



LUCAS FIDELIS PEREIRA

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA E
GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*
spp. ORIUNDOS DE LESÕES DA MANCHA
MANTEIGOSA DO CAFEIEIRO**

LAVRAS - MG

2015

LUCAS FIDELIS PEREIRA

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ORIUNDOS DE LESÕES DA MANCHA
MANTEIGOSA DO CAFEEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Elaine Aparecida de Souza

LAVRAS - MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Lucas Fidelis.

Variabilidade fenotípica e genética de isolados de *Colletotrichum*
spp oriundos de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro / Lucas
Fidelis Pereira. – Lavras : UFLA, 2015.

59 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Melhoramento vegetal. 3. *Colletotrichum*. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LUCAS FIDELIS PEREIRA

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ORIUNDOS DE LESÕES DA MANCHA
MANTEIGOSA DO CAFEEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dra. Quélen de Lima Barcelos UFMT

Dra. Flavia Maria Avelar Gonçalves UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele nada disso poderia tornar realidade; aos meus pais, Ivaldo Fernando Andrade Pereira e Maria José Fidelis Pereira, por todo o amor, dedicação e sacrifício; esta vitória é tão minha, quanto suas.

Aos meus irmãos, Frederico e Fernando, mesmo longe, sempre comigo.

À Marina por todo o amor, companheirismo e ajuda nestes últimos anos.

Aos meus amigos da Pós-graduação, em especial ao Rafael, Larissa, Carlos Henrique, Márcia, Indalecio, Juliana e Renato, que me ajudaram para que esta caminhada tivesse sido mais prazerosa.

À professora e orientadora, Dra. Elaine Aparecida de Souza, pela confiança, ensinamentos e incentivo. A todos os professores do Programa de Genética e melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo.

A todos do Laboratório de Resistência de Plantas, Quélen, Mariana Junqueira, Rafael, Suellen, Samira, Paulinho, Larissa, Margot, Paula, Mariana Andrade, Luanna e Alex pela agradável convivência, amizade, companheirismo e ajuda, sem vocês não seria possível realizar este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

A mancha manteigosa do cafeeiro é uma doença que vem se destacando nos últimos anos, sendo causada pelo complexo *Colletotrichum* spp. A doença compromete todas as partes da planta, podendo levar a perdas totais na produção. O controle químico tem se mostrado ineficiente, por isso a importância da identificação de genótipos resistentes. Entretanto, estudos sobre o agente etiológico da doença e a sua caracterização acerca da variabilidade são poucos na literatura. Objetivou-se neste trabalho realizar o teste de patogenicidade de quatro isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro, por meio de duas metodologias diferentes, uma utilizando esporos e a outra micélio, como inóculo. Também foi realizada a caracterização fisiológica de 87 isolados de *Colletotrichum* spp. em que foi estimado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro da colônia. Caracterização citológica de 34 isolados de *Colletotrichum* sp. avaliados para dimensão dos conídios, porcentagem de conídios germinados, septo em conídios germinados, porcentagem de tubos de anastomose entre conídios (CAT's) e porcentagem de apressórios em tubos germinativos. Caracterização morfológica de 86 isolados de *Colletotrichum* sp. que foram classificados como conídias ou periteciais, além da avaliação da compatibilidade micelial de 45 isolados de *Colletotrichum* spp. Caracterização molecular de 32 isolados de *Colletotrichum* spp., por meio do marcador IRAP. No teste de patogenicidade, não foi observado nenhum isolado patogênico para as cultivares utilizadas. Os isolados apresentaram ampla variabilidade para todas as características avaliadas. A formação de CAT's, a presença de isolados sexuais e a alta compatibilidade micelial entre os isolados avaliados evidenciam a grande capacidade da(s) espécie(s) em ampliar a variabilidade genética. O marcador IRAP não foi eficiente em diferenciar os isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos da mancha manteigosa do cafeeiro.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Coffea arabica*. Resistência genética. Melhoramento genético. Caracterização morfológica. Fisiológica. Citológica. Marcador IRAP.

ABSTRACT

Coffee blister spot, caused by the *Colletotrichum* spp. complex, is a disease that has been gaining notice in recent years. This disease compromises all parts of the plant, leading to total loss in production. The chemical control has been shown to be inefficient, thus the importance of identifying resistant genotypes. However, studies on the etiologic agent and its characterization regarding variability are scarce in literature. In this work, we aimed at conducting the pathogenicity test of four *Colletotrichum* spp. isolates originated from coffee blister spot lesions, by means of two distinct methodologies, one using spores and the other mycelia as inoculate. We also performed the physiological characterization of 87 *Colletotrichum* spp. isolates, in which we estimated the mycelial growth index (MGI) and the diameter of the colony. Cytological characterization of 34 *Colletotrichum* spp. isolates was performed to evaluate conidia dimensioning, percentage of germinated conidia, septa in germinated conidia, percentage of conidial anastomosis tubes (CATs) and the percentage of appressoria in germination tube. We also performed morphological characterization of 86 *Colletotrichum* spp. isolates, which were classified as conidia or perithecial, in addition to the evaluation of mycelia compatibility of 45 *Colletotrichum* spp. isolates; molecular characterization of 32 *Colletotrichum* spp. isolates, by means of the IRAP marker. In the pathogenicity test, we observed no isolate pathogenic to the used cultivars. The isolates presented wide variability for all traits evaluated. The formation of CATs, the presence of sexual isolates and the high mycelial compatibility between the evaluated isolates show a high capacity of the species in widening its genetic variability. The IRAP marker was not efficient in distinguishing the *Colletotrichum* spp. isolates originated from the coffee blister spot.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Coffea arabica*. Genetic resistance. Genetic improvement. Morphologic characterization. Physiologic characterization. Cytological characterization. IRAP marker.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Conídios de isolados de *Colletotrichum* spp germinados. Microscopia de epifluorescência, corado com calcofluor. A: Conídios germinados com septos (isolado UFLA 65). B: Conídios germinados com septo formando apressórios (isolado UFLA 66)36
- Figura 2 Conídios de *Colletotrichum* spp formando tubos de anastomoses. Microscopia de epifluorescência, corado com calcofluor. A: Isolado UFLA 51 formando CAT's. B: Isolado UFLA 78 formando uma cadeia de CAT's37
- Figura 3 Conídios de *Colletotrichum* spp formando apressórios. Microscopia de epifluorescência, corado com calcofluor. A: Isolado UFLA 78 formando apressórios em conídios germinados. B: Isolado UFLA 80, formando apressórios em conídios germinados com septo38
- Figura 4 Placas do pareamento mostrando a compatibilidade micelial entre os isolados de *Colletotrichum* spp.. A: Isolado UFLA 49 (Seta preta) apresentando compatibilidade com os isolados UFLA 60 (Seta brancatracejada), UFLA 63 (Seta preta tracejada) e UFLA 70 (Seta branca). B: Isolado UFLA 46 (Seta branca) compatível com o isolado UFLA 51 (Seta preta)39
- Figura 5 Isolados de *Colletotrichum* spp formando diferentes tipos de colônia. A: Isolado UFLA 41 formando colônia peritecial/conidial. B: Isolado UFLA 44 apresentando apenas formação de conídios.....40
- Figura 6 Perfil de bandas polimórficas para o par de *primers* IRAP1/IRAP442

Figura 7 Dendograma de similaridade genética usando marcadores IRAP
para 32 isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequências dos <i>primers</i> dos marcadores IRAP.....	29
Tabela 2 Estimativas de médias para o IVCN (mm/dia) e diâmetro colonial (mm), 8 dias após a incubação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. avaliados.....	31
Tabela 3 Estimativas das médias do comprimento e largura (μm) dos conídios, porcentagem de conídios germinados nos tempos de 24 e 48 horas, porcentagem de tubos de anastomose entre conídios (CAT's) e porcentagem de conídios germinados com apressórios formados dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. avaliados.....	34
Tabela 4 Porcentagem de compatibilidade (% Comp.) micelial entre os isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. avaliados.....	39
Tabela 5 Tipo de morfologia da colônia dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. avaliados.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A cultura do café.....	12
2.2	A mancha manteigosa do cafeeiro	12
2.3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	15
2.4	Caracterização do fungo filamentoso <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	17
2.5	Interações <i>C. gloeosporioides</i> e o cafeeiro.....	21
2.6	Marcadores IRAP E REMAP	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	24
3.2	Teste de Patogenicidade.....	24
3.2.1	Inoculação com suspensão de esporos de <i>Colletotrichum spp.</i>	24
3.2.2	Inoculação com micélio de <i>Colletotrichum spp.</i>	25
3.3	Caracterização de isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	25
3.3.1	Caracterização fisiológica.....	26
3.3.2	Caracterização citológica dos esporos	27
3.3.3	Compatibilidade micelial de isolados de <i>Colletotrichum spp</i>	28
3.3.4	Caracterização morfológica das colônias	28
3.4	Caracterização molecular	28
3.5	Análises estatísticas.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Teste de Patogenicidade.....	31
4.2	Caracterização fisiológica.....	31
4.3	Caracterização citológica dos esporos	32
4.4	Compatibilidade micelial de isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	38
4.5	Caracterização morfológica das colônias	40
4.6	Caracterização molecular	42
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE	56

1 INTRODUÇÃO

A cultura do café é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, porém há vários fatores que podem reduzir a produção e, conseqüentemente, os ganhos com a cultura. Entre os fatores responsáveis por perdas significativas, destacam-se as doenças que acometem o cafeeiro.

Dentre as doenças, a mancha manteigosa, que vem sendo atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (ARMESTO et al., 2012), vem ganhando importância nos últimos anos (DIAS, 2002). Presente em seis estados produtores de café, esta doença é responsável por queima das ponteiros e mumificação dos frutos, podendo ocasionar perdas que chegam a 100% em casos mais graves (FERREIRA, 2006).

O controle da doença, por meio de fungicidas, tem se mostrado ineficiente, dessa forma a utilização de cultivares resistentes é uma alternativa que deve ser explorada. Porém, para que esta estratégia se torne viável e um programa de melhoramento se estabeleça, é necessário ajustar um teste de patogenicidade confiável, pois os testes já realizados não reproduzem os sintomas típicos da doença. Além disso, é importante que se conheça a variabilidade presente no patógeno, visto que são escassas as informações na literatura sobre a variabilidade de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro. Portanto, o objetivou-se no presente trabalho ajustar o teste de patogenicidade, utilizando isolados de *Colletotrichum* spp., além de avaliar a variabilidade presente em uma população de isolados de *Colletotrichum* spp., por meio de marcadores morfológicos, fisiológicos, citológicos e moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do café

O café arábica tem suas origens nas florestas tropicais do Quênia, Etiópia e Sudão, em altitudes que variam de 1.500 a 2.800 metros do nível do mar, e a temperatura ideal para o cultivo da espécie fica entre 18°C e 23°C (CAMARGO et al., 2010). O cultivo do café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) é uma das principais atividades econômicas e sociais do país. A produção da safra de 2014 foi de 45,141 milhões de sacas de café beneficiado, em uma área total de 2.221.816,2 hectares e 71,2% são cultivados com *Coffea arabica* (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo a espécie *Coffea arabica* a mais comum, cultivada em 14 estados brasileiros, com destaque para Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia. Em 2014, 1.338.132 toneladas de café foram exportadas, gerando cerca de oito bilhões de dólares de divisas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

Inúmeros fatores podem prejudicar a produção e a qualidade do café e as doenças que acometem o cafeeiro têm grande impacto na cultura. Entre as doenças que causam prejuízos a cultura do café, nos últimos anos, vem se destacando a mancha manteigosa.

2.2 A mancha manteigosa do cafeeiro

A mancha manteigosa foi descrita pela primeira vez em *Coffea arabica* na Costa Rica, acreditando que era uma doença de natureza virótica (WELLMAN, 1957). Estudos feitos por Vargas e Gonzalez (1972) elucidaram a

etiologia da doença como sendo de origem fúngica e tendo como agente causal o fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os sintomas iniciais da mancha manteigosa ocorrem em folhas novas, com o aparecimento de mancha de cor verde-clara, de aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. Em estágios avançados, as manchas apresentam coloração verde-pálida a amarela e bordas irregulares. Por fim, as manchas coalescem, determinando queda prematura das folhas (WELLMAN, 1957). Ataques intensos são observados em folhas e ramos novos em plantas adultas, ocorrendo necrose e seca de ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente. Ferreira et al. (2009) verificou que a maior incidência do patógeno é durante a estação quente e chuvosa, quando há intensas brotações nas plantas.

Nos últimos anos, a mancha manteigosa vem ganhando destaque no Brasil, pois observações em campo têm mostrado o seu agravamento, principalmente quando o fungo ataca as flores e frutos em expansão. As plantas doentes não conseguem produzir frutos, mesmo com boa brotação e, na medida em que começam a desenvolver os frutos “chumbinhos”, esses mumificam e caem no solo, podendo chegar a perdas totais de produção (FERREIRA, 2006). Atualmente, a doença ocorre de forma efetiva nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo, Rondônia e Amazonas, tanto em *Coffea arabica* quanto em *Coffea caneforae* em grande parte das cultivares comerciais disponíveis no mercado (FERREIRA, 2004).

A transmissão da doença não está totalmente elucidada, porém trabalhos feitos por Vargas e Gonzalez (1972) e Miranda (2003) mostraram que a transmissão é feita via sementes oriundas de plantas enfermas e só é expressa mediante a um estresse fisiológico sofrido pela planta.

De acordo com estudos feitos por Ferreira et al. (2009), a doença se dispõe na lavoura em focos unitários e aleatórios, o que vem corroborar com os

estudos que apontam as sementes, oriundas de plantas enfermas, como a principal via de transmissibilidade da doença. Ferreira (2004) observou sintomas típicos da doença em plântulas, oriundas de sementes de plantas enfermas no campo, evidenciando que a doença só ocorre em condições especiais de suscetibilidade, sendo essas genéticas e/ou ambientais.

Desde a primeira descrição da doença, feita por Wellman em 1957, tem sido recomendada como medida de controle a erradicação de todas as plantas doentes. Porém, relatos da doença surgiram (VARGAS; GONSALEZ, 1972) e atualmente existem casos nos principais estados produtores de café do Brasil. Diante desse fato, novos métodos estão sendo testados para o combate da doença.

Dorizzotto e Abreu (1993) realizaram teste de patogenicidade com isolados de *Colletotrichum* spp., inoculados em plântulas de café dos genótipos Sarchimor e Catimor. Os resultados mostraram que ambos os genótipos tiveram reação de susceptibilidade e os isolados patogênicos foram associados ao agente causal da mancha manteigosa.

Com o intuito de avaliar a patogenicidade em plântulas e em frutos verdes de café, Nechet e Abreu (2002) inocularam oito isolados de *Colletotrichum* spp. em plântulas e em frutos. Ossintomas de infecção nas plântulas e nos frutos verdes de café foram observados a partir dos 10 dias após inoculação, obtendo-se infecção máxima de 51,27% aos 30 dias. Embora esses isolados tenham sido patogênicos às plantas de café, eles não acarretaram a morte das mesmas.

No teste de patogenicidade, realizado por Miranda(2003), foram utilizados 10 isolados de *C. gloeosporioides*. Observou-se a patogenicidade desses isolados nas duas cultivares inoculadas, Catuai Vermelho e Catuai Amarelo. Ainda, segundo o autor, isolados que ocasionam sintomas da mancha

manteigosa em cafeeiros causam lesões necróticas similares àquelas que ocasionam a Coffea Berry Disease (CBD).

Santos Neto (2012) realizou teste de patogenicidade em oito cultivares de *Coffea arabica*, Paraíso MG H419-1, Catiguá MG-2, Oeiras MG-6851, Sacramento MG-1, Pau Brasil MG-1, Araponga MG1, Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 376\4, inoculadas com suspensões de esporos a uma concentração de 2×10^6 , de um único isolado de *Colletotrichum* spp., no segundo par de folhas verdadeiras. Todas as cultivares avaliadas foram classificadas como suscetíveis, apresentando manchas irregulares de coloração castanho a castanho acinzentado.

Recentemente, em estudos realizados pela University of Hawaii, foram identificadas plantas de café com lesões muito semelhantes àquelas encontradas em plantas atacadas pela mancha manteigosa. Tais estudos detectaram também um *Enamovirus*, raro em lesões semelhantes àquelas típicas da mancha manteigosa, sendo necessários mais estudos para que se estabeleça o real papel de cada organismo (UNIVERSITY OF HAWAII, 2014).

2.3 *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum é um dos principais gêneros de fungos fitopatogênicos em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (BAILEY et al., 1992). O primeiro relato de ocorrência de *Colletotrichum* em cafeeiro no Brasil foi feito por Noak (1902) que denominou o isolado de *Colletotrichum coffeanum*. O patógeno foi descrito com base em manchas existentes nas folhas em associação ou não com cercóspora, em ramos de cafeeiros nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Acérvulos foram encontrados em manchas salientes nas pontas dos ramos secos e em ramos vegetativos.

Comumente encontrado em sua forma anamórfica, também, pode ser encontrado em sua forma telomórfica, denominada de *Glomerella cingulata*. O *Colletotrichum* spp. se reproduz de forma assexual, produzindo conídios unicelulares, formando massas de cor salmão (SUTTON et al., 1992). O micélio é geralmente aéreo, com aspecto cotonoso e coloração bastante variada, de branco a cinza-escuro (ANDRADE et al., 2007). Em decorrência da germinação, um conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos, que, por sua vez, podem formar apressórios em suas extremidades, estrutura importante no processo de infecção da planta.

No trabalho desenvolvido por Miranda (2003), foi confirmado, por meio de caracterização morfológica e por marcadores moleculares RAPD e SSR, que o agente etiológico da mancha manteigosa é o fungo filamentosso *Colletotrichum gloeosporioides*. Porém, não há um consenso sobre a taxonomia da espécie; muitos autores acreditam que o que hoje é denominado de *C. gloeosporioides* é, na verdade, um complexo de espécies aparentadas (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Antes do advento dos estudos que possibilitaram dados de sequenciamento do DNA, os conceitos taxonômicos de *Colletotrichum* eram baseados em características tais como espécie hospedeira, substrato, tamanho e forma do conídio, forma dos apressórios, taxa de crescimento, cor da colônia, entre outras. Entretanto, essas características sofrem alterações, quando se modificam, por exemplo, as condições de crescimento do fungo não conferindo confiabilidade e repetibilidade aos dados (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Porém, dados moleculares também têm apresentado inconsistência, isto é, mais de 86% das sequências ITS designadas como *C. gloeosporioides* no GenBank não pertencem à mesma espécie que o ecótipo (CAI; HYDE; TAYLOR, 2009; HYDE et al., 2009).

Em um levantamento feito por Weir, Johnston e Damm (2012) acerca do complexo *C. gloeosporioides*, foram analisados 156 isolados, oriundos de vários países e de diversos hospedeiros, considerando-os representativos para o complexo em questão. Após análises morfológicas em associação a dados moleculares, obtidos a partir de regiões ITS e de mais oito genes nucleares, entre eles os genes da calmodulina, quitina-sintase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, glutamina sintetase, β -tubulina, entre outros, a população analisada foi classificada em 22 espécies e uma subespécie, demonstrando, assim, a grande variabilidade presente no complexo *C. gloeosporioides*.

Desta forma, somente dados de sequências de vários genes combinados com a identificação morfológica tradicional poderá fornecer informações confiáveis quanto à identificação de espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides* (PHOULIVONG et al., 2010).

2.4 Caracterização do fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*

A fim de identificar de forma correta e obter informações acerca da variabilidade presente dentro da espécie *C. gloeosporioides*, vários autores se dispuseram a caracterizar, em vários aspectos, o fungo em questão. Dias (2002) realizou estudos, utilizando isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro, referentes à temperatura ótima para a produção de conídios e mostrou que, apesar da alta variabilidade, as temperaturas ficaram entre 23°C e 25°C. Resultado semelhante foi encontrado por Pandey, Yadava e Manoharan (2012), em isolados de *C. gloeosporioides*, oriundos de lesões em manga (*Mangifera indica* L.).

Dias (2002) constatou que a temperatura entre 22°C a 35°C proporcionou a máxima germinação. A grande variabilidade na temperatura ótima para o crescimento micelial, a capacidade de esporulação e germinação

conidial pode estar relacionada com a alta capacidade de adaptação climática de diferentes genótipos, sugerindo a existência de ecótipos de *C. gloeosporioides* (ESTRADA; DOOD; JEFFRIES, 2000).

Quanto à germinação conidial, Nechet e Ferreira (1999) avaliou diferentes meios de cultura com diferentes isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos da mancha manteigosa do cafeeiro e concluiu que o meio batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%) conferiu maior crescimento micelial ao fungo seguido pelo meio malte-ágar2% (MEA2%), mesmo resultado encontrado por Lopez e Lucas (2010) em isolados oriundos do cajueiro. Porém, Pandey, Yadava e Manoharan(2012) avaliou isolados de *C. gloeosporioides*, a partir de lesões de manga e observou maior taxa de crescimento micelial em meio MEA 2%.

A coloração apresentada pela colônia é um fator importante para a correta identificação da espécie. Dias (2002) caracterizou nove isolados de *C. gloeosporioides*, oriundos da mancha manteigosa do cafeeiro, quanto à coloração da colônia, observando colônias brancas, cinza clara, cinza escuro e verde oliváceo. Mafacioli et al. (2006), também, avaliou a coloração da colônia de isolados de *C. gloeosporioides*, oriundos da pupunheira e observou colônias brancas, brancas acinzentadas, cinza e cinza escuro.

Feitosa (1977) caracterizou a dimensão dos conídios, produzidos por isolados de *Colletotrichum* spp., provenientes do cafeeiro e observou grande variação no comprimento, com extremos de 10,53 a 20,20 μm e largura oscilando de 4,08 a 7,41 μm . Dias (2002) observou conídios variando em comprimento de 7,3 a 17,15 μm , e em largura de 2,4 a 4,9 μm . Esses resultados são semelhantes aos relatados na literatura, em isolados oriundos do mamoeiro, cajueiro, pupunheira, *Stylosanthes* spp. e citros (ANDRADE et al., 2007; LOPEZ; LUCAS, 2010; MAFACIOLI et al., 2006; MUNAUT; HAMAIDE; MARAITE, 2001; PHOULIVONG et al., 2010).

A formação de apressórios em conídios de *C. gloeosporioides* tem grande importância na entrada do patógeno no hospedeiro, visto que ele é responsável pela adesão, penetração e sobrevivência do conídio (FERREIRA et al., 2009). Desse modo, o tamanho e forma dos apressórios se tornam importantes para a caracterização de isolados da espécie. Andrade et al. (2007) observou em estudos com *C. gloeosporioides* isolado a partir de lesões de mamoeiro, apressórios variando de 8,09 a 14,38 μm de comprimento e 5,78 a 8,68 μm de largura e formato lobado e circular. Lopez e Lucas (2010) observou resultados semelhantes, assim como Mafacioli et al. (2006) e Phoulivong et al. (2010).

Outra característica importante, para a caracterização de isolados, é o seu crescimento em meio de cultura. Dias (2002), caracterizando isolados oriundos de lesões no cafeeiro, verificou valores de IVCN de 17,6 a 22,4 mm/dia, também, classificando-os como de crescimento rápido. Andrade et al. (2007) avaliou o Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em meio Batata-dextrose-ágar (BDA) para 33 isolados de *Colletotrichum* spp. patogênicos ao mamoeiro, caracterizando-os como de crescimento rápido com valores de IVCN oscilando de 5,84 a 13,16 mm/dia. Rocha, Oliveira e Menezes (1998), utilizando isolados de *Colletotrichum* spp. patogênicos ao maracujazeiro, Lopez e Lucas (2010) e Mafacioli et al. (2006) encontraram resultados semelhantes.

A porcentagem de conídios germinados para nove isolados de *C. gloeosporioides* variou de 70,90 a 99,14% de conídios germinados e foi observado também que a porcentagem de esporulação variou de 0,13 a 13,44%, segundo Dias (2002). A presença da fase teleomórfica, *Glomerella cingulata*, foi observada em pelo menos um dos isolados avaliados nos trabalhos de Andrade et al. (2007), Dias (2002), Lopez e Lucas (2010) e Mafacioli (2006).

A ampliação da variabilidade genética, dentro de uma espécie patogênica à determinada cultura, é um fator importante a ser estudado, visto que quanto maior a variabilidade encontrada na espécie do patógeno, mais difícil será o controle da doença por meio de genótipos resistentes e mais rápido novos alelos de genes de resistência podem ser quebrados. Dessa forma, o estudo acerca desse fenômeno se faz necessário, bem como informações sobre os mecanismos que geram variabilidade no patógeno. Neste contexto, a formação de um tipo de hifa especializada denominada de tubos de anastomose entre conídios (*Conidial Anastomosis Tubes* - CAT's) tem sido descrita com um mecanismo potencial de recombinação assexuada e transferência de genes (ISHIKAWA et al., 2010; ISHIKAWA et al., 2012; MEHRABI et al., 2011; ROCA et al., 2004)

Em trabalho realizado por Roca et al. (2004), por meio de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, foi observada a transferência de mitocôndrias e vacúolos entre conídios de *C. lindemuthianum*. Ishikawa et al. (2010), trabalhando com *C. lindemuthianum*, oriundo de lesões da antracnose do feijoeiro, observou por meio de microscopia de fluorescência, utilizando isolados transformados com GFP (Green fluorescent protein), a transferência de material genético entre conídios, por meio dos CAT's, evidenciando, assim, o potencial de tal estrutura para a transferência horizontal de genes. No mesmo trabalho, Ishikawa et al. (2010) constatou que 26% dos conídios formaram CAT's. Já Pinto et al. (2012), avaliando populações de linhagens de *C. lindemuthianum* e Barcelos et al. (2014) de *Glomerella* spp., ambas isoladas de lesões de antracnose do feijoeiro, encontraram linhagens com até 60 e 78,5% de CAT's, respectivamente. Araujo e Stadnik (2013), utilizando isolados de *C. gloeosporioides*, oriundos da mancha foliar de glomerela da macieira, observou a formação de CAT's de 1,5 a 8,2%, concluindo que tal variação é afetada pelo genótipo do fungo.

Outro mecanismo de recombinação assexual em fungos é o ciclo parassexual, descrito pela primeira vez por Pontecorvo e Roper (1953). Para a ocorrência deste processo entre linhagens diferentes do fungo, é necessário que as mesmas apresentem compatibilidade micelial (LESLIE et al., 1993).

Ishikawa, Souza e Davide (2008), avaliando reações de compatibilidade micelial entre isolados de *C. lindemuthianum*, oriundos de lesões da antracnose do feijoeiro, observou alta compatibilidade entre os isolados, com valores variando de 38,5% a 100%, indicando que o ciclo parassexual pode ocorrer nessa espécie. Mota (2013), avaliando compatibilidade micelial de isolados de *C. lindemuthianum*, oriundos do feijoeiro, observou valores variando de 0 a 31,82%.

2.5 Interações *C. gloeosporioides* e o cafeeiro

Segundo Lins, Abreu e Alves (2007), conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* se aderem a depressões das células da epiderme e das células-guardas dos estômatos da folha do cafeeiro. Ferreira et al. (2009) constatou que três horas após a inoculação de conídios na superfície da folha do cafeeiro, ocorreu o intumescimento dos conídios e a formação de septo. Também foi observado acúmulo de material extracelular e de mucilagem, que tem papel importante na adesão dos conídios sobre a folha, no controle da germinação, na aderência de tubos germinativos e formação de apressórios (BERGSTROM; NICHOLSON, 1981). No mesmo trabalho foi demonstrada que a penetração das hifas ocorre, geralmente, de forma direta sendo observada a degradação da cutícula no ponto de aderência do apressório. Porém, também, foi constatada a penetração de hifas sem apressórios pelos estômatos da folha do cafeeiro, demonstrando que a formação de apressório nem sempre é determinante para o processo de infecção no patossistema em questão.

Pereira et al. (2009), também, observou a infecção de isolados de *C. gloeosporioides* pelo hipocótilo de plântulas de *Coffea arabica*. Neste estudo, foi comparada a infecção em hipocótilos com ferimento e sem ferimento, sendo constatada maior atividade no que se refere à germinação e produção de apressórios, em hipocótilos com ferimentos, o que pode ser explicado pela presença de substâncias exsudadas pela planta em torno dos ferimentos que, segundo Skipp (1995), juntamente com nutrientes, aumentam o índice de germinação.

A colonização do patógeno no hospedeiro se dá de forma sistêmica e em todas as direções, ocorrendo hifas nos tecidos do floema, xilema, córtex e em células do endosperma, ocasionando a morte de ramos, mumificação dos frutos e queda das folhas. Também foram observadas hifas colonizando os tecidos dos frutos, como o exocarpo, epiderme e mesocarpo (PEREIRA et al., 2009).

2.6 Marcadores IRAP E REMAP

Os marcadores IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) e REMAP (Retrotransposon- Microsatellite Amplified Polymorphism) surgiram em 1999 com Kalendar. Estes marcadores apresentam ampla aplicabilidade, pois são abundantes no genoma, possuem alta repetibilidade, especificidade dos locos e usam baixa quantidade de DNA, porém apresentam nível médio de polimorfismo (KALENDAR; SHULMAN, 2006).

Baseados em retrotransposons, esses marcadores têm como princípio a amplificação de sequências de DNA, localizadas em regiões do genoma entre dois retrotransposons, no caso do IRAP e entre um retrotransposon e um microsatélite no caso do REMAP.

Os marcadores IRAP e REMAP podem ser empregados em estudos acerca de diversidade e variabilidade intra e interespecies, além de possuir várias

vantagens tais como a alta repetibilidade, pois são envolvidos *primers* específicos, baixo custo quando se compara com outras técnicas e geram um grande número de marcas polimórficas (SANTANA et al.,2013).

Santos et al. (2012) foram os primeiros a aplicar os marcadores IRAP e REMAP no gênero *Colletotrichum*, utilizando 54 isolados da espécie *C. lindemuthianum* pertencentes a 24 raças patogênicas distintas. Combinando os locos amplificados pelo IRAP e REMAP, foram amplificados 45 locos sendo 62% polimórficos, diferenciando até mesmo isolados que apresentavam perfis idênticos de virulência. Mota (2013), utilizando o marcador IRAP, em uma população de 22 linhagens de fungos do gênero *Colletotrichum*, obteve 49 bandas polimórficas diferenciando-os em 14 grupos distintos, mostrando, assim, a grande aplicabilidade da técnica para o gênero em questão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Resistência a Doenças de Plantas, no Laboratório de Genética Molecular, em casa de vegetação e em câmara de nebulização, situados no Departamento de Biologia e no Laboratório de Microscopia Eletrônica no Departamento de Fitopatologia, todos na Universidade Federal de Lavras.

3.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados foram obtidos a partir de lesões nas folhas de cafeeiro das cultivares Catuaí e Topázio, coletadas no município de Lavras, MG. As lesões foram cortadas e desinfestadas em álcool 70% por dois minutos, em hipoclorito 1% por dois minutos e, posteriormente, lavadas em água estéril durante dois minutos. Os cortes foram depositados em placas de Petri com meio de cultivo MEA 2% e acondicionados em BOD a 22 °C no escuro. Após 10 dias, as culturas monospóricas foram obtidas a partir das colônias com esporulação.

3.2 Teste de Patogenicidade

Para o teste de patogenicidade, foram realizados dois experimentos que diferiram quanto à metodologia de inoculação, descritas a seguir.

3.2.1 Inoculação com suspensão de esporos de *Colletotrichum* spp.

O teste de patogenicidade foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x2, com duas repetições, onde quatro isolados (UFLA 1, UFLA 36, UFLA 86 e UFLA 5) foram inoculados em duas

cultivares, Topázio e Mundo Novo. Suspensões de esporos foram obtidas, após raspagem das placas e a concentração da solução foi ajustada a 2×10^6 com auxílio da câmara de Newbauer. As inoculações foram feitas borrifando-se a suspensão de esporos na face abaxial da folha, em mudas que apresentavam três pares de folhas verdadeiras onde, anteriormente, foram feitos ferimentos utilizando-se agulhas entomológicas. As avaliações foram realizadas 20 e 30 dias após as inoculações.

3.2.2 Inoculação com micélio de *Colletotrichum* spp.

No teste de patogenicidade utilizando-se micélio como inoculo, palitos autoclavados foram colocados sobre o meio de cultura Malte-ágar 2%, contendo colônias dos isolados: UFLA 1, UFLA 36, UFLA 86 e UFLA 5 de *Colletotrichum* spp.. Após os palitos estarem totalmente tomados pelo micélio, estes foram introduzidos no hipocótilo de mudas que apresentavam três pares de folhas verdadeiras. As avaliações foram realizadas 20 e 30 dias após a inoculação. O experimento foi conduzido em DIC no esquema fatorial 4x2 com duas repetições, onde foram inoculados os quatro isolados em mudas de café das cultivares Topázio e Mundo Novo de *Coffea arabica*.

3.3 Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp.

A caracterização fisiológica foi realizada, por meio do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial. Já a caracterização citológica foi feita avaliando-se a dimensão dos conídios, formação de septo em conídios germinados, porcentagem de conídios germinados, formação de tubos de anastomose entre conídios e formação de

apressórios. A caracterização morfológica foi feita por meio da avaliação do tipo de colônia formada pelos isolados.

3.3.1 Caracterização fisiológica

Para a avaliação do IVCM e do diâmetro colonial, foi conduzido um experimento em DIC com duas repetições, utilizando 87 isolados de *Colletotrichum* spp. oriundo de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro. Cada tratamento foi representado por um isolado e a parcela constituída por uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro.

O IVCM foi avaliado, por meio da leitura das medidas, em milímetros, entre os diâmetros ortogonais das colônias, em intervalos de 24 horas, durante oito dias. As médias foram estimadas de acordo com a expressão adaptada de Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum(D - D_a)}{N}$$

em que:

IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial.

D = Diâmetro médio atual da colônia.

Da = Diâmetro médio da colônia na avaliação anterior.

N = Número de dias após o início do experimento

O diâmetro colonial foi determinado medindo-se o diâmetro das colônias, em milímetros, após oito dias de incubação.

3.3.2 Caracterização citológica dos esporos

Para as avaliações citológicas, foram utilizados 34 isolados de *Colletotrichum* spp oriundos de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro. As avaliações foram feitas para as seguintes características: comprimento e largura dos conídios, porcentagem de conídios germinados, formação de septo em conídios germinados, porcentagem de apressórios formados e porcentagem de tubos de anastomose entre conídios (CAT's).

Para isso, suspensões de conídios na concentração $1,2 \times 10^6$ esporos/ml foram obtidas a partir de placas contendo meio MEA 2%, após 15 dias de incubação. Foram adicionados 200 μ L das suspensões de esporos em células de lâminas de cultivo e incubadas a 22°C, no escuro, por 24 horas. As amostras foram avaliadas, após a adição do corante calcofluor, na concentração de 0,12 M. As imagens foram obtidas por meio do microscópio de epifluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1). A fluorescência foi detectada a 420/70 nm, utilizando a objetiva de 40x. As imagens obtidas foram capturadas por meio do software Axiovision Zeiss.

Para as medições citológicas, foi conduzido um experimento em DIC, com 30 repetições por isolado, de modo que cada repetição foi um esporo. A largura e o comprimento dos esporos, em micrômetros, foram mensurados utilizando o software Image Tool 3.0.

A presença de septo em conídios germinados, porcentagem de apressórios formados e de anastomose entre conídios foram quantificadas, 48 horas após a incubação, observando-se 200 esporos por repetição, sendo utilizadas duas repetições.

Para a avaliação da porcentagem de conídios germinados, um experimento em DIC foi conduzido em esquema de parcela subdividida no

tempo, com duas repetições. As avaliações foram feitas em 24 e 48 horas, sendo analisados 200 esporos em duas repetições.

3.3.3 Compatibilidade micelial de isolados de *Colletotrichum* spp

O teste de compatibilidade foi realizado confrontando-se os isolados dois a dois, sendo utilizados 45 isolados de *Colletotrichum* spp oriundos de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro. Discos miceliais de 5 mm de diâmetro, de cada isolado, foram pareados em placas de Petri, contendo meio BDA e incubados, no escuro, a 22 °C. As avaliações foram realizadas após 15 dias de incubação. A compatibilidade micelial foi determinada quando houve mistura uniforme dos micélios dos dois isolados.

3.3.4 Caracterização morfológica das colônias

Para a caracterização morfológica das colônias, 86 isolados de *Colletotrichum* spp, oriundo de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro, com 15 dias, foram analisados em meio BDA, avaliando-se a produção de esporos (ascósporos e/ou conídios). Os isolados foram classificados como conidiais quando apresentarem produção de conídios, e periteciais quando apresentarem produção de peritécio e ascósporos.

3.4 Caracterização molecular

Para caracterização molecular, 32 isolados de *Colletotrichum* spp, oriundo de lesões da mancha manteigosa do cafeeiro, foram cultivados em meio líquido glicose-levedura-ágar (GLA) e incubados em agitador a 110 rpm com temperatura de 22 °C, durante sete dias. A partir do micélio obtido, foi feita a

extração do DNA, utilizando o kitPromega® Wizard Genomic DNA Purification.

A caracterização molecular foi realizada, por meio do marcador IRAP, que é baseado em iniciadores concebidos a partir de regiões conservadas TDR (Sequências repetidas terminais diretas) do RetroCl (Retroelemento *Colletotrichum lindemuthianum* 1). As reações do marcador IRAP foram feitas baseados nos primers CIIRAP1, CIIRAP2 e CIIRAP4 nas combinações CIIRAP1 e CIIRAP4 e CIIRAP2 e CIIRAP4 (Tabela 1)

Tabela 1 Sequências dos *primers* dos marcadores IRAP

Técnica	Identificação	Sequência
IRAP	CIIRAP2	5'AATAACGTCTCGGCCTTCAG 3'
	CIIRAP4	5'CTTTTGACGAGGCCATGC 3'
	CIIRAP1	5'CGTACGGAACACGCTACAGA 3'

Fonte: (SANTANA et al., 2013).

Para as análises do IRAP, as bandas amplificadas pelos primers foram identificadas visualmente e identificadas como 1 (presença de banda) e 0 (ausência de banda) para cada isolado. As estimativas de similaridade genética (sg_{ij}) entre os isolados foram efetuadas pelo coeficiente de Dice (1945) usando o programa NTSYS – pc 2.1 (ROHLF, 2000). A matriz de similaridade foi empregada para construir o dendograma e a análise de agrupamento foi realizada pelo método da média das similaridades (UPGMA). Os isolados pertencentes a diferentes grupos foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor máximo significativo de similaridade (sgm). O sgm (linha de corte) foi estimado, por meio do teste de t, utilizando-se a expressão $sgm = 1 - (t \times sgs)$, em que t é o valor tabelado da distribuição de t de Student, a 1% de probabilidade,

com $n-2$ graus de liberdade e o sgs é o erro médio das comparações consideradas (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

3.5 Análises estatísticas

Os dados das características fisiológicas, citológicas e morfológicas foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software Rstudio (RSTUDIO, 2012).

4 RESULTADOS

4.1 Teste de Patogenicidade

Nos dois experimentos todos os isolados utilizados não foram patogênicos para ambas as cultivares.

4.2 Caracterização fisiológica

Na análise de variância para o IVCM e para o diâmetro colonial, houve diferença significativa entre os isolados avaliados e as médias formaram quatro grupos distintos para ambos os caracteres (Tabela 2). As estimativas variaram de 5,28 (UFLA 41) a 10,78 mm/dia (UFLA 78) e de 46 (UFLA 41) a 80 mm (UFLA 78) para o IVCM e o diâmetro colonial, respectivamente.

Tabela 2 Estimativas de médias para o IVCM (mm/dia) e diâmetro colonial (mm), 8 dias após a incubação dos isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados

Isolado	IVCM	Diâmetro	Isolado	IVCM	Diâmetro
UFLA 78	10,78 A	80,00 A	UFLA 58	9,99 A	77,00 A
UFLA 38	10,42 A	80,00 A	UFLA 79	9,99 A	77,00 A
UFLA 39	10,42 A	80,00 A	UFLA 13	9,92 A	76,50 A
UFLA 43	10,42 A	80,00 A	UFLA 26	9,92 A	76,50 A
UFLA 44	10,42 A	80,00 A	UFLA 45	9,92 A	76,50 A
UFLA 48	10,42 A	80,00 A	UFLA 36	9,92 A	76,50 A
UFLA 51	10,42 A	80,00 A	UFLA 6	9,92 A	76,50 A
UFLA 52	10,42 A	80,00 A	UFLA 55	9,85 A	76,00 A
UFLA 53	10,42 A	80,00 A	UFLA 76	9,85 A	76,00 A
UFLA 60	10,42 A	80,00 A	UFLA 49	9,85 A	75,00 B
UFLA 68	10,42 A	80,00 A	UFLA 61	9,85 A	76,00 A
UFLA 73	10,42 A	80,00 A	UFLA 5	9,78 B	75,50 B
UFLA 74	10,42 A	80,00 A	UFLA 72	9,78 B	75,50 B
UFLA 75	10,42 A	79,00 A	UFLA 50	9,71 B	75,00 B

“Tabela 2, conclusão”

Isolado	IVCM	Diâmetro	Isolado	IVCM	Diâmetro
UFLA 77	10,42 A	80,00 A	UFLA 1	9,71 B	75,00 B
UFLA 81	10,42 A	80,00 A	UFLA 9	9,71 B	75,00 B
UFLA 82	10,42 A	80,00 A	UFLA 19	9,68 B	77,50 A
UFLA 8	10,42 A	80,00 A	UFLA 71	9,64 B	74,50 B
UFLA 96	10,42 A	80,00 A	UFLA 33	9,57 B	74,00 B
UFLA 25	10,42 A	80,00 A	UFLA 46	9,57 B	74,00 B
UFLA 14	10,42 A	80,00 A	UFLA 24	9,56 B	79,00 A
UFLA 7	10,42 A	80,00 A	UFLA 23	9,50 B	79,00 A
UFLA 2	10,42 A	80,00 A	UFLA 15	9,50 B	77,50 A
UFLA 86	10,42 A	80,00 A	UFLA 20	9,43 B	79,50 A
UFLA 17	10,42 A	80,00 A	UFLA 80	9,42 B	73,00 B
UFLA 28	10,42 A	80,00 A	UFLA 4	9,31 B	73,50 B
UFLA 27	10,42 A	80,00 A	UFLA 54	9,28 B	72,00 B
UFLA 11	10,42 A	80,00 A	UFLA 63	9,28 B	72,00 B
UFLA 3	10,42 A	80,00 A	UFLA 65	9,21 B	71,50 B
UFLA 62	10,35 A	79,50 A	UFLA 34	9,18 B	76,50 A
UFLA 57	10,35 A	80,00 A	UFLA 64	9,14 B	71,00 B
UFLA 37	10,35 A	79,50 A	UFLA 85	9,12 B	78,00 A
UFLA 59	10,28 A	79,50 A	UFLA 66	8,99 B	70,00 B
UFLA 32	10,28 A	79,00 A	UFLA 30	8,93 B	76,50 A
UFLA 16	10,28 A	79,00 A	UFLA 35	8,87 B	76,00 A
UFLA 70	10,21 A	78,50 A	UFLA 67	8,71 B	68,00 B
UFLA 31	10,21 A	78,50 A	UFLA 83	8,57 B	67,00 B
UFLA 47	10,14 A	78,00 A	UFLA 84	8,37 B	71,00 B
UFLA 69	10,07 A	77,50 A	UFLA 42	7,21 C	57,50 C
UFLA 29	10,07 A	77,50 A	UFLA 56	6,85 C	55,00 C
UFLA 97	10,07 A	77,50 A	UFLA 40	6,28 D	51,00 D
UFLA 12	10,07 A	77,50 A	UFLA 41	5,28 D	46,00 D
UFLA 22	10,07 A	77,50 A			

*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, estão agrupadas na mesma classe, de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

4.3 Caracterização citológica dos esporos

Na análise citológica dos esporos houve diferença significativa entre os isolados avaliados para todas as características (Tabela 3). Para o comprimento dos conídios, os isolados formaram nove grupos e as estimativas das médias

variaram de 14,00 (UFLA 87) a 19,46 μm (UFLA 24). Para a largura dos conídios, os isolados foram agrupados em sete classes e as estimativas variaram de 3,75 μm (UFLA 87) a 5,28 μm (UFLA 52).

Tabela 3 Estimativas das médias do comprimento e largura (μm) dos conídios, porcentagem de conídios germinados nos tempos de 24 e 48 horas, porcentagem de tubos de anastomose entre conídios (CAT's) e porcentagem de conídios germinados com apressórios formados dos isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados

Isolado	Dimensão dos conídios		% Germinação		%CAT's	%Apressórios
	Comprimento	Largura	24 horas	48 horas		
UFLA 24	19,46 A	4,67 E	10,00 C	06,00 D	-	09,50 B
UFLA 49	18,50 B	4,54 E	13,50 C	17,00 C	01,00 B	16,00 A
UFLA 54	17,52 C	4,98 C	22,00 A	36,00 A	01,50 B	02,50 D
UFLA 5	16,72 D	5,18 A	06,50 D	07,50 D	02,50 B	07,50 C
UFLA 92	16,11 E	4,83 C	01,50 D	02,00 D	-	01,50 D
UFLA 72	16,09 E	4,16 E	16,00 B	16,00 C	08,00 A	15,00 A
UFLA 50	15,86 E	5,01 B	12,00 C	14,50 C	01,00 B	16,00 A
UFLA 52	15,77 E	5,28 A	10,50 C	09,50 D	06,00 B	07,00 C
UFLA 27	15,64 E	4,89 C	03,00 D	03,50 D	01,00 B	02,00 D
UFLA 73	15,14 F	5,00 B	11,50 C	13,50 C	03,00 B	01,50 D
UFLA 51	15,19 F	4,82 C	27,50 A	30,50 B	01,50 B	10,00 B
UFLA 17	15,00 F	4,86 C	08,00 C	14,50 C	10,00 A	01,50 D
UFLA 39	14,94 F	5,21 A	11,00 C	11,50 C	16,00 A	07,50 C
UFLA 80	14,85 F	4,73 D	18,00 B	23,00 B	06,50 B	15,50 A

"Tabela 3, conclusão"

Isolado	Dimensão dos conídios		% Germinação		%CAT's	%Apressórios
	Comprimento	Largura	24 horas	48 horas		
UFLA 62	14,50 G	5,07 B	02,50 D	12,50 C	08,50 A	02,50 D
UFLA 68	14,45 G	4,48 C	05,50 D	06,00 D	01,50 B	04,00 D
UFLA 74	14,40 G	4,80 C	21,00 B	17,50 C	11,50 A	06,00 C
UFLA 9	14,36 G	5,03 B	04,00 D	06,00 D	03,50 B	03,50 D
UFLA 38	14,34 G	4,88 C	11,00 C	07,00 D	02,00 B	03,00 D
UFLA 57	14,29 G	4,90 C	10,00 C	33,00 A	12,50 A	07,50 C
UFLA 59	14,29 G	4,96 C	10,50 C	16,50 C	03,00 B	15,50 A
UFLA 70	14,25 G	4,95 C	14,50 B	20,50 C	04,00 B	09,50 B
UFLA 43	14,11 G	4,95 C	03,50 D	06,00 D	07,00 A	01,50 D
UFLA 48	14,05 H	4,86 C	12,00 C	18,50 C	00,50 B	05,00 C
UFLA 69	14,04 H	4,71 D	18,50 B	18,00 C	02,00 B	02,50 D
UFLA 53	14,04 H	4,91 C	01,50 D	13,50 C	14,00 A	01,00 D
UFLA 40	14,03 H	3,96 F	01,50 D	02,50 D	04,50 B	01,00 D
UFLA 44	14,03 H	4,89 C	23,50 A	33,50 A	04,00 B	17,00 A
UFLA 65	14,03 H	4,45 E	28,00 A	29,50 B	09,00 A	02,50 D
UFLA 42	14,03 H	4,99 C	01,50 D	02,00 D	-	01,00 D
UFLA 78	14,03 H	4,80 C	18,50 B	17,50 C	16,00 A	20,50 A
UFLA 87	14,00 I	3,74 G	02,50 D	02,00 D	01,50 B	02,50 D

*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste de Scott-Knott (P> 0,05).

Na avaliação da porcentagem de conídios germinados (Figura 3), a interação tempo x isolado foi significativa ($P < 0,05$), indicando que a germinação dos conídios dos isolados não foi coincidente nas avaliações de 24 e 48 horas. Dessa forma, as médias dos isolados foram comparadas separadamente nos dois tempos. No tempo de 24 horas, os isolados formaram quatro grupos (Tabela 3), com as estimativas das médias variando de 1,5% (UFLA 40, UFLA 42, UFLA 53 e UFLA 92) a 28% (UFLA 65). Para o tempo de 48 horas, os isolados também formaram quatro grupos (Tabela 3), variando as estimativas de 2% (UFLA 42, UFLA 87 e UFLA 92) a 38,5% (UFLA 66) de conídios germinados. Em todos os isolados, foi observada a presença de um, dois ou três septos em conídios germinados.

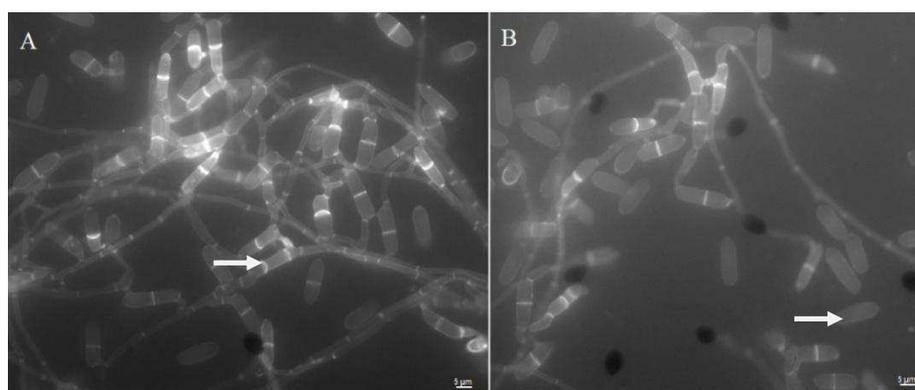


Figura 1 Conídios de isolados de *Colletotrichum* spp germinados. Microscopia de epifluorescência, corado com calcofluor. A: Conídios germinados com septos (isolado UFLA 65). B: Conídios germinados com septo formando apressórios (isolado UFLA 66)

Para a formação de CAT's (Figura 2), houve diferença significativa entre os isolados, que formaram dois grupos (Tabela 3). O isolado UFLA 48 apresentou apenas 0,5% de CAT's. Já isolados UFLA 39 e UFLA 78 apresentaram os maiores valores (16%) para a formação de CAT's. Três isolados

(UFLA 24, UFLA 92 e UFLA 42) não formaram CAT's, dessa forma não foram incluídos na análise estatística.

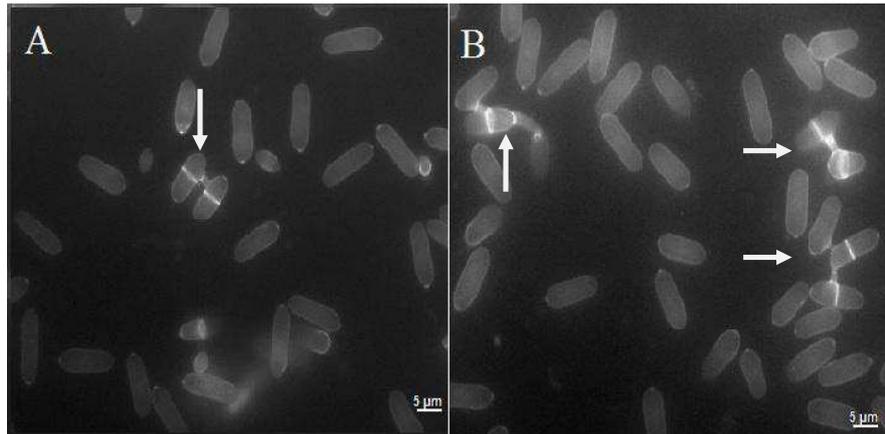


Figura 2 Conídios de *Colletotrichum* spp formando tubos de anastomoses. Microscopia de epifluorescência, corado com calcofluor. A: Isolado UFLA 51 formando CAT's. B: Isolado UFLA 78 formando uma cadeia de CAT's

Na análise da porcentagem de apressórios formados (Figura 3), houve diferença significativa entre os isolados, que foram agrupados em quatro classes (Tabela 3). As estimativas variaram de 1% (UFLA 42, UFLA 40, UFLA 60 e UFLA 53) a 20,5% (UFLA 78).

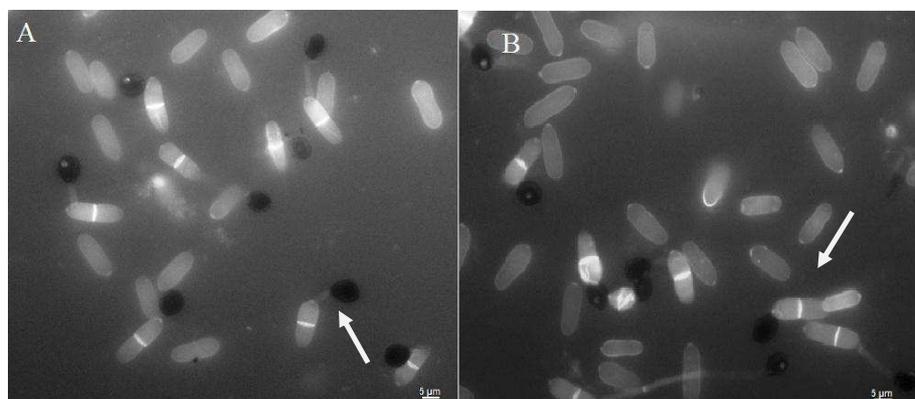


Figura 3 Conídios de *Colletotrichum* spp formando apressórios. Microscopia de epifluorescência, corado com calcorfluor. A: Isolado UFLA 78 formando apressórios em conídios germinados. B: Isolado UFLA 80, formando apressórios em conídios germinados com septo

4.4 Compatibilidade micelial de isolados de *Colletotrichum* spp.

Todos os isolados apresentaram compatibilidade com ao menos outros 13 isolados de *Colletotrichum* spp.. Um exemplo pode ser observado na figura 4. As estimativas de compatibilidade micelial variaram de 28,88% (UFLA 65 e UFLA 44) a 80% (UFLA 46) (Tabela 4).

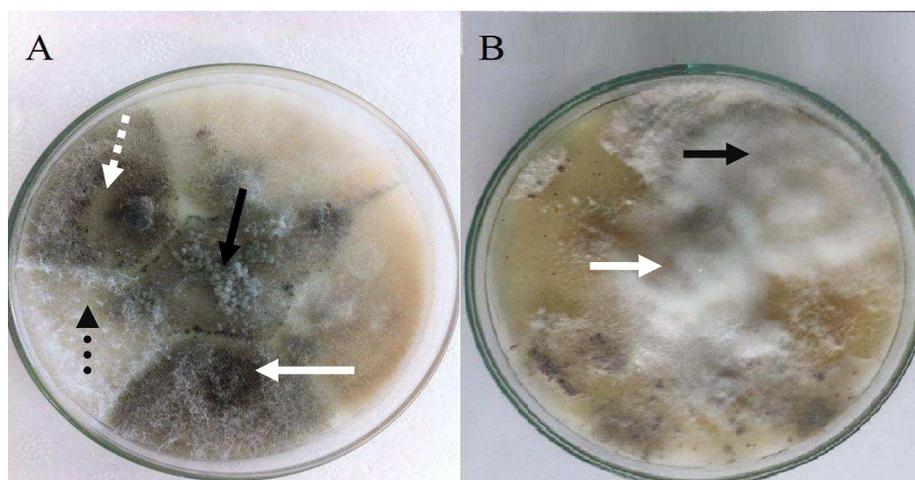


Figura 4 Placas do pareamento mostrando a compatibilidade micelial entre os isolados de *Colletotrichum* spp.. A: Isolado UFLA 49 (Seta preta) apresentando compatibilidade com os isolados UFLA 60 (Seta brancatracejada), UFLA 63 (Seta preta tracejada) e UFLA 70 (Seta branca). B: Isolado UFLA 46 (Seta branca) compatível com o isolado UFLA 51 (Seta preta)

Tabela 4 Porcentagem de compatibilidade (% Comp.) micelial entre os isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados

Isolado	% Comp.	Isolado	% Comp.	Isolado	% Comp.
UFLA 46	80,00	UFLA 72	55,55	UFLA 82	44,44
UFLA 75	75,55	UFLA 43	55,55	UFLA 40	44,44
UFLA 63	73,33	UFLA 64	55,55	UFLA 47	42,22
UFLA 55	71,11	UFLA 60	55,55	UFLA 66	42,22
UFLA 78	71,11	UFLA 79	53,33	UFLA 59	42,22
UFLA 71	66,66	UFLA51	53,33	UFLA 16	42,22
UFLA 53	66,66	UFLA 77	53,33	UFLA 48	40,00
UFLA 38	66,66	UFLA 27	53,33	UFLA 91	40,00
UFLA 39	62,22	UFLA 62	51,11	UFLA 61	40,00
UFLA 57	62,22	UFLA 81	48,88	UFLA 50	37,77
UFLA76	62,22	UFLA 67	48,88	UFLA 93	35,55
UFLA 68	60,00	UFLA 70	48,88	UFLA 45	31,11
UFLA 49	57,77	UFLA 80	46,66	UFLA 41	31,11
UFLA 32	57,77	UFLA 74	46,66	UFLA 65	28,88
UFLA 54	55,55	UFLA 95	46,66	UFLA 44	28,88

4.5 Caracterização morfológica das colônias

Na análise da caracterização morfológica, 58,13 % dos isolados foram classificados como conidiais e os demais 41,8% foram classificados como periteciais/conidiais (Tabela 5). Exemplos dos dois tipos de colônia podem ser observados na Figura 5.

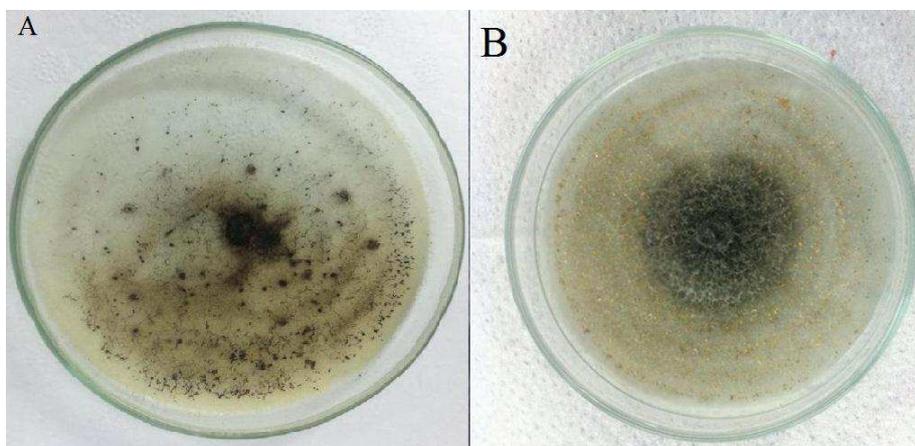


Figura 5 Isolados de *Colletotrichum* spp formando diferentes tipos de colônia. A: Isolado UFLA 41 formando colônia peritecial/conidial. B: Isolado UFLA 44 apresentando apenas formação de conídios

Tabela 5 Tipo de morfologia da colônia dos isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados

Isolado	Morfologia	Isolado	Morfologia
UFLA 1	Conidial/Peritecial	UFLA 45	Conidial
UFLA 2	Conidial/Peritecial	UFLA 46	Conidial/ Peritecial
UFLA 3	Conidial/Peritecial	UFLA 47	Conidial
UFLA 4	Conidial/Peritecial	UFLA 48	Conidial
UFLA 5	Conidial	UFLA 49	Conidial
UFLA 6	Conidial/Peritecial	UFLA 50	Conidial
UFLA 7	Conidial/Peritecial	UFLA 51	Conidial
UFLA 8	Conidial/Peritecial	UFLA 52	Conidial
UFLA 9	Conidial	UFLA 53	Conidial
UFLA 10	Conidial/Peritecial	UFLA 54	Conidial
UFLA 11	Conidial/Peritecial	UFLA 55	Conidial/ Peritecial
UFLA 12	Conidial/Peritecial	UFLA 56	Conidial/ Peritecial
UFLA 13	Conidial	UFLA 57	Conidial
UFLA 14	Conidial	UFLA 58	Conidial/ Peritecial
UFLA 15	Conidial	UFLA 59	Conidial
UFLA 16	Conidial/Peritecial	UFLA 60	Conidial
UFLA 17	Conidial	UFLA 61	Conidial/ Peritecial
UFLA 18	Conidial	UFLA 62	Conidial
UFLA 19	Conidial	UFLA 63	Conidial/ Peritecial
UFLA 20	Conidial	UFLA 64	Conidial
UFLA 21	Conidial	UFLA 65	Conidial
UFLA 22	Conidial	UFLA 66	Conidial
UFLA 23	Conidial	UFLA 67	Conidial/ Peritecial
UFLA 24	Conidial	UFLA 68	Conidial
UFLA 25	Conidial/Peritecial	UFLA 69	Conidial
UFLA 26	Conidial/Peritecial	UFLA 70	Conidial
UFLA 27	Conidial	UFLA 71	Conidial
UFLA 28	Conidial	UFLA 72	Conidial
UFLA 29	Conidial/Peritecial	UFLA 73	Conidial
UFLA 30	Conidial	UFLA 74	Conidial
UFLA 31	Conidial/Peritecial	UFLA 75	Conidial/ Peritecial
UFLA 32	Conidial/Peritecial	UFLA 76	Conidial
UFLA 33	Conidial/Peritecial	UFLA 77	Conidial/ Peritecial
UFLA 34	Conidial	UFLA 78	Conidial
UFLA 35	Conidial	UFLA 79	Conidial/ Peritecial
UFLA 36	Conidial/ Peritecial	UFLA 80	Conidial
UFLA 37	Conidial/ Peritecial	UFLA 81	Conidial/ Peritecial
UFLA 38	Conidial	UFLA 82	Conidial/ Peritecial
UFLA 39	Conidial	UFLA 83	Conidial/ Peritecial
UFLA 40	Conidial	UFLA 84	Conidial
UFLA 41	Conidial/ Peritecial	UFLA 85	Conidial/ Peritecial
UFLA 42	Conidial	UFLA 86	Conidial/ Peritecial
UFLA 43	Conidial		
UFLA 44	Conidial		

4.6 Caracterização molecular

Nas análises dos marcadores IRAP, foi amplificado um total de 17 bandas, 14 para a combinação CIIRAP1 e CIIRAP e três bandas para o par CIIRAP2 e CIIRAP4. Um exemplo do padrão de bandas geradas pode ser observado na Figura 6. Com base nas 17 bandas, foi feita uma matriz de similaridade genética e, em seguida, foi feito um dendrograma, para melhor visualização dos resultados. A linha de corte dada pela estimativa do máximo significativo de similaridade (sgm) foi de 0,44753. Pela análise do dendrograma, foi possível observar a formação de dois grupos estatisticamente diferentes (Figura 7).

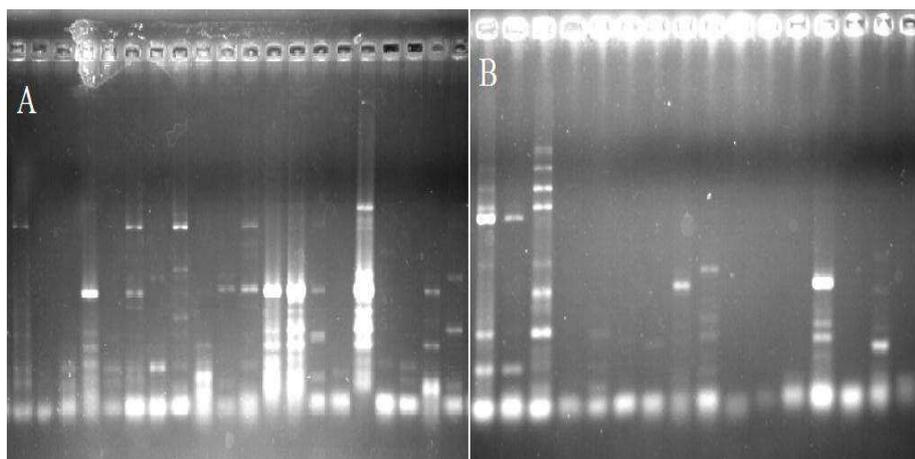


Figura 6 Perfil de bandas polimórficas para o par de *primers* IRAP1/IRAP4

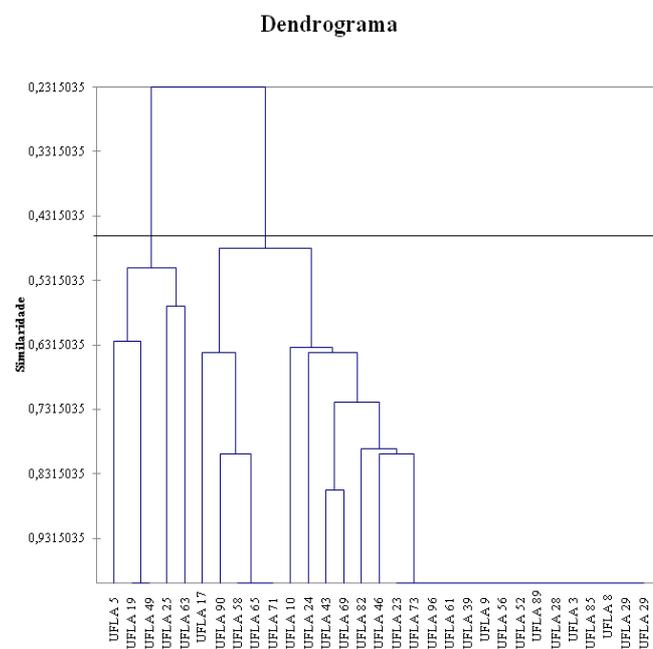


Figura 7 Dendrograma de similaridade genética usando marcadores IRAP para 32 isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, os isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de lesões de mancha manteigosa, não foram patogênicos ao cafeeiro. No entanto, há relatos na literatura de isolados denominados de *C. gloeosporioides*, também isolados de lesões de mancha manteigosa, que causaram sintomas quando inoculados em mudas de cafeeiro (DORIZZOTTO; ABREU, 1993; MIRANDA, 2003; NECHET; ABREU, 2002; SANTOS NETO, 2012). Os sintomas descritos nestes trabalhos foram de manchas irregulares de coloração castanho a castanho acinzentado. Estes sintomas são semelhantes aqueles produzidos por isolados de *Colletotrichum* spp. que causam a CBD no cafeeiro. É importante mencionar que, no primeiro relato de mancha manteigosa do cafeeiro, a doença foi atribuída a vírus (WELLMAN, 1957) e, recentemente, foram identificados sintomas muito semelhantes em cafeeiros no Havaí, cuja doença é causada por um enmovírus (UNIVERSITY OF HAWAII, 2014). Portanto, torna-se importante investigar e obter mais informações sobre o agente etiológico da mancha manteigosa do cafeeiro. Além disso, se isolados não patogênicos de *Colletotrichum* spp. habitam lesões de mancha manteigosa é importante investigar qual o papel dessa(s) espécie(s) no cafeeiro.

A amplitude de variação para os valores do IVC (5,57 a 10,78 mm/dia), no presente trabalho, foi semelhante às obtidas por Andrade et al. (2007) e Mafacioli et al. (2006) que avaliaram isolados de *C. gloeosporioides* de pupunheira e mamoeiro, respectivamente. No entanto, Dias (2002) observou valores acima de 17,6 mm/dia em isolados do cafeeiro. As diferenças observadas nos valores do IVC, obtidos nestes trabalhos, indicam a presença de variabilidade genética que pode estar presente entre isolados de uma mesma espécie e/ou de espécies diferentes no gênero *Colletotrichum*.

A presença de ampla variabilidade foi detectada para todas as características citológicas analisadas. Para o comprimento e largura dos conídios, as estimativas das médias foram semelhantes às encontradas por Dias (2002). As informações obtidas sobre a dimensão dos conídios associada às demais encontradas para os outros caracteres avaliados, poderão auxiliar em estudos futuros para identificar as espécies envolvidas no complexo *Colletotrichum* spp. do cafeeiro.

A porcentagem de conídios germinados dos isolados de *Colletotrichum* spp. foi inferior aos valores relatados na literatura (DIAS, 2002; BARCELOS et al., 2014; PINTO et al., 2012). No trabalho de Dias (2002), utilizando isolados de *C. gloeosporioides* do cafeeiro, verificaram-se 99% de conídios germinados em alguns isolados. Estes resultados evidenciam que, apesar da baixa porcentagem de germinação dos isolados avaliados, observou-se a presença de apressórios. A ausência de formação de estruturas de infecção, tais como de apressórios poderia justificar a falta de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados. No entanto, para o isolado UFLA 5 foi detectada a presença de apressórios (7,5%). Portanto, a ausência de patogenicidade pode ser em virtude da formação de apressórios defeituosos, o que afetaria o processo de pré-infecção e/ou a formação de hifas secundárias. Entretanto, Ferreira et al. (2009) tem constatado que a penetração das hifas ocorre, geralmente, de forma direta sendo observada a degradação da cutícula no ponto de aderência do apressório, mas também a penetração de hifas sem apressórios pelos estômatos da folha do cafeeiro. Diante do exposto, a elucidação dos fatores responsáveis pela falta de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. no cafeeiro requer análises dos processos de pré-infecção e colonização por meio de análises de microscopia.

A formação de CAT's tem sido sugerida como um mecanismo potencial de recombinação assexual e transferência de genes em fungos (BARCELOS et

al., 2014; ISHIKAWA et al., 2010; ISHIKAWA et al., 2010b; ISHIKAWA et al., 2012; MEHRABI et al., 2011; ROCA et al., 2004). No presente trabalho, 91,12% dos isolados avaliados formaram CAT's e os isolados UFLA 39 e UFLA 78 apresentaram 16% de conídios em fusão de CAT's. Todos os isolados avaliados para esta característica apresentaram colônias conidiais. Em linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* spp. isoladas do feijoeiro têm sido observada uma maior fusão de CAT's (BARCELOS et al., 2014; PINTO et al., 2012;). No entanto, Araújo e Stadnik (2013) verificaram uma porcentagem menor de CAT's em isolados de *C. gloeosporioides* oriundos da macieira. Estes resultados evidenciam que a presença de CAT's, em espécies do gênero *Colletotrichum* de diferentes espécies hospedeiras, é um fenômeno comum e é uma característica que apresenta ampla variabilidade.

A formação de apressórios é um evento importante no processo de infecção do patógeno, sendo essa estrutura responsável pela adesão, penetração e sobrevivência do conídio (FERREIRA et al., 2009). Neste trabalho, foram identificados isolados com até 20,5% de conídios formando apressórios, valores esses inferiores aos encontrados por Lopez e Lucas (2010), que observou isolados de *C. gloeosporioides*, patogênicos ao cajueiro, com até 80% dos conídios formando apressórios. Estes resultados sugerem que essa característica é muito influenciada pelo genótipo de cada isolado.

Outro mecanismo que pode gerar variabilidade é ciclo parassexual, o qual promove a recombinação assexua, tal processo é dependente da compatibilidade micelial entre os isolados (LESLIE et al., 1993). No presente trabalho, foram encontrados valores de compatibilidade micelial, variando de 28,88 a 80,00 %, estimativas essas que são semelhantes às encontradas por Ishikawa, Souza e Davide (2008), que, avaliando isolados de *C. lindemuthianum*, oriundos de lesões da antracnose do feijoeiro, observou valores variando de 38,5 a 100% de compatibilidade micelial. Vale ressaltar que, no

presente trabalho, foi utilizada uma grande população de isolados de *Colletotrichum* spp.. Dessa forma, a alta porcentagem de compatibilidade micelial encontrada entre os isolados é uma evidência de que o ciclo parassexual possa ocorrer nesta(s) espécie(s). No entanto, trabalhos visando avaliar grupos de compatibilidade vegetativa e a obtenção de recombinantes são necessários para a comprovação do ciclo parassexual nesta espécie.

Além da possibilidade de ocorrência de recombinação assexual, chama atenção que 41,8% dos isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram colônias conidiais/periteciais, indicando que nestes isolados ocorre o ciclo de vida completo, ou seja, são formados esporos assexuais e sexuais. Este fato evidencia o potencial desta população de isolados em gerar e ampliar a variabilidade genética.

Os marcadores IRAP têm sido utilizados, para diferenciar espécies do gênero *Colletotrichum*, e foram obtidos a partir do RetroC11 (retroelemento *Colletotrichum lindemuthianum* 1) (SANTANA et al., 2013; SANTOS NETO, 2012;). No presente trabalho o número de marcas polimórficas obtidas, utilizando esses marcadores, foi baixo. No entanto, Mota (2013), avaliando 22 isolados de *C. lindemuthianum* e *Colletotrichum* spp., oriundos de lesões da antracnose do feijoeiro, obtiveram 45 bandas polimórficas, agrupando os isolados em 14 classes de similaridade genética. Da mesma forma, Santana et al. (2013), utilizando 27 espécies de fungos de 11 ordens diferentes detectaram variabilidade genética entre seis espécies.

Este é o primeiro relato de um trabalho, envolvendo um grande número de isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de lesões de mancha manteigosa. Os resultados obtidos para todas as características avaliadas sugerem ampla variabilidade entre os isolados. Além disso, se isolados não patogênicos de *Colletotrichum* spp. habitam lesões de mancha manteigosa é importante investigar qual o papel dessa(s) espécie(s) no desencadear da doença. Também é

importante a realização de um estudo de filogenia desses isolados para a identificação da(s) espécie(s) a que pertencem. Todas essas informações são importantes para o conhecimento da dinâmica populacional de *Colletotrichum* spp. e, principalmente, para o manejo e controle da mancha manteigosa do cafeeiro.

6 CONCLUSÕES

- a) Os isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados não são patogênicos ao cafeeiro;
- b) A população de isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de lesões de mancha manteigosa do cafeeiro, apresentou ampla variabilidade para todas as características avaliadas;
- c) A presença de tubos de anastomose entre conídios, a ocorrência de isolados sexuais e a alta porcentagem de compatibilidade micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp. evidenciam o grande potencial dessa(s) espécie(s) na geração de variabilidade genética;
- d) Os marcadores IRAP avaliados não foram eficientes na análise de diversidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de lesões de mancha manteigosa do cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfofocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, jan./fev. 2007.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J. Múltiplos apressórios e tubos de anastomoses conidiais no processo infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 2, p.180-183, abr./jun. 2013.
- ARMESTO, C. et al. Genetic transformation with the gfp gene of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee with blister spot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 1222-1229, July/Sept. 2012.
- BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum Biology, pathology and control**. England: C.A.B International, 1992. p. 88-120.
- BARCELOS, Q. L. et al. Characterization of *Glomerella* Strains Recovered from Anthracnose Lesions on Common Bean Plants in Brazil. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e90910, Mar. 2014.
- BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. Invertase in the spore matrix of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**. Berlin, v. 102, n. 2, p. 139-147, Oct. 1981.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Amsterdam, p. 184-204, Dec. 2009.
- CAMARGO, M. B. P. et al. The impact of climatic variability and climate change on *Arabica* coffee crop in Brazil. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 1, p. 239-247, 2010.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_20_16_01_51_boletimcafe_dezembro_2012.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2014.
- DIAS, M. D. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum ssp.* Em *coffea arabica* L.** 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, Durham, v. 26, n. 3, p. 297-302, July 1945.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOACK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 1993, Piracicaba. **Palestras e Resumos...** Piracicaba: SBF, 1993. p. 124.

ESTRADA, A. B.; DOOD, J. C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 5, p.608-618, Oct. 2000.

FEITOSA, M. L. et al. **Tudo sobre a população de *Colletotrichum coffea arabica* L. in Estado de São Paulo**. São Paulo: Arquivo do Instituto Histológico, 1977.

FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal De Lavras, Lavras, 2006.

FERREIRA, J. B. et al. Efeito de fungicidas e influência de fatores climáticos sobre mancha manteigosa no cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p.417-424, mar./abr. 2009.

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

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, Amsterdam, v. 39, p. 1–17, Dec. 2009.

ISHIKAWA, F. H. et al. Heterokaryon Incompatibility Is Suppressed Following Conidial Anastomosis Tube Fusion in a Fungal Plant Pathogen. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31175, 2012.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belongin to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Biologia**, Lahore, v. 63, n. 2, p. 156-161, Apr. 2008.

ISHIKAWA, F. H. et al. Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 2-9, Jan. 2010.

KALENDAR, R. et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 1, p. 704-711, Nov. 1999.

KALENDAR, R.; SCHULMAN, A. H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 5, p. 2478-2484, Aug. 2006.

KENNY, M. K.; GALEA, V. J.; PRICE, T. V. Germination and growth of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee in Papua New Guinea and their pathogenicity to coffee berries. **Australasian Plant Pathology**, Essex, v. 41, n. 5, p. 519-528, Sept. 2012.

LESLIE, J. F. et al. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 2336-2342, Sept. 1993.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. Em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 484-495, dez. 2007.

LOPEZ, M. A. Q.; LUCAS, J. A. *Colletotrichum* isolates related to anthracnose of cashew trees in Brazil: morphological and molecular description using LSU rDNA sequences. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p. 741-752, jul./ago. 2010.

MAFACIOLI, R. et al. Characterization morpho-physiological and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from peach palm. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 113-117, abr./jun. 2006.

MEHRABI, R. et al. Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 542-554, May 2011.

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

MOTA, S. F. **Variabilidade de *colletotrichum* spp. no feijoeiro comum.** 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARAITE, H. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* from native Mexican *Stylosanthes* species. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 383-396, Apr. 2001.

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

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.

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

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.).** 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

PANDEY, A.; YADAVA, L.; MANOHARAN, M. Effectiveness of cultural parameters on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease of mango (*Mangifera indica* L.) **Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 12, n. 4, p. 123-133, 2012.

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

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p.33-34, Oct. 2010.

PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 490-497, May 2012.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. **Jornal General Microbiology**, Washington, v. 10, n. 1, p. 7-8, Jan. 1953.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 1320–1326, 2004.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum* spp. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 40, n. 2, p. 138–145, Dec. 2003.

ROCHA, J. R. S.; OLIVEIRA, N. T.; MENEZES, M. Comparação da eficiência de métodos de inoculação na avaliação da patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de maracujá (*passiflora edulis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 140-148, mar. 1998.

ROHLF, F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2.1. New York: Department of Ecology and Evolution, 2000.

RSTUDIO. **RStudio**: integrated development environment for R: version 0.98.501. Boston: Computer Software, 2012.

SANTANA, M. F. et al. Terminal repeat retrotransposons as DNA markers in fungi. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 53, n. 10, p. 823-827, Oct. 2013.

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

SANTOS, L. V. et al. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroC11 sequences. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 1087-1095, Mar. 2012.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetics data analysis: version 2.0. Geneva: University of Geneva, 2000.

SKIPP, R. A. et al. *Colletotrichum*. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxford: Oxford Pergamon, 1995. p. 119-142.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: JEGER, M. J.; BAILEY, J. A. *Colletotrichum* biology pathology and control. Michigan: C.A.B. International, 1992. p. 1-26.

UNIVERSIADE OF HAWAII. Disponível em: <<http://www.manoa.hawaii.edu/news/article.php?aId=6369>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

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

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Fungal Biodiversity Centre**, Netherlands, v. 73, n. 1, p. 115-180, Sept. 2012.

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

APÊNDICE

APÊNDICE A - Tabela A1: lista de todos os isolados que participaram dos experimentos

Isolado	Caracterização					Teste de Patogenicidade
	Citológica	Morfológica	Fisiológica	Molecular	Compatibilidade	
UFLA 1		X	X			X
UFLA 2		X	X			
UFLA 3		X	X	X		
UFLA 4		X	X			
UFLA 5	X	X	X	X	X	X
UFLA 6		X	X			
UFLA 7		X	X	X		
UFLA 8		X	X			
UFLA 9	X	X	X	X		
UFLA 10		X	X	X		
UFLA 11		X	X			
UFLA 12		X	X			
UFLA 13		X	X			
UFLA 14		X	X			
UFLA 15		X	X			
UFLA 16		X	X		X	
UFLA 17	X	X	X	X		
UFLA 18		X	X			
UFLA 19		X	X	X		
UFLA 20		X	X			
UFLA 21		X				

Isolado	Caracterização					Teste de Patogenicidade
	Citológica	Morfológica	Fisiológica	Molecular	Compatibilidade	
UFLA 22		X	X			
UFLA 23		X	X	X		
UFLA 24	X	X	X	X		
UFLA 25		X	X	X		
UFLA 26		X	X			
UFLA 27	X	X	X		X	
UFLA 28		X	X	X		
UFLA 29		X	X	X		
UFLA 30		X	X			
UFLA 31		X	X	X		
UFLA 32		X	X		X	
UFLA 33		X	X			
UFLA 34		X	X			
UFLA 35		X	X			
UFLA 36		X	X			X
UFLA 37		X	X			
UFLA 38	X	X	X		X	
UFLA 39	X	X	X	X	X	
UFLA 40	X	X	X		X	
UFLA 41		X	X		X	
UFLA 42	X	X	X			
UFLA 43	X	X	X	X	X	
UFLA 44	X	X	X		X	
UFLA 45		X	X		X	
UFLA 46		X	X	X	X	
UFLA 47		X	X		X	

Isolado	Caracterização					Teste de Patogenicidade
	Citológica	Morfológica	Fisiológica	Molecular	Compatibilidade	
UFLA 48	X	X	X			X
UFLA 49	X	X	X	X		X
UFLA 50	X	X	X			X
UFLA 51	X	X	X			X
UFLA 52	X	X	X	X		X
UFLA 53	X	X	X			X
UFLA 54	X	X	X			X
UFLA 55		X	X			X
UFLA 56		X	X	X		
UFLA 57	X	X	X			X
UFLA 58		X	X	X		X
UFLA 59	X	X	X			X
UFLA 60	X	X	X			X
UFLA 61		X	X	X		X
UFLA 62	X	X	X			X
UFLA 63		X	X	X		X
UFLA 64		X	X	X		X
UFLA 65	X	X	X	X		X
UFLA 66	X	X	X			X
UFLA 67		X	X			X
UFLA 68	X	X	X			X
UFLA 69	X	X	X	X		
UFLA 70	X	X	X			X
UFLA 71		X	X	X		X
UFLA 72	X	X	X			X
UFLA 73	X	X	X	X		X

Isolado	Caracterização					Teste de Patogenicidade
	Citológica	Morfológica	Fisiológica	Molecular	Compatibilidade	
UFLA 74	X	X	X			X
UFLA 75		X	X			X
UFLA 76		X	X			X
UFLA 77		X	X			X
UFLA 78	X	X	X			X
UFLA 79		X	X			X
UFLA 80	X	X	X			X
UFLA 81		X	X			X
UFLA 82		X	X	X		X
UFLA 83		X	X			
UFLA 84		X	X			
UFLA 85		X	X	X		
UFLA 86		X	X			X
UFLA 87	X					
UFLA 91						X
UFLA 92	X					
UFLA 93						X
UFLA 95						X
UFLA 96			X	X		
UFLA 97			X			