, em que foram isolados dois tipos de cutinases de *C. lagenarium*, a inibição de cutinase não foi capaz de afetar a patogenicidade (Bonnen & Hammerschmidt, 1989 a, b), além de não haver diferença em virulência quando se inoculavam mutantes que produziavam menores quantidades desta enzima.

2.6 Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp.: infecção e colonização dos tecidos

Espécies de *Colletotrichum* utilizam duas estratégias de infecção: colonização intracelular ou colonização subcuticular intramural (Bailey *et al.*, 1992).

Após a penetração, patógenos que possuem colonização subcuticular intramural desenvolvem-se sob a cutícula, formando uma rede intramural de hifas, antes de se desenvolver rapidamente pelo tecido com hifas que crescem inter e intracelularmente, matando as células com o seu avanço. Neste tipo de infecção, o estágio biotrófico não é detectável (Bailey *et al.*, 1992; Perfect *et al.*, 1999).

A maioria das espécies de *Colletotrichum* exibe o segundo tipo de infecção, isto é, colonização intracelular, embora a extensão do estágio biotrófico seja variável ou ausente em muitas interações. Após a penetração, hifas crescem no lúmen da célula sem a penetração no protoplasto do hospedeiro, crescem portanto, entre a membrana plasmática e a parede celular da

planta, formando uma vesícula (O'Connell, 1987; Skipp *et al.* 1995). Estes fungos que se nutriam inicialmente de células vivas do hospedeiro, antes de trocar para necrotrofia são considerados hemibiotróficos ou biotróficos facultativos.

Após a colonização dos tecidos vegetais, o patógeno altera seu comportamento para necrotrofia, alimentando-se de nutrientes que exsudam da célula. Nesta fase, há danificação acentuada de células do hospedeiro, devido a uma série de fatores, tais como aumento do volume e decréscimo na densidade do citoplasma, aumento da fragilidade e permeabilidade da membrana plasmática, levando à sua ruptura e desorganização geral do citoplasma culminando com a morte celular (Bailey *et al.*, 1992; O'Connell, 1987; Skipp *et al.*, 1995).

Essa fase necrotrófica destrutiva é associada com abundante produção de enzimas capazes de degradar paredes, matando células e liberando nutrientes em tecidos para o avanço das hifas para outros tecidos (Bailey *et al.*, 1992; O'Connell, 1987; Skipp *et al.*, 1995). Eventualmente, conidióforos emergem através da cutícula do hospedeiro e formam acérvulos na superfície da planta (Bailey *et al.*, 1992).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43 p.

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.

ANDERSON, J. L.; WALKER, J. C. Histology of watermelon anthracnose. *Phytopathology*, St. Paul, v. 52, n. 7, p. 650-653, July 1962.

BAILEY, J. A.; O'CONNEL, R. J.; PRING, R. J.; NASCH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.) *Colletotrichum: biology, pathology and control.* Wallingford: CAB International, 1992. p. 88-120.

BEYNON, S. M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, B. G.; VARZEA, 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. 10, p. 191-201, out. 1958.

BONNEN, A. M.; HAMMERSCHMIDT, R. Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 35, n. 6, p. 463-474, Dec. 1989a.

BONNEN, A. M.; HAMMERSCHMIDT, R. Role of cutinolytic in infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 35, 6, p. 475-482, Dec. 1989b.

BROOKER, N. I.; LESLIE, J. F.; DICKMAN, M. B. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 672-677, June 1991.

BUTCHER, A. C. Non-allelic interactions and genetic isolation in wild populations of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, Oxford, v. 24, p. 621-631, 1969.

BUTCHER, A. C. The relationship between sexual outcrossing and heterokaryon incompatibility in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, Oxford, v. 23, p. 443-452, 1968.

BUTCHER, A. C.; CROFT, J. H.; GRINDLE, M. Use of genotype environmental interaction analysis in the study of natural populations of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, Oxford, v. 29, p. 263-283, 1972.

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

CHAU, K. F.; ALVAREZ, A. M. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, n. 8, p. 1113-1116, Aug. 1983.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries.** 2002. 163 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Dezembro 2004: Safra café 2005/2006 – 1ª Previsão e 4ª Estimativa Safra 2004/2005.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/Safra/Safracafe4.pdf>> Acesso em: 10 mar. 2005

CORREL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1640-1646, Dec. 1987.

CORREL, J. C.; MORELOCK, T. E.; GERBER, J. C. Vegetative compatibility and virulence of the spinach anthracnose pathogen, *Colletotrichum dematium*. *Plant Disease*, St. Paul, v. 77, n. 7, p. 688-691, July 1993.

COSTA, H.; VENTURA, J. A.; FERRÃO, M. A. Mancha manteigosa em café arábica na região serrana do Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro-BA Anais... Porto Seguro: Embrapa Café, 2003. p. 206.

DIAS, J. S. A. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* com relação à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade. 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are non-pathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 28, n. 2, p. 235-242, Mar. 1986.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Effects of organophosphorus pesticides on cutinase and infection of papayas by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 8, p. 1209-1214, Aug. 1983.

DENHAM, T. G.; WALLER, J. M. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 98, n. 1, p. 65-77, May 1981.

DORIZOTTO, 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.

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

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

ELIAS, K. S.; SCHNEIDER, R. W. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 1, p. 88-93, Jan. 1991.



ELMER, W. H.; STEPHENS, C. T. Classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* into vegetatively compatible groups. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, p. 852-857, 1989.

FERREIRA, J. B.; PEREIRA, I. S. FERNANDES, K. D.; ABREU, M. S. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10., SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Necaf. Setembro 2004. CD-ROM

FIRMAN, I. D.; WALLER, J. M. **Coffee berry disease and other *Colletotrichum* disease of coffee.** Kew, Surrey: CMI, 1977. 53 p. (Phytopathological Papers, n. 20).

GIBBS, J. N. Inoculum sources for coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 515-522, Apr. 1969.

GLASS, N. L.; KULDAU, G. A. Vegetative compatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 201-221, 1992.

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.

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

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Chlorate reduction mutants, nitrate-utilizing (crn) mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Journal of General Microbiology**, Washington, v. 135, p. 721-727, 1989.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 417-423, Mar. 1988.

KRANTZ, J.; SCHUMUTTERER, H.; KOCH, W. **Diseases, Pests and Weeds in Tropical Crops.** Chichester: Wiley and sons, 1978.

LAPP, M. S.; SKOROPAD, W. P. Location of appressoria of *Colletotrichum graminicola* on natural and artificial barley leaf surfaces. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 70, n. 4, p. 225-228, Apr. 1978.

- LENNÉ, J. M. **Studies on the biology and taxonomy of *Colletotrichum* species.** 1978. Thesis (Ph.D.) - University of Melbourne, Melbourne, Australia.
- LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 2336-1342, 1993.
- LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, 291-338, 2001.
- MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café "Conilon" (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari, Espírito Santo. **Resumos...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.
- MARZLUF, G. A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 45, n. 3, p. 437-461, 1981.
- MATIELLO J. B.; ALMEIDA S. R. Controle associado de doenças do cafeeiro. **Correio Agrícola**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 25-27, 1997.
- Mc DONALD, J. A. A preliminary account of disease green coffee berries in Kenya colony. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 2, n. 2, p. 145-154, 1926.
- MERCER, P. C.; WOOD, R. K. S.; GREENWOOD, A. D. Initial infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. In: PREECE, T. F.; DICKINSON, C. H. (Ed.), **Ecology of Leaf Surface Micro-organisms**. London: Academic Press, 1971. p. 381-389.
- MILHOLLAND, R. D. Histopathology of strawberry infected with *Colletotrichum fragariae*. **Phytopathology**, St Paul, v. 72, n. 11, p. 1434-1439, Nov. 1982.
- NAIR, J.; CORBIN, J. B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pineae*. **Phytopathology**, St Paul, v. 71, n. 8, p. 777-783, Aug. 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.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. 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.

NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSROR (LAHKIM), L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 8, p. 827-832, Aug. 2002.

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

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

NUTMAN, J. F.; 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. 1969.

O'CONNELL, R. J. Absence of a specialized interface between intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and cells of *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 107, n. 4, p. 725-734, Dec. 1987.

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

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

OROZCO MIRANDA, E. F.; JULIATTI, F. CÉZAR; DORIZZOTTO A.; ABREU, M. S. Determinação da existência de raças fisiológicas no patossistema café x *Colletotrichum* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 222, 2003b. Suplemento.

- OROZCO MIRANDA, E. F.; JULIATTI, F. CÉZAR; FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S. Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro no estado de Minas Gerais e sua comparação com *Colletotrichum kahawae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 221, 2003a. Suplemento.
- OROZCO MIRANDA, E. F.; PIGOZZO, P.; PEREIRA I. S.; ABREU, M. S. Estudo das relações compatíveis e incompatíveis de *Colletotrichum* spp. x cafeeiro. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras, MG. **Trabalhos apresentados...** Lavras: Associação da Pós Graduação, APG-UFLA, 2002b.
- OROZCO MIRANDA, E. F.; RIBEIRO, A.; JULIATTI F. CÉZAR; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. e *Colletotrichum kahawae* obtidos de cafeeiro, por meio de marcadores RAPD e SSR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 222, 2003c. Suplemento.
- PARADELA FILHO, O.; PARADELA, A. L.; THOMAZIELLO, R. A.; RIBEIRO, I. J. A.; SUGIMORI, M. H.; FAZUOLI, L. C. O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico de Campinas**, Campinas, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, n. 191).
- PARBERRY, D. G. Biology of anthracnose on leaf surfaces. In: BLAKEMAN, J. P. (Ed). **Microbial ecology of the phylloplane**. London: Academic Press, 1981. p. 135-154.
- PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July/Aug. 1999.
- PORTO, M. D. M.; GRAU, C. R.; ZOETEN, G. A.; GAARD, G. Histopathology of *Colletotrichum trifolii* on alfafa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 3, p. 345-349, Mar. 1988.
- PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the bases of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 179-183, Feb. 1985.
- 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.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* PROVENIENTES DO CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.) COM BASE NA COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E SEXUAL

1 RESUMO

PEREIRA, Igor Souza. Caracterização de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* provenientes do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) com base na compatibilidade vegetativa e sexual. In: **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005. Cap. 2. p.28-63. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

Trabalhos envolvendo a caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro foram realizados no país nos últimos anos, enquanto estudos da variabilidade neste complexo envolvendo a compatibilidade vegetativa e sexual inexistem. O presente trabalho teve como objetivos a determinação da viabilidade da técnica de compatibilidade vegetativa utilizando-se mutantes *nit*, a determinação da variabilidade genética e do parentesco entre isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* existentes em Minas Gerais por meio da compatibilidade vegetativa e observar a formação de fase ascógena entre estes. Os experimentos foram divididos em dois ensaios realizados no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças de Plantas (DFP-UFLA). No primeiro ensaio, realizou-se a determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) e da viabilidade da técnica utilizada, enquanto, no segundo ensaio, fez-se a determinação de grupos de compatibilidade sexual. No primeiro experimento, pôde-se comprovar a viabilidade da técnica utilizada, observando-se, contudo, algumas dificuldades, tais como a não obtenção de algumas classes de mutantes *nit* em alguns isolados, a ocorrência de auto-incompatibilidade entre alguns mutantes e a instabilidade desses com o tempo. Pôde-se comprovar a elevada variabilidade genética de *C. gloeosporioides*, representada pelos 16 grupos de compatibilidade vegetativa. No segundo ensaio, houve a formação da fase ascogênica individualmente e ou quando pareados com os outros isolados, indicando que *C. gloeosporioides* do cafeeiro é uma espécie tanto homotática quanto heterotática. Comprovou-se, dessa forma, a origem da alta variabilidade, dado o elevado número de VCGs e a constatação da fase ascógena.

***Comitê de orientação:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador)

2 ABSTRACT

PEREIRA, Igor Souza. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* isolates of coffee (*Coffea arabica* L.) based on vegetative and sexual compatibility. In: **Vegetative and sexual compatibility of the complex *Glomerella-Colletotrichum* associated to coffee trees and histopathological studies**. 2005. Cap. 2. p. 28-63. Dissertation (Master's Degree in Phytopathology). Federal University of Lavras, Lavras - MG *

Studies involving morphologic, molecular, biochemical and pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated to coffee trees have been accomplished in Brazil in the last years, while studies of the variability in this complex involving vegetative and sexual compatibility does not exist. This work had as objectives to determine the viability of the technique of vegetative compatibility using *nit* mutants and the relationship among isolates of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* from coffee plants in Minas Gerais state, and the observe the formation of structures of sexual reproduction among these isolates. These experiments were divided in two trials, which were carried out at the Laboratory of Diagnosis and Control of Plant Diseases (DFP-UFLA). In the first trial the determination of vegetative compatibility groups (VCG) and the viability of the technique used was assessed, while in the second trial the determination of sexual compatibility groups was carried out. In the first experiment, the viability of nit mutant technique was demonstrated, however with some such difficulties as certain classes of *nit* mutants were not obtained for some isolates; the self-incompatibility occurrence among some mutants and the instability of those with time were also observed. It was possible to observe the great genetic variability of *C. gloeosporioides* represented by 16 groups of vegetative compatibility. *C. acutatum* was incompatible with *C. gloeosporioides* isolates. In the second trial there was the formation of the ascogenic phase individually or when pairings with carried with other strains, indicating that *C. gloeosporioides* from coffee trees is either a homothallic or heterothallic species. Therefore, it was proven the great variability in this pathosystem, given the high number of VCGs and verification of the ascogenic phase.

*Adviser Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Advisor); Eduardo Alves – UFLA (Co-advisor).

3 INTRODUÇÃO

O complexo *Colletotrichum-Glomerella* do cafeeiro ainda não se encontra bem elucidado e estudos nas diversas áreas do conhecimento são essenciais para a prevenção de problemas econômicos que hoje já são percebidos.

No cafeeiro, o gênero *Colletotrichum* inclui múltiplas espécies, com uma inexistente na América do Sul (*C. kahawae*), espécies complexas, como é o caso de *C. gloeosporioides* e com grupos subespecíficos, representados pelos isolados causadores de mancha manteigosa de distinção algumas vezes incerta.

Estratégias de reprodução têm um papel importante na determinação da variabilidade nestas espécies, em que o alto nível desta variação genotípica é usualmente associado com a reprodução sexual. Nas espécies associadas ao cafeeiro, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* podem se reproduzir sexuadamente enquanto que em *C. kahawae*, isso não ocorre (Waller *et al.*, 1993). Outra forma de incremento na variabilidade é a heterocariose e parassexualidade, sendo estes fatores importantes em *Colletotrichum* spp. O modo de reprodução em muitas populações de *Colletotrichum* é exclusivamente vegetativa; dessa forma, a troca de material genético entre dois indivíduos só ocorre pela anastomose e heterocariose.

Dessa forma, a compatibilidade vegetativa serve como um meio natural para subdividir fungos em populações, permitindo a troca genética somente entre indivíduos que pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG). Uma aplicação útil dessa técnica é o uso dos grupos de compatibilidade como ferramenta de diagnose e, assim, separar indivíduos de uma mesma espécie, *formae speciales*, patótipo ou outra característica dentro de um mesmo VCG. É utilizável também para o estudo de outros aspectos populacionais de

Colletotrichum, tais como etiologia, estrutura populacional, especificidade de hospedeiros, distribuição geográfica e estratégia reprodutiva (Katan, 2000).

Com base na técnica sugerida por Puhalla (1985), adaptada para *Colletotrichum* spp. por Brooker *et al.* (1991), o estudo de compatibilidade vegetativa ficou menos laborioso, uma vez que a maior dificuldade na identificação de VCGs é determinar quais isolados são compatíveis.

Esta técnica permite observações macroscópicas de heterocariose e a caracterização de VCGs, consistindo na formação prévia de mutantes que são incapazes de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio (mutantes *nit*). Os mutantes *nit* são produzidos por meio do crescimento do fungo em meio contendo clorato. Setores com crescimento rápido, resistentes ao clorato de potássio (KClO₃), são então selecionados. Todos os mutantes resistentes ao clorato podem apresentar deficiência em qualquer dos genes que regulam a assimilação do nitrato. Assim, os mutantes *nit* apresentam crescimento ralo, com pouco ou nenhum micélio aéreo, em meios contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Quando as colônias de dois mutantes *nit*, crescendo em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, têm a capacidade de formar um heterocarionte (micélio normal na zona de contato entre duas colônias), diz-se que os isolados correspondentes àqueles mutantes *nit* pertencem ao mesmo VCG (Leslie, 1993a).

A variabilidade de *Colletotrichum* spp. proveniente de cafeeiro utilizando-se o estudo dos VCGs já foi realizada por Beynon *et al.* (1995) e Varzea *et al.* (2002), entretanto, nestes trabalhos, não utilizaram nenhum isolado proveniente do Brasil.

Objetivou-se, neste trabalho, a determinação da viabilidade da técnica de compatibilidade vegetativa adaptada para estudos com *Colletotrichum* por Brooker *et al.* (1991), a determinação da variabilidade genética e do parentesco entre isolados de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum* existentes no estado de

Minas Gerais por meio da formação de VCGs e observar a formação de estruturas de reprodução sexual entre estes isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação dos experimentos

Dois ensaios foram conduzidos no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais. O primeiro ensaio foi realizado no período de janeiro a agosto de 2004 e abrangeu a caracterização de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiros com base na compatibilidade vegetativa. O segundo ensaio foi conduzido no período de agosto a dezembro de 2004, no qual avaliou-se a compatibilidade sexual desses isolados de *Colletotrichum* spp.

4.2 Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. quanto à compatibilidade vegetativa

4.2.1 Origem dos isolados

Os isolados utilizados foram previamente caracterizados no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidade de Plantas do Departamento de Fitopatologia por Orozco (2003) e estão detalhados na Tabela 1.

Realizou-se o isolamento a partir de fragmentos de folhas, ramos e frutos com sintomas de mancha manteigosa e seca de ponteiros das diferentes regiões produtoras do estado.

Partes do tecido infectado foram superficialmente desinfestadas com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por um minuto, lavadas em água destilada e esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado. A seguir,

foram transferidas para placas de petri com meio de cultura MEA 2% (extrato de malte-ágar) mais cloranfenicol e incubadas por sete dias em BOD a 22°C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias purificadas foram utilizadas para a obtenção de culturas monospóricas, em que esporos do fungo foram suspensos em 5 mL de água esterilizada e, em seguida, alíquotas de 10 µL dessa suspensão foram recolhidas com uma pipeta e colocadas sobre a superfície de meio ágar água contido em placas de petri e colocadas a 25°C. Após a germinação dos conídios, fizeram-se observações ao microscópio de luz, em que foram marcados e cortados pequenos blocos do meio contendo apenas um conídio germinado. Este conídio foi colocado em meio MEA 2%, originando-se, então, uma cultura monospórica. Passados oito dias, discos com micélio desses isolados foram conservados em água esterilizada usando o método de Castellani.

TABELA 1 Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados nos estudos dos grupos de compatibilidade vegetativa. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Isolado	Órgão	Sintoma	Procedência	Data
1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras	2001
2	Folha	Mancha manteigosa	Piumhi	2001
3	Folha	Necrose	Sto.Ant.Amparo	2001
5 ¹	Folha	Necrose	Ouro Fino	2001
6	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras	2001
8	Ramo	Necrose	Boa Esperança	1998
9	Folha	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
10	Ramo	Seca de ponteiros ²	Nepomuceno	2001
11	Fruto	Mancha manteigosa	Nepomuceno	2001
12	Folha	Mancha manteigosa	Poço Fundo	2001
16	Ramo	Necrose	Ibituruna	1998
18	Ramo	Necrose	Varginha	1998
19	Ramo	Necrose	Patrocínio	1999
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
29	Ramo	Seca de ponteiros	Capelinha	2001
30	Fruto	Necrose	Ouro fino	2000
32	Ramo	Necrose	Cristais	2002
34	Fruto	Necrose	Cristais	2002

¹*C. acutatum* ² Proveniente de planta com sintoma de mancha manteigosa

4.2.2 Meios de cultura

Para a manutenção dos isolados normais, utilizou-se o meio de extrato de malte e ágar (2 %) e, para todos os ensaios envolvendo isolados e caracterização de mutantes resistentes ao clorato, utilizou-se um meio base (MB),

suplementado de acordo com o objetivo pretendido segundo Correl *et al.* (1987) e utilizado por Varzea *et al.* (2002b).

Os meios foram os seguintes:

a) MEIO BASE (MB) por litro de água destilada: $C_{12}H_{22}O_{11}$ (30 g); KH_2PO_4 (1 g); $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g); KCl (0,5 g); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (10 mg); ágar (20g) e solução de elementos mínimos (0,2 ml) composto por ácido cítrico (5 g); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 g); $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (1 g); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,25 g); $MnSO_4 \cdot H_2O$ (50 mg); H_3BO_3 (50 mg) e $NaMoO_4 \cdot H_2O$ (50 mg) em 95 ml de água destilada.

b) MEIO MÍNIMO (MM) por litro de meio base (MB): $NaNO_3$ (2 g).

c) MEIO MÍNIMO mais CLORATO (MMC) por litro de MM: l-asparagina (1,6g) e $KClO_3$ (15 g).

d) MEIO DE HIPOXANTINA (MH) por litro de meio base (MB): hipoxantina (0,2 g).

e) MEIO DE NITRITO (MN) por litro de meio base (MB): $NaNO_2$ (0,5g).

4.2.3 Geração de mutantes *nit*

Para a geração de mutantes resistentes ao clorato, foi utilizado o método de Puhalla (1985), modificado para *Colletotrichum* spp. por Brooker *et al.* (1991) e Wasilwa *et al.* (1993). Discos miceliais, de 3 mm de diâmetro, das margens das colônias dos diferentes isolamentos crescidos em MEA por 15 dias, foram transferidos para meio mínimo (MM) contendo 1,5% de $KClO_3$. Para cada isolado foram transferidos 20 discos miceliais que, posteriormente, foram incubados no escuro a 22°C e, semanalmente, foi observado se setores com crescimento rápido apareciam.

Esses setores foram transferidos para meio MM e aquelas colônias que apresentaram crescimento ralo neste meio, com pouco ou nenhum micélio aéreo, foram consideradas como mutante *nit*.

4.2.4 Caracterização fenotípica dos mutantes *nit*

A fim de se caracterizar o fenótipo dos mutantes *nit* obtidos em MMC, observou-se a morfologia das suas colônias em meio base (MB) suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. Das cinco fontes de nitrogênio indicadas por Brooker *et al.* (1991) para caracterização fenotípica, foram utilizadas apenas duas: MH (MB com hipoxantina) e MN (MB com nitrito). Com isto, agruparam-se os mutantes em quatro classes fenotípicas (Tabela 2), com base na classificação de mutantes em estudos de *Aspergillus nidulans* (Cove, 1976, 1979), *Neurospora crassa* (Marzluf, 1981) e *Fusarium oxysporum* (Correl *et al.*, 1987).

TABELA 2 Caracterização dos mutantes não utilizadores de nitrato (mutantes *nit*) através do crescimento em meios com diferentes fontes de nitrogênio (Correll *et al.*, 1987; Klitich & Leslie, 1988).

Mutações	Designação dos mutantes	Crescimento sobre fontes de nitrogênio				
		Nitrato	Nitrito	Amônio	Hipoxantina	Ác. Úrico
Nenhuma	Selvagem	+	+	+	+	+
Locus estrutural da nitrato redutase	<i>nit 1</i>	-	+	+	+	+
Principal locus regulatório do nitrogênio	<i>nit 2</i>	-	-	+	-	-
Locus regulador do metabolismo catabólico do nitrato	<i>nit 3</i>	-	-	+	+	+
Locus do cofator molibdênio	<i>nit M</i>	-	+	+	-	+

(+) Crescimento normal (tipo selvagem); (-) Crescimento ralo com pouco ou nenhum micélio aéreo.

Aqueles mutantes que cresceram normalmente em meio contendo nitrito foram considerados *nit M*; os mutantes incapazes de utilizar nitrito e hipoxantina foram considerados *nit 2*. Mutantes que cresceram normalmente em nitrito e em hipoxantina foram considerados *nit 1* e, finalmente, aqueles que cresceram somente em hipoxantina *nit 3*.

4.2.5 Análise de autocompatibilidade vegetativa

A autocompatibilidade vegetativa dos diferentes genótipos de cada isolado foi testada por meio do seu pareamento em meio MM, colocando-se os blocos miceliais afastados entre si em 1 cm. As placas foram incubadas por, pelo menos, quatro semanas, observando-se a presença de micélio aéreo (tipo

selvagem), na zona de contato entre as duas colônias. Utilizaram-se nos testes de complementação somente os mutantes *nit* que foram autocompatíveis.

4.2.6 Testes de complementação para a formação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG)

Foi selecionado um mutante da classe fenotípica *nit* 1 e outro mutante da classe *nit* 3 para cada isolado do fungo, visto terem sido estes os mais comumente encontrados no presente trabalho. Com estes diferentes mutantes *nit*, fizeram-se pareamentos entre todos os isolados, colocando-se blocos miceliais de cada um dos dois mutantes complementares em meio MM. Estes blocos miceliais foram colocados afastados 1 cm entre si e incubados no escuro a 23°C-25°C.

Após 15 dias de incubação, semanalmente foi avaliada a presença do heterocarionte pela observação da existência de micélio aéreo (tipo selvagem), na zona de contato entre as duas colônias. Os pareamentos foram classificados segundo Varzea *et al.* (2002), como: a) fortes (+), para a complementação se uma densa zona de micélio aéreo desenvolver-se entre os mutantes depois de 4 semanas; b) fraco (\pm), se a zona de complementação ocorrer finamente passadas 6 semanas ou, ainda, se tornar evidente somente depois de 7 semanas ou mais e c) negativo (-), para aqueles pareamentos sem complementação visível depois de 7 semanas. Estes pareamentos foram realizados duas vezes.

Os isolados que se apresentaram vegetativamente compatíveis entre si foram classificados como pertencentes a um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa.

4.3 Avaliação da compatibilidade sexual de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiros

4.3.1 Origem dos isolados

Os isolados utilizados foram caracterizados no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidade de Plantas do Departamento de Fitopatologia por Orozco (2003) e estão detalhados na Tabela 3. Fizeram-se o isolamento e a obtenção de cultura monospórica conforme metodologia descrita no item 4.2.1.

TABELA 3 Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados na avaliação de compatibilidade sexual. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Isolado	Órgão	Sintoma	Procedência	Data
1	Folha	Mancha manteigosa	Lavras	2001
3	Folha	Necrose	Sto.Ant.Amparo	2001
4	Fruto	Necrose	Sto.Ant.Amparo	2001
6	Ramo	Seca de ponteiros	Lavras	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
18	Ramo	Necrose	Varginha	1998
21	Folha	Necrose	Piumhi	1998
23	Fruto	Necrose	Araguari	1998
24	Fruto	Necrose	Araguari	1998
26	Fruto	Necrose	Teixeiras	1998
27	Fruto	Necrose	Patrocínio	1998
28	Fruto	Seca de ponteiros	Araguari	1998
29	Ramo	Seca de ponteiros	Capelinha	2001
30	Fruto	Necrose	Ouro fino	2000
32	Ramo	Necrose	Cristais	2002
33	Ramo	Necrose	Cristais	2002
35	Folha	Necrose	Campo Belo	2002

*Planta com mancha manteigosa.

4.3.2 Obtenção da fase sexuada

A fim de se avaliar a compatibilidade sexual, fez-se o pareamento dos isolados descritos na Tabela 3 em diversas combinações. Estes isolados monospóricos cresceram em MEA 2% por 10 dias em câmara de crescimento a



22°C ±1°C, de onde, posteriormente, retirou-se um disco micelial da cultura com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro para que se realizassem os pareamentos.

Estes pareamentos foram conduzidos em meio de cultura batata-cenoura ágar 2% (PCA) a 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Cada placa de petri recebeu quatro discos miceliais equidistantes de diferentes isolados, perfazendo-se todas as combinações possíveis. Fizeram-se avaliações qualitativas da formação de peritécios, ascos e ascósporos, um mês após a realização dos pareamentos.

Estes isolados também foram repicados separadamente para placas com PCA 2% nas mesmas condições descritas anteriormente, a fim de se observar a formação de peritécios, ascos e ascósporos.

Estas avaliações foram efetuadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio e microscópio de luz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eficiência na recuperação de mutantes *nit*

De cada isolado, recuperaram-se 20 setores de crescimento rápido resistentes ao clorato, quando cultivados em meio mínimo com clorato (MMC). A formação destes setores nas colônias variou entre os isolados, tendo alguns apresentado mais de um setor com crescimento micelial raso, enquanto a maioria apresentou apenas um setor com micélio abundante.

A frequência com a qual setores espontâneos surgem em culturas varia de espécie para espécie e mesmo entre isolados dentro de uma mesma espécie. Condições ambientais, como temperatura e nutrientes, assim como o meio de cultura e a fonte de inóculo da colônia utilizados, tais como conídios, micélio ou a mistura de ambas, também podem afetar esta variação (Leslie, 1993a; Correll *et al.*, 1987; Brooker, *et al.*, 1991).

O tempo para o aparecimento destes setores variou entre os isolados. Aos 10 dias já surgiram, em média, 63% desses setores, entretanto, alguns isolados, como I-2, I-8 e I-19, só apresentaram estes setores a partir do vigésimo e trigésimo dia após repicagem para MMC, enquanto os isolados I-12, I-15, I-24 e I-25 apresentaram mais de 90% dos setores aos 10 dias após repicagem (Tabela 4). Esta variação no tempo de obtenção destes setores resistentes foi relatada por Brooker *et al.* (1991) para diferentes espécies de *Colletotrichum*, segundo os quais, a partir da primeira semana em MMC se formavam setores estendendo-se este período até a quinta semana. A obtenção desses setores ocorre entre 7 e 28 dias, para *C. orbiculare* (Wasilwa *et al.*, 1993) e 21 dias, para *C. coccodes* (Nitzan *et al.*, 2002). Segundo Varzea *et al.* (2002), todos os isolados de *C. kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de

cafeeiro apresentaram setores com aproximadamente 8 dias após a repicagem para MMC.

TABELA 4 Tempo para recuperação de setores dos diferentes isolados de *Colletotrichum* spp em meio mínimo mais clorato.

Isolados	% Setores ^a		
	Tempo de incubação (dias)		
	10	20	30
I-1	50	40	10
I-2	33	16	51
I-3	87	11	11
I-5	43	53	6
I-6	80	20	0
I-8	28	21	50
I-9	55	22	22
I-10	57	14	28
I-11	71	29	0
I-12	90	0	10
I-15	90	10	0
I-16	50	25	25
I-18	79	21	0
I-19	21	36	42
I-21	42	14	42
I-22	78	14	7
I-23	75	20	5
I-24	94	0	6
I-25	95	5	0
I-26	57	38	4
I-29	45	35	20
I-30	70	30	0
I-32	55	33	11
I-34	68	32	0
Média (+/-) ^b	63 (21-95)	22 (0-53)	14 (0-51)

^aO isolamento de setores resistentes parou quando 20 setores foram obtidos. ^bOs valores após a média indicam a variação observada entre o número de setores recuperados.

Mutantes resistentes ao clorato foram recuperados a uma frequência média entre 0,4 e 1,2 setores por colônia (Tabela 5), variando entre os diferentes isolados utilizados. A frequência relatada por Brooker *et al.* (1991) varia de 1,1 a 1,25 setor por colônia, para as cinco diferentes espécies de *Colletotrichum* estudadas, diferindo conforme o meio de cultura utilizado, embora a concentração de $KClO_3$ fosse a mesma. Segundo Leslie (1993b), alguns isolados de *Fusarium moniliforme* produzem menos setores resistentes ao clorato em um meio composto com 3% ou 4,5% de $KClO_3$. *F. oxysporum* f.sp. *cubensis* também teve restrição quanto ao aparecimento dos setores, quando se utilizou a concentração de 5% de $KClO_3$ (Dias, 2000).

Foram considerados mutantes *nit* os setores que apresentaram crescimento ralo em meio MM, com pouco ou nenhum micélio aéreo (Figura 1).



FIGURA 1 Característica de mutante *nit* de *C. gloeosporioides* em meio mínimo.

5.2 Identificação dos fenótipos dos mutantes *nit*.

Do total de 480 setores recuperados, a maioria, 81,3% (Tabela 5), foi inapta a utilizar o nitrato (NaNO_3) como única fonte de nitrogênio, e conseqüentemente, cresceram como finas e expansivas colônias com micélio raso sobre meio mínimo (MM).

Os mutantes que cresceram normalmente em MM (capazes de utilizar o nitrato (NaNO_3) como única fonte de nitrogênio), não foram utilizados em caracterizações posteriores, uma vez que não formam heterocários visíveis em análises de compatibilidade vegetativa.

O fenótipo dos mutantes *nit* foi identificado após crescimento em meio base contendo hipoxantina (MH) ou nitrito (MN) como fontes de nitrogênio (Figura 2). Quatro classes fenotípicas de mutantes *nit* podem ser identificadas utilizando-se esta metodologia. Estas classes representam mutações em diferentes locus da via metabólica do nitrato a saber: locus estrutural da nitrato redutase (*nit 1*), principal locus regulador da assimilação de nitrato (*nit 2*), locus regulador da rota de assimilação do nitrato ou locus estrutural da nitrito redutase (*nit 3*) e vários loci responsáveis pela reunião do cofator molibdênio necessário para a atividade da nitrato redutase e purina desidrogenase (*nit M*). Estas classes fenotípicas correspondem àquelas atribuídas em estudos anteriores com mutantes de *Fusarium* (*nit 1*, *nit 3* e *nit M*) e *Neurospora* (*nit 2*) (Brooker *et al.*, 1991).

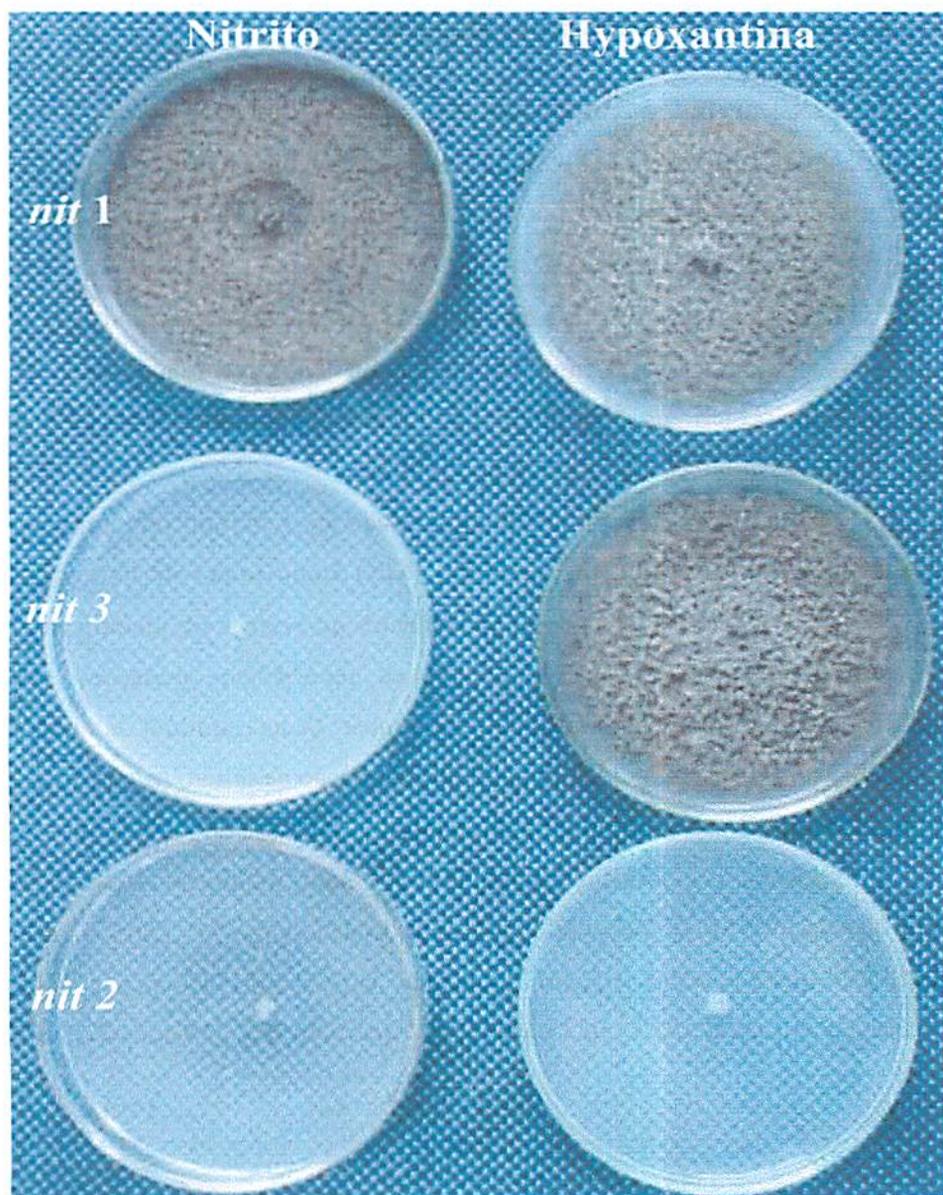


FIGURA 2 Fenótipos de mutantes *nit* de *C. gloeosporioides* identificados pelo crescimento sobre meios contendo diferentes fontes de nitrogênio.

Os isolados diferiram na frequência de classes estudada, conforme detalhado na Tabela 5. A maioria dos mutantes recuperados, 68,95%, foi *nit* 1, com exceção dos isolados I-2, I-5, I-24 e I-30. *Nit* 3 foi a segunda classe fenotípica mais encontrada, com 28,55%. Os isolados I-15, I-19 e I-34 não apresentaram outra classe, senão de *nit* 1 e foram descartados para trabalhos posteriores. O isolado I-5 apresentou 50% de seus mutantes na classe fenotípica *nit* 2, sendo, portanto, uma exceção. Nenhum dos isolados apresentou a classe *nit* M.

A predominância da classe fenotípica *nit* 1, seguida por *nit* 3 em *Colletotrichum*, já foi observada em outros trabalhos e está relacionada também ao meio de cultura utilizado para a produção destes mutantes (Brooker *et al.*, 1991; Varzea *et al.*, 2002). *C. gloeosporioides* isolado de *Malus* apresentou 65% e 35% de seus mutantes nas classes fenotípicas *nit* 1 e *nit* 3, respectivamente; *C. gloeosporioides*, isolado de *Vicia*, apresentou 90% de seus isolados na classe fenotípica *nit* 1 e 10% em *nit* 3. Segundo Varzea *et al.* (2002), todos os isolados de *Colletotrichum* utilizados em referido estudo produziram mutantes *nit* 1, enquanto mutantes *nit* 3, *nit* M e *nit* 2 foram produzidos nesta ordem decrescente de frequência; fenótipos *nit* M não foram produzidos por alguns isolados, mesmo após exaustivas tentativas. A frequência média em *C. fragariae* de mutantes *nit* 1 foi de 70%, *nit* 2 foi de 1,5% e 25% para *nit* 3 (Booker *et al.*, 1991); em *C. coccodes* a frequência foi de 84,3% para as classes *nit* 1/*nit* 3 e de 15,7% para *nit* M (Nitzan *et al.*, 2002).

A dificuldade em se obter mutantes *nit* de todas as classes fenotípicas, especialmente de *nit* M, já foi observada por Beynon *et al.* (1995), que, a partir de 27 isolados de *C. kahawae*, 7 isolados de *C. gloeosporioides* (cafeeiro) e 2 isolados de *C. acutatum* (cafeeiro), só obtiveram mutantes *nit* de 7 isolados (6 de *C. kahawae* e 1 de *C. gloeosporioides*), e a maioria desses era da classe fenotípica *nit* 1 e *nit* 3 seguida por *nit* M.

TABELA 5 Frequências e fenótipo dos mutantes *nit* de *Colletotrichum* spp. recuperados em meio mínimo acrescido de clorato (MMC).

Isolados	Setores por colônia ^a	Nits ^b (%)	Classes de nits ^c (%)			
			<i>nit</i> 1	<i>nit</i> 2	<i>nit</i> 3	<i>nit</i> M
I-1	0,8	91	70	0	30	0
I-2	0,5	66	25	0	75	0
I-3	1,0	80	60	0	40	0
I-5	0,8	100	20	50	30	0
I-6	0,8	100	60	0	40	0
I-8	0,8	80	90	0	10	0
I-9	0,7	100	80	0	20	0
I-10	0,5	88	60	0	40	0
I-11	0,4	100	80	0	20	0
I-12	1,1	79	70	0	30	0
I-15	1,2	66	100	0	0	0
I-16	1,0	93	70	0	30	0
I-18	1,0	91	60	0	40	0
I-19	0,8	66	100	0	0	0
I-21	0,8	100	70	0	30	0
I-22	0,8	80	90	0	10	0
I-23	1,1	44	90	0	10	0
I-24	0,9	66	40	0	60	0
I-25	1,1	50	90	0	10	0
I-26	1,0	73	60	0	40	0
I-29	1,0	75	60	0	40	0
I-30	1,0	63	30	10	60	0
I-32	0,9	100	80	0	20	0
I-34	1,0	100	100	0	0	0
Média	0,86	81,3	68,95	2,5	28,55	0

^a Frequência média de setores resistentes ao clorato por colônias. ^b Porcentual de setores resistentes ao clorato que cresceram como finas e expansivas colônias sobre o meio. ^c Fenótipos dos mutantes *nit* determinados de acordo com o crescimento sobre meio básico adicionado com diferentes fontes de nitrogênio.

Nos casos onde se isolou mais de um setor por colônia, estes se apresentaram fenotipicamente iguais quanto ao crescimento em MH e MN,

havendo, entretanto, casos em que houve diferença entre esses mutantes. Porém, este segundo caso ocorreu em menor número.

Nesta etapa do trabalho, observou-se a reversão de alguns mutantes *nit* de alguns isolados. Em mutantes *nit* de *Fusarium moniliforme*, a frequência de reversão pode variar de 0% a 75%, dependendo do isolado (Sidhu, 1986). Segundo Puhalla (1985), esta reversão que ocorre não interfere na formação de heterocários.

5.3 Análise da auto-incompatibilidade

Complementações entre mutantes *nit* de diferentes classes foram indicadas pelo desenvolvimento de denso crescimento prototrófico, em que o micélio das colônias dos mesmos entrou em contato e ocorreu anastomose com possível formação de heterocáριο.

Inicialmente, realizou-se o pareamento entre *nit* mutantes de um mesmo isolado das duas classes obtidas *nit* 1 e *nit* 3 para se verificar a auto-incompatibilidade. Todos os mutantes auto-incompatíveis foram descartados para os testes de complementação (Figura 3-A).

Alguns mutantes *nit* apresentaram-se auto-incompatíveis, apesar de ocorrer em baixa frequência, porém, nenhum isolado apresentou-se auto-incompatível em todos os seus *nit* mutantes. Este fenômeno da auto-incompatibilidade já foi relatado para *C. destructivum* e *C. fragariae* (Brooker *et al.*, 1991), para *C. acutatum* (cafeeiro), *C. gloeosporioides* (cafeeiro) e *C. kahawae* (Beynon *et al.*, 1995 e Varzea *et al.*, 2002).

A existência da auto-incompatibilidade não é exclusiva para o gênero *Colletotrichum*, sendo reportada em *F. oxysporum* (Correl *et al.*, 1987), *F. moniliforme* (Correl *et al.*, 1989) e *Verticillium dahliae* (Puhalla & Hummel, 1983), entre outros. Atribui-se esta característica à mutação em um *locus*

Foram encontrados 16 grupos de compatibilidade vegetativa. Os isolados I-1, I-3, I-10, I-22, I-26 e I-29 foram agrupados em um único VCG, sendo este o maior encontrado e os isolados I-19 e I-23 foram compatíveis entre si, formando outro VCG. O restante dos isolados autocompatíveis não foi compatível com nenhum outro isolado, formando, assim, um VCG cada (Tabela 6). O isolado de *C. acutatum* foi incompatível com os demais isolados de *C. gloeosporioides*, formando também um único VCG.

Os isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de plantas com mancha manteigosa foram agrupados em quatro VCGs: VCG1, VCG5, VCG8 e VCG9.

A partir desses resultados observa-se a elevada variabilidade da espécie *C. gloeosporioides*, variabilidade esta que já havia sido encontrada por Beynon *et al.* (1995). Esses autores consideram o sistema de compatibilidade em *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* (cafeeiro) complexo, com base nos dados de VCGs, em que somente 40% dos isolados de *C. kahawae* foram agrupados num mesmo VCG e o isolado de *C. gloeosporioides* não foi compatível com nenhum outro. Em outro trabalho, Varzea *et al.* (2002) confirmaram por meio de VCGs, a distinção das três espécies de *Colletotrichum* isoladas de cafeeiro. Neste trabalho, observa-se que 100% dos isolados de *C. gloeosporioides* foram incompatíveis entre si, mesmo entre isolados coletados num mesmo país. Nitzan *et al.* (2002) observaram que 27% dos isolados de *C. coccodes* não eram compatíveis com mutantes complementares de outros isolados, ou seja, esses se constituíram em membros únicos de VCGs diferentes.

A capacidade de dois isolados de formar um heterocário é controlada geneticamente pelos loci de incompatibilidade vegetativa chamados loci *vic* ou loci *het*, tendo pelo menos 10 diferentes loci *vic* já sido relatados em outros fungos filamentosos, como *F. oxysporum* e *F. moniliforme*. Este é um sistema homogênico, isto é, dois isolados serão vegetativamente compatíveis se os alelos, em cada um dos loci *vic*, forem idênticos. Teoricamente, em uma

população que possui 10 loci *vic* pelo menos 1024 (2^{10}), VCGs distintos podem existir (Correl, 1991). Em *C. gloeosporioides* poucos estudos já foram realizados a fim de se determinar quantos loci *vic* existem (Leslie, 1993a; Correl *et al.*, 2000). Em *C. graminicola* acredita-se que existam pelo menos cinco loci *vic* (Vaillaincourt & Hanau, 1994).

Em outros patógenos, como *F. moniliforme* e *F. oxysporum*, a extensão da incompatibilidade vegetativa já foi melhor estudada. Huang *et al.* (1997), estudando a diversidade populacional de *F. moniliforme* em um campo de milho, conseguiram, a partir de 63 isolados, encontrar 42 VCGs, 31 representados por um único isolado e 11 representados por dois a quatro isolados, perfazendo-se quase 0,7 VCG por isolado. A partir de uma mesma planta amostrada, identificaram de dois a quatro VCGs. Segundo estes autores, esta alta variabilidade indica que ocorre reprodução sexual, sendo esta muito importante no ciclo de vida de *F. moniliforme*.

Se uma população se reproduz sexualmente, maior será a variação genética e, conseqüentemente, maior o número de VCGs, uma vez que as combinações entre os loci *vic* são várias, chegando àqueles valores citados anteriormente (Leslie, 1993a). Os isolados utilizados para os testes de complementação possuem uma alta taxa de formação de *G. cingulata* em laboratório e, possivelmente, em campo.

O VCG-1 foi composto por isolados de diferentes regiões e tecidos da planta, o que demonstra a sua provável disseminação pela semente (Orozco, 2003), já que há um intenso intercâmbio entre as diferentes regiões produtoras do estado. O VCG-2, composto por dois isolados de regiões próximas, pode indicar uma provável adaptação destes isolados às condições microclimáticas dessas regiões.

TABELA 6 Grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) entre isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* isolados de cafeeiros (*C. arabica* L.)

VCG1	isolados	1	3	10	22	26	29	19	23	5	30	2	6	8	9	11	12	16	18	21	24	25	32	
	1	+																						
	3	+	+																					
	10	-	+	+																				
	22	-	+	+	+																			
	26	+	+	+	-	+																		
	29	+	-	-	-	-	+																	
VCG2	19	-	-	-	-	-	+																	
	23	-	-	-	-	-	+	+																
VCG3	5	-	-	-	-	-	-	-	+															
VCG4	30	-	-	-	-	-	-	-	-	+														
VCG5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+													
VCG6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
VCG7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
VCG8	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+										
VCG9	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+									
VCG10	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+								
VCG11	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+							
VCG12	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+						
VCG13	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+					
VCG14	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+				
VCG15	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
VCG16	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		

¹ Reação de compatibilidade forte. ² Reação de incompatibilidade.

5.5 Avaliação da formação de *Glomerella*

Neste trabalho realizou-se o pareamento de 25 isolados monospóricos de *C. gloeosporioides* (Tabela 3). Destes 25 isolados, sete apresentaram estruturas correspondentes a *G. cingulata*. A habilidade para a produção de peritécios férteis varia grandemente entre e dentro das espécies de *Colletotrichum*. Em algumas espécies ou grupos, isolados são férteis quando colocados em cultura e não em seus hospedeiros, como é o caso de *G. cingulata* e *G. glycines*; por outro lado, em outros, ocorre o contrário e isolados periteciais raramente são encontrados, por exemplo *C. lindemuthianum* e *C. musae* (Bryson *et al.*, 1992).

Os isolados em que observou-se a formação de peritécios maduros, isto é, peritécios que apresentavam ascos com ascósporos, foram os seguintes: I-35, I-33, I-29, I-21, I-18, I-16, e I-1.

Em outros isolados, pôde-se observar a produção de peritécios imaturos, onde ascos e ascósporos eram ausentes. Neste segundo grupo estão os isolados I-4, I-6, I-8, I-9, I-10, I-12, I-14, I-23 e I-32. No restante dos isolados não se observou nenhuma estrutura característica.

Certos autores afirmam ainda que a produção peritecial é muito sensível às condições ambientais. O estágio sexual de *C. graminicola* nunca foi reportada na natureza, mas pode ser induzida artificialmente sobre folhas de milho destacadas e incubadas em câmara úmida sob luz constante (Vaillancourt & Hanau, 1991). Em outras espécies, produz-se o estado peritecial em meio semi-sintético como BDA (batata dextrose e ágar), AO (aveia ágar) e cloreto de sódio, extrato de leveduras, sacarose e ágar (Struble & Keitt, 1950; Manandhar *et al.*, 1986).

Orozco (2003), quando fez a descrição dos isolados utilizados neste trabalho, relatou que alguns destes produziram peritécios em MEA 2% em alguma temperatura que variou entre 15^oC e 30^oC e fotoperíodo de 12 horas. Os

isolados em que observou tais estruturas foram os isolados I-1, I-9, I-10, I-11, I-12, I-13, I-15 e I-29. Entre os isolados de *C. gloeosporioides* do cafeeiro, as condições ambientais são determinantes.

Dentre os isolados que produziram peritécios maduros, podem-se distinguir dois grupos. Um primeiro onde só ocorreu a formação de ascos e ascósporos mediante cruzamento, sendo, então, denominados heterotáticos (autofertilização não ocorre e a fertilização cruzada é obrigatória) e outro grupo, em que houve a formação de ascos e ascósporos sozinhos e mediante cruzamentos, denominados homotáticos (Bryson *et al.*, 1992).

São heterotáticos os isolados I-33, I-21, I-18 e I-16. Os homotáticos são os isolados I-35 e I-29 e I-1. Segundo Bryson *et al.* (1992), embora o gênero *Glomerella* seja basicamente homotático, isolados heterotáticos podem ocorrer.

O isolado heterotático I-33 produziu peritécios maduros quando pareado com I-1, I-6, I-8, e I-32, o isolado I-21 quando pareado com I-6, I-18 e I-23, o isolado I-18 quando pareado com o I-3, I-4, I-14, I-15, I-21, I-23 e I-29 e o isolado I-16 quando pareado com os isolados I-32, I-33 e I-35.

Os peritécios formaram-se em grupos, de coloração marrom-escura, em forma de frascos cônicos, pilosos, gradualmente constrictos em direção ao ápice, finalizando num rostrum curto. Dentro dos peritécios encontraram-se ascos unitunicados, de formato claviforme, sésseis, medindo 35-45 μm x 7-12 μm , normalmente com oito ascósporos por asca. Os ascósporos são unicelulares, hialinos, ligeiramente curvados e com ápice arredondado, medindo de 10-21 μm x 3-7 μm .

6 CONCLUSÕES

A técnica de utilização de mutantes *nit* para estudos de compatibilidade vegetativa foi adequada para a realização do trabalho.

Com a técnica utilizada não se obtiveram as classes fenotípicas *nit-M* e observaram-se: auto-incompatibilidade entre mutantes de alguns isolados, reversão dos mutantes *nit* e crescimento micelial fraco na zona de contato em alguns casos.

Observou-se a formação de 16 grupos de compatibilidade vegetativa, tendo a maioria sido formada por um único isolado.

Observou-se a formação de *Glomerella in vitro* a partir de pareamentos e isoladamente, sendo, portanto, tanto homotática quanto heterotática.

A alta variabilidade foi confirmada pelo alto número de grupos de compatibilidade vegetativa e pode ser explicada pela reprodução sexual que há entre estes isolados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEYNON, S. M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, B. G.; VARZEA, V. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, n. 6, p. 457-470, June 1995.

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.

BROOKER, N. L.; LESLIE, J. F.; DICKMAN, M. B. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 672-677, June 1991.

CORREL, J. C. The relationship between *formae speciales*, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 9, p. 1061-1064, Sept. 1991.

CORREL, J. C.; GUERBER, J. C.; WASILWA, L. A.; SHERRILL, J. F.; MORELOCK, T. E. Inter- and intra-species variation in *Colletotrichum* and mechanisms which affect population structure. In: FREEMAN S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). *Host specificity, pathology and host-pathogen interaction of Colletotrichum*. London: APS Press, 2000. cap. 10, p.145-179.

CORREL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). **Mycological Research**, New York, v. 93, n. 1, p. 21-27, Jan. 1989.

CORREL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutante of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1640-1646, Dec. 1987.

COVE, D. J. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: The selection and characterization of chlorate resistant mutants. **Heredity**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 191-203, Apr. 1976.

COVE, D. J. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. **Biological Reviews of the Cambridge Phylosophical Society**, Cambridge, v. 54, n. 3, p. 291-327, 1979.

DIAS, J. S. A. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. . *cubense* com relação à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade. 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Univeridade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

HUANG, R.; GALPERIN, Y.L.; PERL-TREVES. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, p.871-881, 1997.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: FREEMAN S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Host specificity, pathology and host-pathogen interaction of Colletotrichum**. APS Press, 2000. cap. 10, p. 145-179.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 417-423, Mar. 1988.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150, 1993a.

LESLIE, J. F. Genetic exchange within sexual and asexual populations of the genus *Fusarium*. In: PLOETZ, R. C. **Fusarium wilt of banana**. 2. ed. St. Paul, Minnesota: APS PRESS The American Phytopathological Society, 1993b. p. 37-48.

MARZLUF, G. A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 45, n. 3, p. 437-461, 1981.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 3, p. 282-285, Mar. 1986.

NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSROR (LAHKIM), L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. *Phytopathology*, St. Paul, v. 92, n. 8, p. 827-832, Aug. 2002.

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

PUHALLA, J. E.; HUMMEL, M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, p. 1305-1308, 1983.

PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the bases of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 179-183, Feb. 1985.

SIDHU, G. S. Genetics of *Gibberella fujikuroi*. VIII. Vegetative compatibility groups. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 64, n. 1, p. 117-121, Jan. 1986.

STRUBLE, F. B.; KEITT, G. W. Variability and inheritance in *Glomerella cingulata* (Stonem) S. and V. S. form apple. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 37, n. 8, p. 563-576, Aug. 1950.

VAILLAINCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Nitrate-nonutilizing mutants used to study heterokaryosis and vegetative compatibility in *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). *Experimental Mycology*, San Diego, v. 18, n. 4, p. 311-319, Dec. 1994.

VAILLAINCOURT, L. J.; HANAU, R. M. A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*) from maize. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n. 5, p. 503-534, May 1991.

VARZEA, V. M. P.; RODRIGUES JR, C. J.; 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.

WASILWA, W. A.; CORREL, L.; MORECLOCK T.; McNEW, R. E. Re-examination of races the cucurbit anthracnose pathogen, *Colletotrichum orbiculare*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 11, p. 1190-1198, Nov. 1993.

CAPÍTULO 3

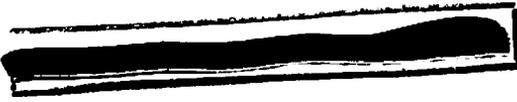
ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS DA INTERAÇÃO *Colletotrichum*- CAFEEIRO

1 RESUMO

PEREIRA, Igor Souza. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro. In: **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005. Cap. 3. p. 64-90. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

Nos estudos envolvendo a interação *Colletotrichum gloeosporioides*-cafeeiro (*Coffea arabica* L), poucas são as informações a respeito do modo de penetração e colonização deste patógeno. Objetivou-se, neste trabalho, estudar por meio da microscopia eletrônica de varredura, os eventos de pré-penetração e penetração de *C. gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiros e observar a colonização de *Colletotrichum* spp. em ramos e frutos provenientes de plantas com mancha manteigosa. Realizaram-se três ensaios no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME). No primeiro fizeram-se a observação e a descrição dos eventos de pré-penetração de *C. gloeosporioides* inoculados em hipocótilos de café cv. Acaiá Cerrado (MG-1474) com e sem ferimentos; no segundo observou-se a colonização de ramos de café enfermos que apresentavam murcha drástica e necrose local e, no terceiro, observou-se a colonização deste patógeno em frutos de café enfermos. Quando se inoculou *C. gloeosporioides*, pôde-se observar a germinação dos conídios nos hipocótilos feridos 6 horas após a inoculação, com a formação de dois tubos germinativos terminais e a adesão dos conídios nas depressões dos hipocótilos. Apressórios globosos a subglobosos e de contorno regular surgiram 12 horas após a inoculação. Até 72 horas, não foi possível observar a formação de acérvulos. Os ramos murchos apresentaram colonização nos vasos do xilema, floema e tecido cortical. Nos frutos em diferentes estádios de maturação observaram-se colonização no tecido próximo à epiderme e colapso dos estômatos na área lesionada.

***Comitê de Orientação:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador).



2 ABSTRACT

PEREIRA, Igor Souza. Histopathological studies of the interaction *Colletotrichum gloeosporioides* – coffee trees. In: **Vegetative and sexual compatibility of complex *Glomerella-Colletotrichum* associated to the coffee trees and histopathological studies.** 2005. Cap. 3. p. 64-90. Dissertation (Masters Degree in Phytopathology). Federal University of Lavras, Lavras - MG state*

In studies involving the interaction *Colletotrichum gloeosporioides* - coffee trees (*Coffea arabica* L.) are little the informations regarding the penetration and colonization way of this pathogen. The objectives in this work is study through scanning electron microscopy (SEM) the pre and penetration events of *C. gloeosporioides* in hypocotyls of coffee plantlets, observe the colonization of *Colletotrichum* spp. in branches and fruits of coffee trees with blister spot symptoms. The study took place in three trials at Laboratory of Diagnosis and Control of Plant Diseases and Electron Microscopy and Ultra-structural Analysis Laboratory (LME). In the first trial was made the observation and description of pre-penetration events of *C. gloeosporioides* inoculated in hypocotyls of coffee cv. Acaia Cerrado (MG-1474) with and without wounds, in second the colonization of coffee branches diseased that presented wilt drastic and local necrosis was observed and in third the colonization of this pathogen was observed in coffee fruits diseased. When *C. gloeosporioides* was inoculated, germination could be observed in wounded hypocotyls 6 hours after inoculation. Better adhesion of conidia was evident at surface depressions of hypocotyls and germination started by emission of one or two terminal germ tubes. Round or sub-round shaped apressoria appeared 12 hours after the inoculation. Up to 72 hours, acervulus observation was not observed. The wilted branches presented colonization both in the xilem and floem, and cortical tissues. In fruits in different maturation stages, was observed the colonization in tissues near to fruit epidermis and collapse of the stomas in the lesioned area.

*Adviser Committee: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Advisor); Eduardo Alves – UFLA (Co-advisor).

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* é freqüentemente relatado em várias espécies de plantas cultivadas em todo o mundo causando doenças em pré e pós-colheita, especialmente nas culturas das regiões tropicais e subtropicais. Este gênero é, na maioria das vezes, o agente causal de doenças cujos sintomas são comumente conhecidos como antracnose, ocorrendo em folhas, ramos e frutos (Jeffries *et al.*, 1990). A sintomatologia das doenças ocasionadas por espécies de *Colletotrichum* normalmente variam pouco entre os diferentes hospedeiros. Infecções em folhas, ramos e inflorescências jovens resultam em lesões deprimidas, escuras, com formato subcircular ou angular. Estas lesões crescem, coalescem e destroem grandes áreas, freqüentemente nas margens das folhas.

Em cafeeiro (*C. arabica* L.), a “mancha manteigosa” foi descrita pela primeira vez em 1957, por Wellman (1957), posteriormente demonstrada ser ocasionada por *Colletotrichum* (Vargas & Gonzáles, 1972). É uma doença de grande importância e ainda hoje geradora de dúvidas quanto à sua transmissibilidade, infecção e colonização. Testes de patogenicidade realizados na última década no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras confirmam a patogenicidade de alguns isolados de *C. gloeosporioides* sobre cafeeiros (Dorizzotto, 1993; Nechet, 2002 e Orozco, 2003). Em trabalhos realizados por Orozco *et al.* (2003), pôde-se comprovar a existência de interação diferencial entre genótipos de cafeeiros e isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, demonstrando mais uma vez a complexidade deste patossistema.

O conhecimento do processo de infecção das espécies de *Colletotrichum* em seus hospedeiros, assim como dos fatores que influenciam tais processos, é de extrema importância para elucidarem-se questões, tais como a adesão de

conídios, relação com a topografia do hospedeiro, tipo de penetração e formação de apressório. Além disso, é considerado um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias de controle. Este processo de infecção de espécies de *Colletotrichum* envolve uma seqüência comum de eventos composto por: adesão do conídio, germinação, alongação do tubo germinativo, formação do apressório, desenvolvimento de *peg* de infecção, penetração de células epidérmicas, crescimento das hifas intracelularmente, necrose celular e desenvolvimento de lesões (Jeffries *et al.*, 1990).

Até o presente, estudos envolvendo a microscopia eletrônica no complexo *C. gloeosporioides*-cafeeiro não haviam sido feitos. Desse modo, o conhecimento aqui gerado abre portas para trabalhos futuros, para que se possa conseguir um bom entendimento sobre as diversas doenças ocasionadas por este patógeno. Foram objetivos do trabalho acompanhar, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o início do processo de infecção de hipocótilos de café inoculados com *C. gloeosporioides*, observar a colonização de *Colletotrichum* spp. em ramos de café enfermos e observar a colonização de *Colletotrichum* spp. em frutos de café enfermos nos estádios verde-cana e cereja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação dos experimentos

Três ensaios foram conduzidos no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. O primeiro ensaio foi realizado no período de junho a dezembro de 2004, quando por meio de MEV, acompanhou-se o processo de pré-penetração de hipocótilos de café inoculados por *C. gloeosporioides* (agente da mancha manteigosa). No segundo ensaio, realizado no período de outubro e novembro de 2004, observou-se, por meio de MEV, a colonização de *Colletotrichum* spp. em ramos de café enfermos que apresentavam murcha e necrose local. O terceiro ensaio foi realizado no período de julho e agosto de 2004, visando observar, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a colonização de *Colletotrichum* spp. em frutos de café (*C. arabica* L.) enfermos nos estádios verde-cana e cereja.

4.2 Experimento I: Observação dos eventos de pré-infecção de *Colletotrichum* spp. sobre hipocótilos de cafeeiro inoculados

4.2.1 Obtenção de isolados de *C. gloeosporioides* de café

Os isolamentos foram realizados a partir de fragmentos de folhas e ramos com sintomas de mancha manteigosa da cultivar Catucaí Vermelho em seleção provenientes de lavoura experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, MG.

Partes do tecido infectado foram superficialmente desinfestadas com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por um minuto, lavadas em água destilada e esterilizada e secas em papel de filtro esterilizado. A seguir foram transferidas para placas de petri com meio de cultura MEA 2% (extrato de malte ágar) mais cloranfenicol, incubadas por sete dias em BOD a 22°C e fotoperíodo de 12 horas. As colônias características de *C. gloeosporioides* foram purificadas e, posteriormente, com auxílio de preparações microscópicas classificadas por espécie, conforme revisão de Sutton (1992). Neste experimento utilizaram-se dois isolados de *C. gloeosporioides*, um proveniente de ramos e outro proveniente de folhas.

4.2.2 Produção de hipocótilos

Sementes da cultivar Acaíá Cerrado, linhagem MG-1474, provenientes de lavoura sadia, foram lavadas com água corrente durante três horas, desinfestadas com álcool 50% por 50 segundos e em hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e novamente lavadas com água destilada esterilizada. As sementes foram colocadas para germinar a 25°C, em bandejas de plástico com areia esterilizada até a fase de palito de fósforo com 5 cm de comprimento.

4.2.3 Preparo e inoculação de hipocótilos

Os hipocótilos foram retirados das bandejas, lavados duas vezes em água corrente para que se retirasse a areia aderida às raízes e ao caulículo. Foram selecionados e acomodados cinco hipocótilos por placa, mantendo-se sob condições de alta umidade. Fez-se a inoculação com 50µl de suspensão de 2×10^6 conídios/mL dos dois isolados de *C. gloeosporioides*, em três áreas delimitadas

com o auxílio de uma caneta de marca permanente. Após a inoculação, as placas fechadas foram acondicionadas em BOD a $23^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ no escuro.

4.2.4 Coleta das amostras para microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Após 4 horas, foram coletadas as primeiras amostras de cada isolado. As áreas onde havia sido inoculado o fungo foram cortadas tanto transversal quanto longitudinalmente. A parte inferior do hipocótilo, não inoculada, foi descartada e a parte superior (inoculada) colocada em microtubos de 1,5 mL contendo fixador. Todas as amostras foram armazenadas em geladeira até seu completo processamento para visualização em MEV. As demais coletas foram realizadas com 5, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

4.2.5 Preparo das amostras para MEV

O preparo e a observação das amostras em MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Depois do material ser imerso em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2, por um período de no mínimo 24 horas, cinco ou mais fragmentos de cada tratamento foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato (0,05M) e lavados três vezes durante 10 minutos. As secções foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes). Após essa desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO_2 e completa secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e

cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens foram geradas e registradas digitalmente, havendo diversas imagens para cada amostra nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9.

4.3 Experimento II: Observações da infecção de ramos do cafeeiro por *Colletotrichum* spp. em MEV

4.3.1 Coleta e seleção do material

Neste experimento, utilizaram-se ramos de café da cultivar Catucaí Vermelho em seleção proveniente de lavoura experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, MG. Estes ramos apresentavam sintomas de mancha manteigosa com murcha descendente e necrose local. Fizeram-se cortes de fragmentos dos ramos medindo 2-3 cm de comprimento na zona de transição entre a região murcha e “sadia” e, posteriormente, foram imersos em solução fixativa até seu completo preparo para observação.

4.3.2 Preparo das amostras para MEV

O preparo e a observação das amostras em MEV foram realizados no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Após a imersão em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2, por 24 horas, cinco ou mais fragmentos foram transferidos para uma solução de glicerol a 30% por 30 minutos. Procedeu-se, em nitrogênio líquido, as fraturas dos fragmentos. As

fraturas eram tanto no sentido longitudinal quanto transversal dos ramos. Os fragmentos a partir daí foram preparados conforme descrito anteriormente para as amostras de hipocótilos inoculados (item 4.2.5).

4.4 Experimento III: Observações da infecção de frutos do cafeeiro por *Colletotrichum* spp. em MEV

4.4.1 Coleta e seleção do material

Neste experimento, utilizaram-se frutos de café da cultivar Catucaí Vermelho em seleção, provenientes de lavoura experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, MG. Estes frutos foram selecionados, utilizando-se somente aqueles que apresentavam sintomas característicos da enfermidade mancha manteigosa e, posteriormente, foram separados conforme o seu estágio de desenvolvimento, utilizando-se apenas frutos da fase 4 (verde-cana) e fase 5 (cereja) conforme Rena & Maestri (1985).

4.4.2 Preparo dos frutos para observação superficial

Os frutos selecionados foram seccionados em fragmentos de 0,5 cm². Estes fragmentos (casca e mesocarpo) da região lesionada do material foram imersos em solução fixativa até preparo para observação.

4.4.3 Preparo dos frutos para observação interna

Após observação superficial, estes fragmentos foram partidos ao meio e montados sobre *stubs* com a região partida voltada para cima. Como já estavam

secos, estes espécimes foram levados diretamente ao evaporador Balzers SCD 050 e examinados ao MEV.

4.4.4- Preparo das amostras para MEV

O preparo e a observação das amostras em MEV foram realizados no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, conforme descrito anteriormente para o preparo das amostras de hipocótilos inoculados (Item 4.2.5).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento I: Observação dos eventos de pré-infecção de *Colletotrichum* spp. sobre hipocótilos de cafeeiro inoculados

Entre 4 e 5 horas após a inoculação não se observou, independente da origem dos isolados, a germinação de conídios em hipocótilos com e sem ferimentos (Figura 1-A). A germinação de conídios dentro do gênero é bastante variável, iniciando-se entre 4 e 48 horas (Roberts & Snow, 1984; Bailey *et al.*, 1992; Orozco, 2003) sendo ainda dependente de fatores externos tais como temperatura (Orozco, 2003) e a presença de materiais exógenos (Bailey *et al.*, 1992; Skipp *et al.*, 1995).

A aderência dos conídios foi maior na região do hipocótilo onde as depressões eram mais evidentes, mostrando, portanto, uma certa correlação com a topografia do hospedeiro (Figura 1-B). Observação semelhante foi relatada por Porto *et al.* (1988) quando inocularam *C. trifolii* sobre alfafa. A adesão do esporo na superfície do hospedeiro é reconhecida, por vários autores, como evento essencial para o sucesso da infecção (Mendegen e Deising, 1993, Mercure *et al.*, 1994), influenciando inclusive no desenvolvimento da doença, pois uma rápida adesão dos conídios aumenta a chance de sucesso no estabelecimento do patógeno (Mercure *et al.*, 1994).

O início da germinação ocorreu 6 horas após a inoculação, quando alguns conídios emitiram um ou dois tubos germinativos (Figura 1-C). Este início de germinação ocorreu independente da origem dos isolados, entretanto, não houve germinação nos hipocótilos sem ferimentos. Somente com 12 horas ocorreu o início da germinação sobre hipocótilos sem ferimentos e, até o final das observações, ainda havia muitos conídios sem germinar. Orozco (2003)

observou que conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de cafeeiro iniciavam a sua germinação entre 5 a 8 horas em água destilada esterilizada a 25°C. Chen (2002) relatou que, 3 horas após a inoculação de *C. gloeosporioides* sobre folhas do cafeeiro, ocorria uma germinação média de 0,3% e, com 6 horas, uma germinação média de 13,5%. Em frutos, ocorria germinação mais acentuada e o início ocorria 6 horas após inoculação, com uma germinação média de 51%. Em *C. acutatum* f.sp. *pineae*, a germinação sobre plântulas de *Pinus radiata* tem início 6 horas após inoculação, ocorrendo máxima germinação 96 horas após inoculação (Nair & Corbin, 1981); *C. capsici*, sobre maçãs do algodoeiro, têm a sua germinação máxima concentrada em torno de 4 horas após a inoculação (Roberts & Snow, 1984); *C. trifolii*, inoculado sobre alfafa, tem germinação máxima ocorrendo em torno de 24 horas após a inoculação (Porto *et al.*, 1988), o mesmo ocorrendo para *C. gloeosporioides* inoculado sobre frutos de mamão (Chau & Alvarez, 1983). Portanto, há grande variação no tempo de germinação entre as diferentes espécies de *Colletotrichum*.

Esta não germinação em hipocótilos sem ferimentos deve-se, provavelmente, à ausência de substâncias exudadas pelo material vegetal. Segundo Bailey *et al.* (1992) e Skipp *et al.* (1995), materiais exógenos, tais como grãos de pólen, ácidos orgânicos e sideróforos, na gota do inóculo, podem influenciar a germinação. Na presença de nutrientes, o índice de germinação de esporos é acentuado.

O tubo germinativo foi emitido das extremidades do conídio, havendo, entretanto, alguns que surgiram lateralmente (Figura 1-D). Em *C. capsici* é comum o surgimento de um a três tubos germinativos, em função dos septos presentes no conídio desta espécie (Roberts & Snow, 1984), em *C. acutatum* f.sp. *pineae*, um ou dois tubos germinativos surgem lateralmente ou, mais freqüentemente, próximo à parte terminal do conídio (Nair & Corbin, 1981).

Com 12 horas após a inoculação, conídios emitiam apressórios ao final de tubos germinativos. O crescimento do tubo germinativo foi variável antes da emissão do apressório. Estes eram globosos a subglobosos e de contorno regular (Figura 1-E, F).

Segundo Chen (2002), 6 horas após inoculação de *C. gloeosporioides* sobre folhas de cafeeiro, havia formação de apressórios, mesmo tempo necessário para a formação de apressórios em frutos verdes inoculados. Este autor relata ainda que o máximo de formação de apressórios ocorreu com 18 horas após a inoculação. A formação de apressórios em *C. kahawae* inoculado sobre folhas e frutos de café, tinha início 6 horas após inoculação, tempo em que ocorria a máxima formação de apressórios.

Até o final do período de avaliação, não pôde-se observar a formação de acérvulos sobre o material. Segundo Orozco (2003), sintomas de *C. gloeosporioides* sobre hipocótilos de cafeeiro susceptíveis só eram observados cinco dias após a inoculação e aos dez dias ocorria a morte de plântulas. Com cortes histopatológicos de hipocótilos de café da cultivar Catucaí Vermelho inoculado, observavam-se acérvulos nove dias após a inoculação (Orozco, 2003). Em trabalho realizado por Chen (2002), a expressão de sintomas (lesões necróticas) em folhas e frutos inoculados com *C. kahawae* era evidente entre 72 e 96 horas após a inoculação.

É importante salientar que, apesar de utilizar-se uma concentração de 2×10^6 conídios/mL, a qual é considerada ideal em testes de patogenicidade nestes patossistemas (Dorizzotto, 1993), muitas amostras não tinham conídios aderidos. Este fato deve-se, provavelmente, ao método utilizado, que restringia o número de conídios nos hipocótilos.

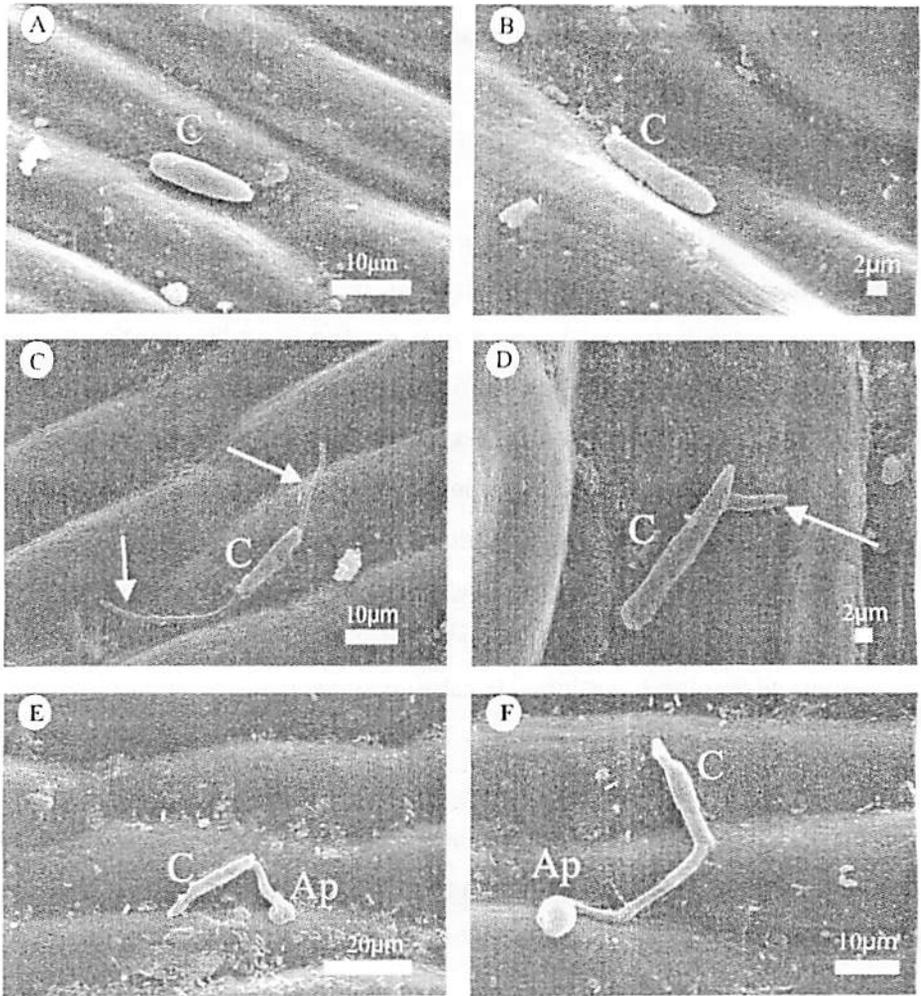


FIGURA 1 Eletromicrografia de varredura mostrando hipocótilos de cafeeiro inoculados com *C. gloeosporioides*. A - Conídio (C) não germinado 5 horas após inoculação. B - Adesão nas cavidades do hipocótilo. C - Germinação de conídios com emissão de dois tubos germinativos apicais (seta). D - Tubo germinativo lateral ao conídio (seta). E e F - Conídios (C) com apressórios (Ap) ao final do tubo germinativo.

5.2 Experimento II: Observações da infecção de ramos do cafeeiro por *Colletotrichum* spp. em MEV

A metodologia em que se utilizou glicerol 30% por 30 minutos, como crioprotetor, foi adequada para a realização dos cortes e posterior observação das amostras em MEV.

A partir de cortes transversais foi possível diferenciar os tecidos afetados (com a presença de micélio) daqueles sem a presença do fungo.

Nos tecidos doentes houve colonização significativa dos vasos do xilema, floema e tecido cortical. Nestas regiões, pôde-se observar um intenso crescimento de hifas sendo estas, então, um dos responsáveis pela murcha apresentada. A colonização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro ocorre sistemicamente, em que a partir de um ponto de entrada, transloca-se tanto de modo descendente quanto ascendente, havendo, entretanto, uma maior colonização deste segundo modo (Orozco *et al.*, 2002; Orozco, 2003; Pereira *et al.* 2004; Ferreira, 2004). Nas Figuras 2-A e 3-A, pode-se observar esta alta colonização nos tecidos do xilema e floema e na Figura 2-B, observa-se um tecido sadio no qual hifas do patógeno estão ausentes.

Nos cortes longitudinais do tecido cortical pode-se observar colonização do patógeno a partir de hifas (Figura 3-B).

A seca de ponteiros ou morte descendente de ramos são problemas graves no cafeeiro. Esta é considerada resultante de um complexo de tensões da própria planta e do ambiente, sendo atribuída a diversas causas, tais como o esgotamento de carboidratos na planta em decorrência de superprodução, tensões hídricas prolongadas, deficiência severa de certos minerais, alta luminosidade e temperatura elevadas, que podem ainda agravar a desordem (Rena & Maestri, 1985). Entretanto, a seca de ponteiros de natureza fitopatológica é comumente relatada e atribuída ao *Colletotrichum* spp. (Gustavo

d'Utra, 1902; Paradela Filho *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004), havendo, portanto, confusão na etiologia desta enfermidade.

Em plantas com mancha manteigosa, os sintomas de morte descendente de ramos causam graves prejuízos, piores que a morte de flores, queda e mumificação de frutos. A partir destas observações realizadas em MEV e estudos anteriores envolvendo este patossistema no Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas (DFP-UFLA), bem como observação das plantas doentes em campo, inclusive com o monitoramento das adubações (Ferreira, comunicação pessoal), pode-se confirmar a etiologia da doença seca de ponteiros ou morte de ramos nas plantas com mancha manteigosa como sendo atribuída a *C. gloeosporioides*.

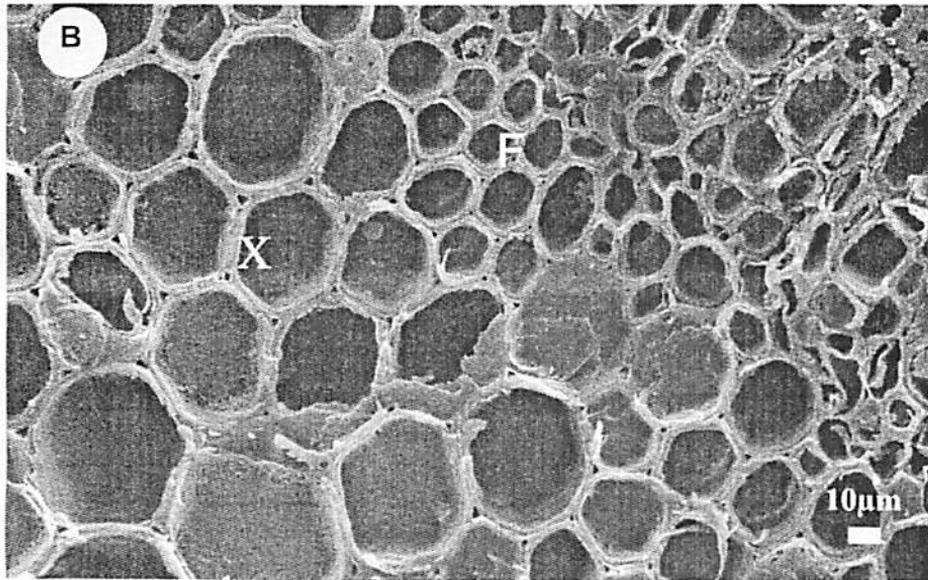
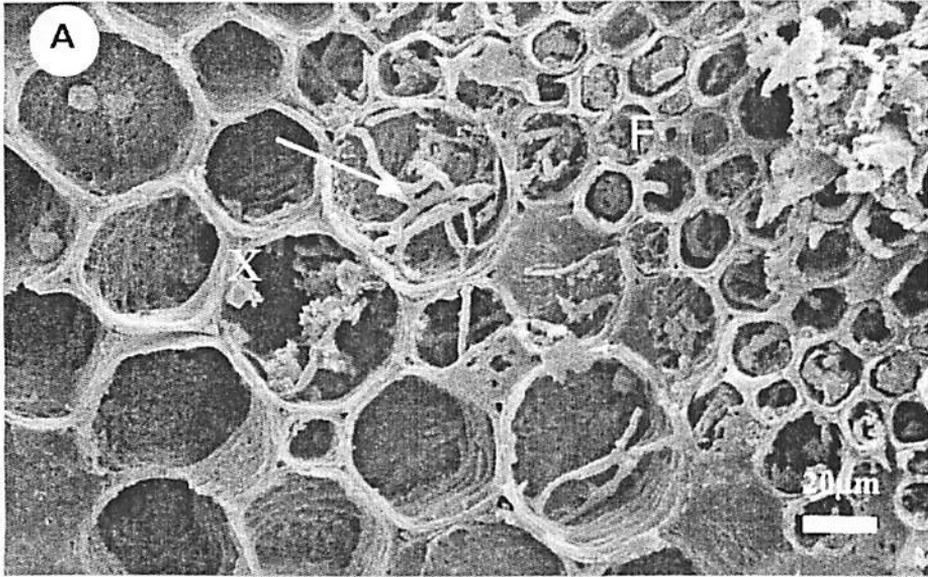


FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura de ramos de cafeeiro com mancha manteigosa apresentando seca de ponteiros cortados transversalmente. A – Vasos do xilema (X), floema (F) e células do parênquima do xilema colonizadas por hifas (seta). B – Vasos do xilema (X) e floema (F) sadios.

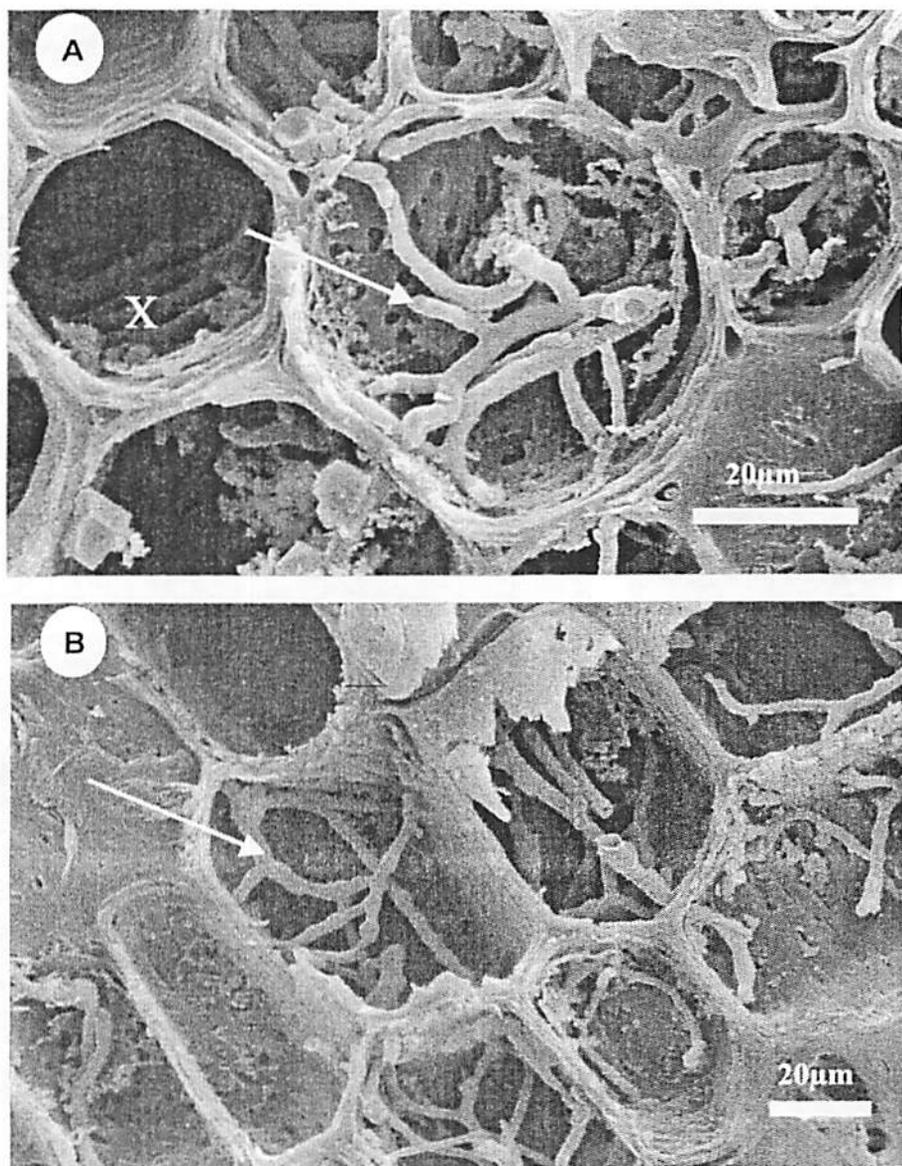


FIGURA 3 Eletromicrografia de varredura de ramos de cafeeiro com mancha manteigosa apresentando seca de ponteiros e necrose local. A – Detalhe da Figura 2 - A mostrando células do parênquima do xilema colonizado por hifas (seta). B – Corte longitudinal do tecido cortical colonizado por hifas (seta).

5.3 Experimento III: Observações da infecção de frutos do cafeeiro por *Colletotrichum* spp. em MEV

As primeiras observações foram realizadas na superfície dos frutos. Nestas observações não pôde-se distinguir nenhuma característica peculiar das lesões em frutos verdes que fosse diferente em frutos maduros e vice-versa. Conforme trabalhos realizados por Lins *et al.* (2004), a incidência de *C. gloeosporioides* é elevada e indiferente às fases do fruto de cafeeiro (*C. arabica* L.), chegando, em média, a atingir 86,6%. Estes autores observaram, ainda, uma elevada incidência deste fungo nos tecidos do exocarpo e mesocarpo juntos, atingindo 84,7% destes tecidos na cv Topázio, 79,16% na cv Rubi e 77,7% na cv Acaia.

As áreas lesionadas apresentam-se delimitadas, com formato circular a subcircular, em que se observa um aspecto coriáceo do tecido (Figura 4-A), enquanto que, na região sadia da amostra, as células epidérmicas mantêm seu aspecto normal. Em observações a olho nu, pode-se observar que este tecido tem um aspecto coriáceo sendo quebradiço. Na região enferma do tecido há desarranjo dos estômatos, apresentando-se lignificados (Figura 4-B), não sendo observado o mesmo nas áreas sadias da amostra (Figura 4-C).

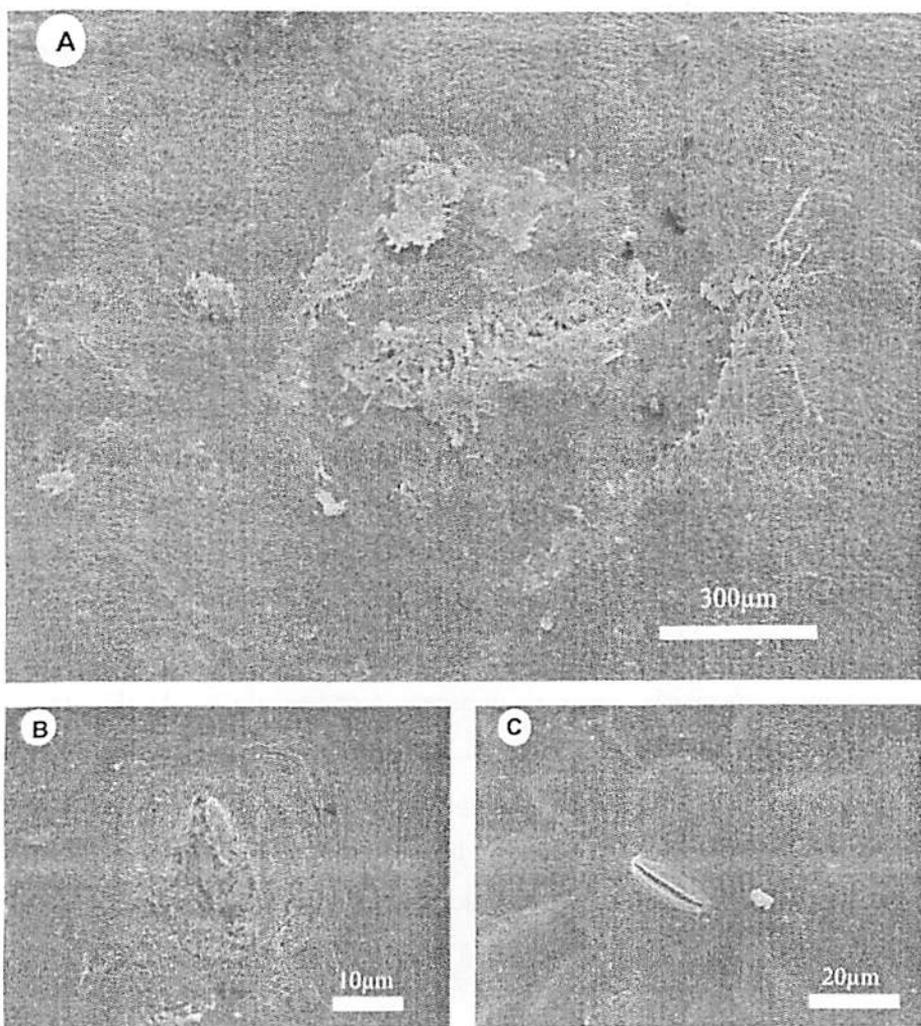


FIGURA 4 Eletromicrografia de varredura mostrando a superfície de um fruto de cafeeiro com mancha manteigosa. A – Lesão delimitada de forma circular. B – Estômato da área lesionada com aspecto corticoso. C – Estômato da área sadia no fruto.

Algumas lesões, principalmente dos tecidos mais velhos, expõem estruturas de *Colletotrichum*. Pode-se observar o crescimento de hifas sobre o tecido da casca do fruto (Figura 5-A) e também a produção de conídios mais internamente no tecido, na região onde ocorre rachadura (Figura 5-C), sem a produção de setas.

Posteriormente, quando se fez a fratura das amostras, pôde-se observar internamente os tecidos do exocarpo e mesocarpo. Naquelas regiões enfermas, notou-se o colapso celular constituído de material amorfo (Figura 5-D) e uma elevação do exocarpo pressionado pelas hifas ali presentes. Nestes tecidos, é possível observar o crescimento de hifas (Figura 5-B), preferencialmente próximo à casca.

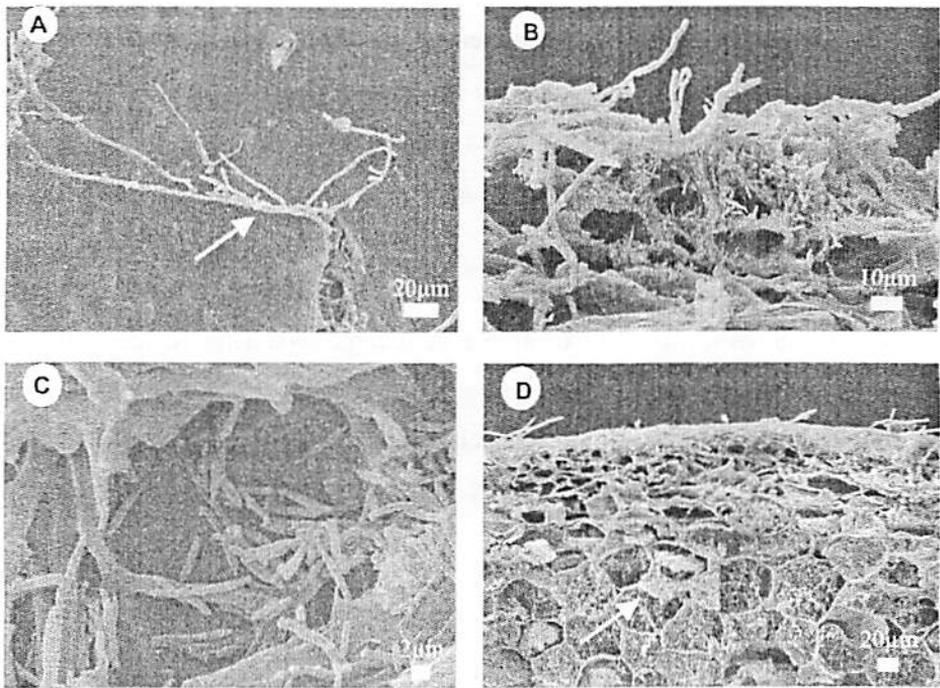


FIGURA 5 Eletromicrografia de varredura de fruto de cafeeiro com mancha manteigosa. A- Hifas (seta) originadas de uma rachadura na região da mancha manteigosa. B – Crescimento de hifas próximas à casca (Ep). C - Produção de conídios no interior do tecido. D. – Acúmulo de material nas células de frutos infectados (seta).

6 CONCLUSÕES

Frutos de cafeeiros com mancha manteigosa apresentam infecção por *Colletotrichum* spp., tanto na fase 4 quanto na fase 5 de maturação.

Ramos de cafeeiros com seca descendente têm seus vasos do xilema, floema e o tecido corticoso com intensa colonização por hifas de *Colletotrichum* spp., sendo esta a origem etiológica da enfermidade.

Em hipocótilos de cafeeiro, a adesão de conídios ocorre nas junções das células, sendo, portanto, dependente da topografia.

Há germinação de *C. gloeosporioides* 6 horas após a inoculação em hipocótilos de cafeeiros e diferenciação de tubos germinativos 12 horas após inoculação.

Não há diferença entre isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de folhas com mancha manteigosa e ramos com seca descendente, no que se refere aos eventos de pré-penetração sobre hipocótilos do cafeeiro.

Ferimentos em hipocótilos induzem mais rapidamente à germinação e formação de apressórios de *C. gloeosporioides*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. A.; O'CONNEL, R. J.; PRING, R. J.; NASCH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 88-120.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries**. 2002. 163 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

CHAU, K. F.; ALVAREZ, A. M. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 8, p. 1113-1116, Aug. 1983.

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) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

FERREIRA, J. B. **Flutuação sazonal e associação de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. a diferentes órgãos e tecidos de cafeeiros (*Coffea arabica* L.)**. 2004. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GUSTAVO D'UTRA. **As manchas das folhas dos cafeeiros**. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, v.3, n.1 p.1-13, Jan. 1902.

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

LINS, S. R. O.; FERREIRA, J. B.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. **Incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* nos estádios de formação e nos tecidos do fruto de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 135-135, ago. 2004. Suplemento

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*, Cambridge, v. 124, n. 2, p. 193-213, June 1993.

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 45, n. 6, p. 407-720, Dec. 1994.

NAIR, J.; CORBIN, J. B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pineae*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 8, p. 777-783, Aug. 1981.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. 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. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae*. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

OROZCO MIRANDA, E. F.; JULIATTI F. CÉZAR; DORIZZOTTO A.; ABREU, M. S. Determinação da existência de raças fisiológicas no patossistema café x *Colletotrichum* no Estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, p. 222, 2003a. Resumo. Suplemento.

OROZCO MIRANDA, E. F.; JULIATTI, F. C.; DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Determinação da resistência de cultivares de café e evidência de raças fisiológicas no patossistema café x *Colletotrichum* spp. no estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, p. 222, 2003b. Suplemento.

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

PEREIRA, I. S.; FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S. Progresso da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em plântulas de café (*Coffea arabica* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 136-136, ago. 2004. Suplemento.

PORTO, M. D. M.; GRAU, C. R.; ZOETEN, G. A.; GAARD, G. Histopathology of *Colletotrichum trifolii* on alfafa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 3, p. 345-349, Mar. 1988.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 26-40, jun. 1985.

ROBERTS, R. G.; SNOW, J. P. Histopatology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 4, p. 390-397, Apr. 1984.

SKIPP, R. A.; BEEVER, R. E.; SHARROCK, K. R.; RIKKERINK, E. H. A.; TEMPLETON, M. D. *Colletotrichum*. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxford: Pergamon/Elsevier Science, 1995. v. 2, p. 119-142.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos realizados, pôde-se confirmar a alta variabilidade presente entre os isolados de *C. gloeosporioides* provenientes do cafeeiro e que são causadores de seca de ponteiro, necrose em folhas, frutos e ramos e mancha manteigosa. Esta alta variabilidade pode ser comprovada pelo elevado número de grupos de compatibilidade vegetativa e a demonstração de que a troca de informações genéticas pode ser realizada tanto pelo processo parassexual quanto sexual.

A técnica de mutantes *nit* utilizada para a realização do estudo de VCGs foi adequada, apesar de algumas dificuldades terem sido encontradas. Sugere-se que, em outros trabalhos envolvendo VCGs, adicionem-se isolados de *C. gloeosporioides* patogênicos a outras culturas além do cafeeiro, para que se possa estudar a troca de informação genética entre esses isolados, colaborando para um maior entendimento, principalmente, no que se refere à patogenicidade encontrada entre alguns isolados em condições controladas.

Quanto aos estudos envolvendo a microscopia eletrônica, estes foram adicionados a este trabalho em função da grande demanda por informações a respeito da colonização de *C. gloeosporioides* causadores de mancha manteigosa sobre cafeeiros, sobretudo pela sintomatologia característica observada. Neste capítulo, pôde-se observar a colonização em frutos e ramos com seca descendente por *C. gloeosporioides*, demonstrando que a metodologia utilizada é ideal para estes tipos de trabalhos. Observou-se também adesão, germinação e formação de apressórios de *C. gloeosporioides* sobre hipocótilos de cafeeiros. Neste caso, deve-se salientar que a metodologia de preparo de amostras biológicas úmidas para microscopia eletrônica de varredura reduz o inóculo sobre as amostras, dificultando as observações. Portanto, deve-se trabalhar com

concentrações acima das utilizadas ou com a utilização do microscópio a baixo vácuo. Desse modo, eliminam-se todos os passos que contribuem para esta redução.

O tempo utilizado no terceiro experimento foi aquém do ideal, devendo-se, portanto, conduzir o ensaio por um tempo superior a 72 horas para que se possa observar todo o processo de colonização. Outros ensaios utilizando microscopia eletrônica de varredura e de transmissão deverão ser conduzidos, principalmente sobre folhas em mudas e folhas destacadas, utilizando-se sempre um tempo superior a 72 horas e isolados recém obtidos de plantas com sintomas.

Este complexo ainda é muito polêmico. Trabalhos focando as perdas econômicas em campo devem ser abordados, sobretudo no que se refere à queda de flores e chumbinhos e seu reflexo na produtividade. A metodologia de inoculação é outro entrave que deve ser abordado, utilizando outras formas de inoculação diferentes de tudo o que já foi experimentado até hoje, principalmente das metodologias utilizadas para *C. kahawae*.

