

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E
ISOENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum sp EM CAFEIRO
(*Coffea arabica* L.)**

KÁTIA DE LIMA NECHET

1999

KÁTIA DE LIMA NECHET

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E ISOENZIMÁTICA DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum* sp EM CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Mario Sobral de Abreu

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

1999



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

Nechet, Kátia de Lima

Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Kátia de Lima Nechet. – Lavras : UFLA, 1999.

73 p. : il.

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

1. Café. 2. *Colletotrichum*. 3. Característica biológica. 4. Isoenzima. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

KÁTIA DE LIMA NECHET

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E ISOENZIMÁTICA DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum* sp EM CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 23 de Março de 1999

Prof. José da Cruz Machado

UFLA

Prof. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira

UFLA



Prof. Mario Sobral de Abreu

DFP/UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

**... se não pudermos realizar o máximo,
atentamos pelo menos ao mínimo
do que possamos fazer, de vez que todo
muito depende do pouco a fim de começar.**

Emmanuel

Aos meus pais Dimitrie e Severina, pelo apoio e esforço para que eu chegasse até esse momento;

Aos meus irmãos Fausto e Karina, e a toda minha família, por todos os pensamentos positivos,

OFEREÇO

Ao Bernardo, por todos os momentos juntos, pelo seu apoio, auxílio, compreensão e amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder paciência, sabedoria e saúde, durante a realização do curso.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, através do Programa de Integração e Capacitação de Docentes e Técnicos- PICDT, pela concessão da bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias do Pará- FCAP, pela concessão de uma bolsa de estudos do programa CAPES/PICDT.

Ao Prof. Mário Sobral de Abreu, orientador, pelo incentivo e auxílio, sempre que necessário, e sobretudo, pela amizade em todos os momentos.

À prof.^a Maria das Graças Vieira, pela orientação nos trabalhos de eletroforese.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em especial a Ana, Carlos, Dilurdes, Leiza, Patrícia, Psida, Sérgio, e Terezinha, pela ajuda e amizade.

A Renata e Dinara, pelo apoio e pela dedicada colaboração técnica na execução dos trabalhos no laboratório de Sementes /DAG da UFLA.

Ao Prof. Marco Aurélio Leite Nunes, pelos conselhos e incentivos.

Às companheiras de república Alessandra, Eneida e Mirian, pelo convívio, respeito e todos os momentos juntos.

Aos amigos de longe Poliana, Lydiane, Cristiane, Dinho, Samira, Saamara, Sandra Sueli, por sempre se fazerem presentes.

Aos amigos de curso Alê, Alessandra Boari, Claudine, Cleber, Du, Flavinho, Fred, João, Leimi, Luiza, Oto, Rosangela, Vivi, Wirton, pelo convívio.

À turma da descontração Denmora Gil, Gis, Lilica, Rina, e Sandra, pela amizade.

Aos Bolsistas de Iniciação Científica Patricia e Marcelo , pela ajuda na condução dos experimentos.

Muito Obrigada !

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Ocorrência de <i>Colletotrichum</i> em Café	3
2.2 Doenças em <i>Coffea Arabica</i> causada por <i>Colletotrichum</i>	5
2.2.1 Doença da Baga do Café (<i>Coffee Berry Disease</i>).....	5
2.2.2 Antracnose, Die-Back e Queima Castanha (<i>Brown Blight</i>)	7
2.2.3 Mancha Manteigosa.....	9
2.3 Ocorrência de <i>Colletotrichum</i> sp. no Brasil	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2.....	18
1 RESUMO.....	19
2 ABSTRACT.....	20
3 INTRODUÇÃO	21
4 REFERENCIAL TEÓRICO	22
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 Obtenção de Isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de Café	24

5.2 Obtenção de Culturas Monospóricas	24
5.3 Avaliação do Crescimento Micelial e Capacidade de Esporulação dos Isolados em Diferentes Meios de Cultura.....	25
5.4 Dimensão dos Conídios :	26
5.5 Testes de Utilização de Tartarato e Citrato como Fonte Exclusiva de Carbono	27
5.6 Teste de Patogenicidade dos Isolados.....	27
5.6.1 Inoculação em Plântulas de Cafeeiro.....	27
5.6.2 Inoculação de Frutos Verdes Destacados de Cafeeiro.	29
5.6.3 Patogenicidade em Mudas.....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1 Crescimento Micelial e Capacidade de Esporulação em Diferentes Meios de Cultura	31
6.2 Dimensão de Conídios.....	36
6.3 Utilização de Tartarato, Citrato como Fonte Exclusiva de Carbono	37
6.4 Teste de Patogenicidade em Plântulas.....	38
6.5 Teste de Patogenicidade em Frutos Verdes.....	41
6.6 Teste de Patogenicidade em Mudas.....	43
7 CONCLUSÕES	45
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO 3.....	49
1 RESUMO.....	50
2 ABSTRACT.....	51

3 INTRODUÇÃO	52
4 REFERENCIAL TEÓRICO	54
5 MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1 Obtenção do Micélio:.....	56
5.2 Extração e Eletroforese de Isoenzimas	56
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
ANEXOS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-PCR	Arbitrarily Primed-PCR
BDA	Batata Dextrose Agar
DAF	DNA amplified fingerprinting
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiaminatetraacetato
GYA	Glucose- Yeast-Agar
IVCM	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial
MEA	Malte Extract Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCNB	Penta cloro nitrobenzeno
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletlenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts
VCGs	Vegetative Compatibility Groups

RESUMO

NECHET, Kátia de Lima. Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 1999. 73 p. (Dissertação- Mestrado em Agronomia)

A população de *Colletotrichum* encontrada em cafezais pode ser distinta com base em parâmetros morfológicos e principalmente testes de patogenicidade. Neste experimento, foram avaliados 8 isolados de *Colletotrichum* de café, dos quais 2 foram obtidos de folhas, 5 de hastes, e 1 de fruto infectado provenientes de Minas Gerais e São Paulo, utilizando parâmetros morfológicos e testes de patogenicidade, além de verificar a viabilidade do uso de padrões eletroforéticos de isoenzimas como uma ferramenta adicional na taxonomia de fungos. Os caracteres morfológicos utilizados foram crescimento micelial e capacidade de esporulação *in vitro* em três meios de cultura (BDA, GYA, e MEA); medição de conídios; utilização de fonte de carbono; testes de patogenicidade em frutos verde sadios, plântulas de seis semanas e mudas de café da cultivar Mundo Novo. Os padrões eletroforéticos foram revelados para as enzimas álcool desidrogenase (ADH), fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), e malato desidrogenase (MDH). Os resultados obtidos permitiram caracterizar os isolados de crescimento lento em todos os meios testados, com capacidade de esporulação maior em meio GYA. Os conídios do tipo cilíndrico, com exceção de I-1 e I-5, que apresentaram conídios cilíndrico curto, capacidade de utilizar citrato ou tartarato como fonte exclusiva de carbono, com resultado variável para I-2. Os isolados foram patogênicos apenas em plântulas e frutos verdes. Comparando os padrões eletroforéticos obtidos, observou-se que o isolado saprófita foi distinto dos demais patogênicos por apresentar bandas características em ADH, ACP e EST, confirmando assim a viabilidade do uso da técnica na identificação de raças patogênicas dentro de uma população fúngica.

* Comitê Orientador: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Maria das Graças Guimaraes Carvalho Vieira – UFLA.

ABSTRACT

Nechet, Katia de Lima. **Biological and isoenzymatic characterization of isolates of *Colletotrichum* sp. in coffee plants. (*Coffea arabica* L.).** Lavras: UFLA, m 1999. 73p. (Dissertation- Master of Science in Agronomy)*

The population of *Colletotrichum* found in coffee plantations may be distinguished on the basis of morphological parameters and chiefly pathogenicity tests. In this experiment, were evaluated 8 *Colletotrichum* isolates of coffee, of which 2 were obtained from leaves, 5 from stems and 1 from fruit infected coming from Minas Gerais and São Paulo, by utilizing morphological parameters and pathogenicity tests, besides verifying the viability of the use of electrophoresis patterns of isoenzymes as an additional tool in fungus taxonomy. The morphological characters utilized were mycelial growth and sporulating capacity *in vitro* in three culture media (BDA, GYA and MEA); measurement of conidia; utilization of a carbon source; pathogenicity tests in healthy green fruits, six week seedlings and coffee cutting of the cultivar Mundo Novo. The electrophoresis patterns were stained to the enzymes alcohol dehydrogenase (ADH), acid phosphatase (ACP), esterase (EST) and malate desidrogenase (MDH). The results obtained enabled to characterize the slow growing isolates in every medium tested, with a greater sporulating capacity in GYA medium, cylindrical conidia, excepting 1-1 and 1-5 which presented short cylindrical types, capacity of utilizing either citrate or tartarate as a unique source of carbon, as variable results for 1-2. The isolates were pathogenic only in seedlings and green fruits. By comparing the electrophoresis patterns obtained, it was noticed that the saprophyte isolate was distinguished from the others for presenting characteristic bands in ADH, ACP and EST, confirming thus the viability of the use of the technique in identifying pathogenic races within a fungal population.

Guidance Committee : Mario Sobral de Abreu - UFLA (Adviser), Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira-UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cafeeiro é uma das culturas de grande importância para a nossa economia, destacando-se o Brasil como maior produtor mundial, com 70 a 100 mil hectares da produção nacional plantados entre 1994 e 1998. O sul de Minas Gerais o maior produtor brasileiro, representando cerca de 34% da produção nacional.

O ataque de fungos, bactérias, nematóides e vírus sobre a cultura causa grandes perdas quando não são tomadas medidas de controle adequadas, sendo as perdas de origem fúngica as mais representativas, e com manejo integrado já bem descrito pela literatura. Entretanto, doenças em potencial representam grande risco para a cafeicultura brasileira, principalmente no que se refere às táticas de controle, já que é necessário, primeiramente, um estudo do patógeno, da interação patógeno-hospedeiro e dos fatores que predispõem a planta ao ataque.

Dentre as doenças em potencial, encontra-se a causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae*, agente causal da CBD (Coffee Berry Disease) - doença da baga do café, que ataca bagas verdes em desenvolvimento e é o principal fator limitante à produção dos cafezais na África. No Brasil, existem relatos do ataque de *Colletotrichum* em café, causando manchas em folhas, danos em frutos, e sempre procurando associações com o patógeno da CBD, mas com trabalhos sem conclusões definitivas a respeito do agente causal.

A falta de estudos sobre a gama de espécies do fungo que ocorrem nos cafezais e diferentes sintomas associados a essas espécies, geram confusão quanto à importância de doenças causadas por *Colletotrichum*, sendo apenas *Colletotrichum kahawae* considerado patogênico à cultura.

A verificação de sintomas relacionados ao CBD em lavouras de café e a constatação da espécie patogênica de *Colletotrichum* no sul de Minas Gerais é motivo de grande preocupação, pois sérios prejuízos econômicos podem ser acarretados, caso a doença venha a se tornar epidêmica, como ocorre na África. No caso de aparecimento de enfermidades novas, a identificação correta do agente causal é essencial uma vez que, a partir desse conhecimento, novos estudos em relação à enfermidade podem ser realizados, principalmente no que se refere às medidas de controle.

Esse trabalho teve por objetivo caracterizar isolados de *Colletotrichum* de cafeeiros provenientes de diferentes locais na planta e regiões cafeeiras, utilizando técnicas biológicas através de caracteres morfológicos em meios de cultura, medição de conídios e testes bioquímicos; e técnicas moleculares através do padrão de isoenzimas, além de verificar a patogenicidade em mudas, plântulas e frutos verdes da cultivar Mundo Novo em condições de casa de vegetação e câmara de crescimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ocorrência de *Colletotrichum* em café

A descrição original de *Colletotrichum* em café foi feita por Noack em 1901, referente a um isolado proveniente do Brasil, o qual o denominou de *Colletotrichum coffeanum* (Noack, 1902). Em 1922, no Quênia, o micologista Mac Donald relata a variante "virulans" de *Colletotrichum* em café, associada a "Coffee Berry Disease" (CBD), diferenciando da denominação original onde a CBD não existe (Rayner, 1950, citado por Pereira e Chaves, 1978).

Uma gama de diferentes raças de *Colletotrichum* pode ser encontrada associada ao café, as quais podem ser separados em grupos com base na morfologia de isolados monospóricos. Gibs (1969) definiu quatro grupos de *Colletotrichum* isolados de frutos verdes e cerejas afetados em cafeeiros no Quênia, baseados na morfologia de suas colônias em Extrato Malte Agar (MEA): a) ccm: crescimento rápido, micélio aéreo claro, com conídios crescendo diretamente das hifas; b) cca: crescimento rápido, micélio aéreo claro, com conídios curtos e presença de acérvulo; c) ccp: crescimento lento, micélio aéreo rosado com conídio crescendo diretamente das hifas; d) CBD ou variante "virulans": com crescimento lento, micélio de coloração cinza escuro a verde oliva, com setas raramente presentes.

Através de estudos das características culturais de cepas de *Colletotrichum* isoladas de cafeeiro do Quênia, Hindorf (1970), citado por Waller *et al.* (1993), classificou o grupo ccp como *C. acutatum* Simmonds, os grupos ccm e cca, como formas de *C. gloeosporioides* Penz., e o grupo CBD ou

variante "virulans" como *C. coffeanum* Noack . Além desses grupos, foram identificados dois novos grupos: 1. *C. gloeosporioides* Penz: micélio inicialmente branco, tornando-se cinza esverdeado, e posteriormente marrom; conídios cilíndricos, arredondados nas duas extremidades, às vezes recurvados, de tamanho maior do que as formas de *C. gloeosporioides* descritas anteriormente; presença da forma peritecial, *Glomerella cingulata*, em meio de cultura; crescimento lento em meio de cultura; 2. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Sapuld e Screnk: micélio ocasionalmente branco, estéril; formando peritécios em cultura; restrita a ramos e folhas; crescimento rápido em meio de cultura.

Espécies de *Colletotrichum* invadem todos os órgãos do cafeeiro: frutos em todos os estágios, folhas e hastes maduras; o grupo CBD pode ser encontrado em todos os órgãos do hospedeiro em diferentes proporções, sendo encontrado em maior proporção nos frutos; raramente infecta folhas novas e é menos freqüente em hastes quando comparado com as outras espécies saprofiticas de *Colletotrichum*; *C. acutatum*, apesar de ser encontrado em todos os órgãos do café, não é patogênico ao cafeeiro arábica; as espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* colonizam hastes e folhas, mas algumas vezes crescem também em frutos mumificados já infectados pelo CBD (Hindorf, 1975). Vários autores relatam que a ocorrência da estirpe patogênica do fungo é relativamente baixa em relação ao complexo da população de *Colletotrichum* em ramos de cafeeiros, sendo restritas aos tecidos da casca ainda esverdeados, amarelados e pardacentos, na parte dos ramos produtivos mais próximos à extremidade apical (Vermeulen, 1970; Gibbs, 1960).

A forma peritecial do fungo *Glomerella cingulata* é relatada apenas em casca de ramos e em folhas. Porém, estudos realizados por Hocking, Johannis e Vermeulen (1967) constataram a presença, em baixa porcentagem, de peritécios férteis em frutos verdes de café incubados durante cinco semanas em câmara

úmida, apresentado 7% de infectividade em frutos verdes, quando inoculados sem fermento; fato observado também por Foucart (1961). A presença da forma perfeita do fungo restrita aos ramos foi reafirmada por Vermeulen (1970), classificando-o de baixa patogenicidade. Esse trabalho permite concluir que *Glomerella cingulata* não constitui perigo na disseminação da doença no Quênia, onde a CBD é bem disseminada, mas pode ser importante em países como o Brasil, onde não foi constatada a presença de CBD (Rosseti, Feichteberger e Feitosa, 1975).

2.2 Doenças em *Coffea arabica* causada por *Colletotrichum*

2.2.1 Doença da baga do café (*Coffee Berry Disease*)

A primeira informação da raça virulenta de *C. coffeamum* foi dada pelo micologista MacDonald, em outubro de 1922, em um distrito do Quênia, Sotik, na parte oeste do país (Rayner ,1950 citado por Pereira e Chaves, 1978). De acordo com tais informações, a severidade de ataque foi pequena mas suficiente para o abandono da cultura do café em algumas localidades. Entretanto, existem relatos que Butler (1918) já havia encontrado o patógeno causando antracnose nas folhas e manchas em frutos maduros de cafeeiros no sul da Índia (Nutman e Roberts, 1960).

Por volta de 1950, a doença se estabeleceu nas principais áreas produtoras de café do oeste africano (Nutman, 1970), sendo restrita, até 1961, aos cafezais localizados acima de 1.900 m; após 1961, esse comportamento foi alterado, e a doença atingiu também cafezais abaixo de 1.900 metros de altitude (Browns e Cocheme, 1969, citado por Pereira e Chaves, 1978). A doença já foi relatada em vários países africanos como o Zaire, Camarões, Ruanda, Uganda,

Tanzânia, Etiópia, e mais recentemente confirmada em Malawi, Zimbabwe e Zâmbia, em 1985 (Waller, 1987).

A dispersão lenta da doença contrasta com a dispersão rápida da ferrugem (*Hemileia vastatrix*); os esporos da CBD somente são dispersos pela chuva, mas podem também ser dispersos por material infectado, vetores passivos como pássaros, homem e implementos agrícolas, e por sementes provenientes de frutos infectados. A dispersão da doença na África foi devido a um desses vetores (Massaba e Waller, 1992).

A quantidade de inóculo está relacionado com o número de bagas doentes que apresentam esporulação, e não com a capacidade de esporulação do fungo em cascas maduras; esse potencial de inóculo, subsequente desenvolvimento da doença e perdas no campo, são intensificados pela presença de poucas bagas doentes, sendo as provenientes do topo das plantas as mais importantes durante a epidemia da doença (Waller, 1972). As condições necessárias para germinação do conídio foram determinadas em laboratório por Nutman e Roberts (1960), a germinação só ocorre na presença de um filme d'água, a temperatura ótima está em torno de 22 °C, e deve persistir por, no mínimo 5 horas para que ocorra início da infecção.

A nomenclatura do patógeno CBD é confusa, devido à descrição original do patógeno *Colletotrichum coffeanum*, feita por Noack, em 1901 referindo-se a um isolado proveniente do Brasil, onde a CBD não ocorre. Rayner (1952) referiu-se ao patógeno como *C. coffeanum* var. *virulans*, não bem aceito na literatura internacional, enquanto Hindorf (1970), citado por Hindorf (1975), preferiu sustentar a nomenclatura *C. coffeanum*, mas somente para o patógeno CBD.

Embora Srenivasaprasad, Brown e Mills (1993) tenham obtido resultados que confirmam a alta similaridade do patógeno com o grupo *C. gloeosporioides*, ele pode ser distinto por sua patogenicidade e relações

ecológicas, morfologia da colônia e características bioquímicas. Esses fatos levaram à discussão quanto a sua posição taxonômica e um novo nome foi proposto por Waller *et al* (1993) para a espécie: *C. kahawae* Waller e Bridge.

C. kahawae, quando cultivado várias vezes em meio artificial, apresenta colônias que tornam-se indistintas morfologicamente de espécies do grupo de *C. gloeosporioides* (Sutton, 1992). Com base nessas observações, Hocking, Johanns e Vermeulen (1967) afirmaram que o CBD era apenas um segregante de *Glomerella cingulata* Spauld e Schrenk, porém Massaba e Waller (1992) afirmam não existir evidência da forma perfeita do patógeno CBD, embora Beynon *et al.* (1995) tenham obtido grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) diferentes.

O fungo ataca todos os estágios da cultura desde a floração até frutos maduros, e ocasionalmente folhas, mas as maiores perdas ocorrem com a infecção de bagas verdes. Podem ser observados dois sintomas nas bagas: lesões ativas (Nutman, 1970) e lesões tipo "sarna" ou inativas (Muller, 1970). As lesões ativas começam com pequenas lesões deprimidas escuras, as quais se espalham rapidamente até cobrir a superfície total da baga. Em condições de alta umidade, uma massa rosada de esporos é produzida na superfície da lesão, o fungo penetra no interior da baga e destrói as sementes, deixando os frutos vazios, ressecados e mumificados. Lesões tipo "sarna" são normalmente pálidas, apenas levemente deprimidas e com anéis concêntricos de acérvulos pretos; esporulam lentamente e embora possam desenvolver lesões ativas quando as bagas amadurecem, esse tipo de lesão não afeta o crescimento das bagas em desenvolvimento e não tem efeito detectável no campo (Massaba e Waller, 1992).

2.2.2 Antracnose, Die-back, e Queima Castanha (*Brown Blight*)

A antracnose em folhas do cafeeiro foi caracterizada, por Roger (1953), por manchas irregulares de coloração castanha e castanho-acizentada, grandes, ocorrendo comumente nas margens das folhas; com o envelhecimento das manchas formam-se anéis concêntricos, nos quais a massa de esporos do fungo é visível; peritécios de *Glomerella cingulata* também têm sido observado em folhas doentes (Hindorf, 1975).

Gutierrez (1954) relata a incidência de *die back* e infecções foliares na região de Turrialba, Costa Rica, encontrando o fungo *Colletotrichum coffeanum* em 70% dos isolamentos feitos a partir de diferentes órgãos da planta, com diferentes graus de patogenicidade, obtendo maiores infecções em folhas novas de plantas pouco sombreadas e em condições de alta umidade relativa.

No Quênia, o sintoma de *die back* foi descrito por Hindorf (1975) iniciando como uma queima das folhas próximas à extremidade dos ramos secundários, com posterior morte e queda. Em seguida, os internódios verdes dos ramos novos tornavam-se necróticos e em câmara úmida apresentavam massa de conídio, podendo, em alguns casos, ser encontrados nos tecidos mortos peritécios de *Glomerella cingulata*. As bagas verdes apresentavam amadurecimento precoce e não desenvolviam sementes sadias.

Além desse tipo comum de *die back*, descrito anteriormente, existem outras formas de *die back* causados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. O ataque do fungo sobre folhas novas da ponta dos ramos pode causar o chamado *Elgon die-back* (Nutman, 1970). De acordo com D'Souza (1971), inicia-se uma prematura, súbita e parcial abscisão das folhas nas partes novas e suculentas da planta; em seguida, a lesão progride em direção ao tecido vascular, originando uma murcha repentina e o colapso do ramo. Cerca de 74 a 96 horas após, ocorre a morte do ponteiro. Essa morte do ponteiro é paralisada nos nós quando ocorre

queda de temperatura, afetando geralmente até oito internódios, sobre os quais o fungo forma, à superfície, acérvulos que, em condições favoráveis, liberam conídios, posteriormente as formas saprófitas formam peritécios de *Glomerella cingulata* (Nutman, 1970).

O termo *Brown Blight* (queima castanha) é usado no leste africano para plantas atacadas por *Colletotrichum*, em áreas não infectadas pelo CBD, tendo como características lesões escuras, deprimidas em bagas maduras ou em processo de maturação, sendo incapaz de atacar bagas verdes e, em alguns casos, observa-se a presença de peritécio (Hocking, 1966). Segundo o autor, infecções similares foram postulados por Rayner (1948) como parte de um mecanismo de conversão de queima castanha para CBD, sem, entretanto, evidências experimentais. Nutman e Roberts (1961) mencionam que esse agente causal não é o mesmo da CBD.

2.2.3 Mancha Manteigosa

A doença foi descrita pela primeira vez em *Coffea arabica*, em 1957, por Wellman (1957), na Costa Rica, reportando-a de natureza virótica, mas sem conseguir demonstrar a sua transmissão. Os sintomas foram descritos como manchas circulares de 2-6 mm de diâmetro, não necróticas, de coloração verde claro a amarelo, ligeiramente deprimidas e menos brilhante que a superfície normal da folha. Quando há muitas lesões nas folhas, ocorre um encrespamento, flacidez e queda prematura das folhas jovens. Nos frutos, as lesões são menores, não necróticas.

Condições similares foram relatadas por Bittancourt (1958a), no Brasil, como uma enfermidade de pouca importância econômica chamada Mancha Oleosa, e por Shaw e Doroty (1968), citado por Vargas e Gonzalez (1972), na

Nova Guiné, que a designou de *Wellman's fruit and leaf spot*. A enfermidade não foi comprovada por nenhum desses autores.

Segundo Bianchini (1960), desde sua aparição na Costa Rica, como medida de controle, realizou-se eliminação de todas as plantas doentes. Apesar disso, novos casos de plantas com a doença aparecem, e maior incidência da doença ocorre no Valle Central, principal região produtora de café na Costa Rica, o que levou Vargas e Gonzalez (1972) ao estudo do patógeno, obtendo resultados positivos quando inocularam suspensão de esporos de *Colletotrichum* em frutos e folhas derivados de parentais doentes. Progenies de plantas sadias e F1, obtidas a partir do cruzamento de plantas sadias e doentes, não apresentaram sintomas. Devido a isso, os autores sugerem que exista um caráter genético que condiciona a susceptibilidade à enfermidade

Em abril de 1990, Dorizzotto e Abreu (1993) constataram, em lavoura cafeeira, do município de Cristais-Mg, ataque de *Colletotrichum*, que causava manchas nas folhas, sintoma da mancha manteigosa, e morte dos cafeeiros. As manchas localizavam-se na parte ventral das folhas, em áreas circulares localizadas, em cor verde claro, com diâmetro de 3-5 mm, e geralmente no centro destas áreas circulares iniciavam-se e desenvolviam-se áreas necróticas em cor marrom claro. Através de estudos sobre a morfologia e patogenicidade do referido isolado, Dorizzotto (1993) concluiu ser o isolado agente causal da mancha manteigosa, com algumas características morfológicas iguais ao CBD, mas não se tratando da var. *virulans* encontrado nos países africanos. O isolado foi identificado utilizando técnicas biológicas, como *Colletotrichum coffeanum* Noack, confirmada pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e pela *CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES* (CBS), e como *Colletotrichum kahawae*, pelo *International Mycological Institute* (IMI).

2.3 Ocorrência de *Colletotrichum* sp. no Brasil

Em 1958 , no Estado de São Paulo, Bittancourt (1958a), estudando as manchas da folha do cafeeiro, identificou a mancha da antracnose, e caracterizou o agente causal, *Colletotrichum coffeanum*, como um parasita secundário, somente capaz de invadir os tecidos do hospedeiro quando mortos ou alterados por outras causas, portanto de importância econômica insignificante, não necessitando de tratamentos.

A ocorrência da mancha manteigosa, no Brasil, foi detectada por Mansk e Matiello (1977), em café “Conilon”, no Estado do Espírito Santo. Nestas condições, os ataques mais intensos foram observados nas folhas e ramos novos em plantas adultas, apesar de terem sido constatados sintomas em mudas ainda no viveiro. Os cafeeiros atacados apresentavam desfolha e seca progressiva dos ramos, da extremidade para a base, e brotações novas eram atacadas novamente levando à morte prematura das plantas. Verificou-se maior incidência durante a estação quente e chuvosa, quando há intensa brotação nas plantas. A partir de isolamentos de lesões novas de folhas, ramos e frutos, foram obtidas colônias típicas de *Colletotrichum*.

Aviles *et al.* (1983) relataram a ocorrência da mancha manteigosa na Região do Norte Fluminense, constatando graus intermediários do ataque do patógeno em lavoura “Conilon” de 5 anos de idade, propondo uma escala de resistência de plantas: imune, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível. Acrescentam esses autores que a quantidade de cada um dos tipos é variável entre as diversas lavouras, predominando, porém, as do tipo moderadamente suscetível e suscetível. Dorizzotto e Abreu (1993) evidenciaram a susceptibilidade de prôgenies de cafeeiro, originadas do Híbrido de Timor, ao fungo *Colletotrichum* em condições de laboratório.

Estudos sobre a microflora de *Colletotrichum* em cafeeiros foram realizados no estado de São Paulo, por Feitosa *et al.* (1977), que verificaram a grande variabilidade do fungo em cultura, não podendo distinguir diferenças no tipo de ataque à planta, classificando todos os isolados de crescimento rápido, enquadrando-os na espécie *C. gloeosporioides*.

O ataque de *Colletotrichum* em frutos verdes foi verificado em 1975 por Figueiredo e Mariotto (1978), em lavoura cafeeira situada a 940 m de altitude, no município de Campestre-MG, com sintomas típicos de manchas escuras deprimidas, com massa de esporos visíveis. Quando as lesões tomavam todo tegumento, os frutos mumificavam e caíam, porém as plantas com exceção dos frutos, apresentavam bom aspecto vegetativo, sem sintomas aparentes da doença nas folhas e ramos. Testes de patogenicidade em frutos verdes sadios, em laboratório, manifestaram reação positiva apenas para os frutos provenientes das mesmas plantas doentes no campo.

Os mesmos autores, em 1977, constataram, em cafezal situado a 900 m de altitude, no município de Ouro Fino- MG, queda prematura de frutos da variedade Catuaí, e sobre os frutos pontos de cor amarelo palha, deprimidos, onde isolou-se o fungo *Colletotrichum*, encontrando-se similaridades desses sintomas com a sintomatologia descrita por Muller (1970) de "lesão inativa". O teste de patogenicidade em frutos verdes da variedade Mundo Novo, a 22° C, foi positivo em 88% dos casos quando a concentração do inóculo foi igual ou superior a 10⁸ esporos/ml.

Ambos os isolados foram identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. pelo Departamento de Fitopatologia de Wageningen, na Holanda, o que posteriormente foi reafirmado por Van der Graaff (1979), caracterizando as poucas lesões observadas nas bagas resultantes de danos mecânicos.

A continuidade dos estudos com o isolado proveniente de Ouro Fino, descrito no trabalho anterior, foi realizada por Almeida *et al.* (1985), avaliando a patogenicidade em laboratório e campo, bem como a evolução da doença de acordo com as condições climáticas. O teste de patogenicidade em frutos verdes foi negativo tanto em campo como em laboratório, e algumas infecções foram obtidas somente quando os frutos foram mantidos constantemente sob 100% de umidade.

Tanto as lesões como a queda de frutos apareceram com maior frequência durante ou imediatamente após a ocorrência de dias com chuvas contínuas; a porcentagem de frutos atacados atingiu o máximo de 1,2 e 1,8% na 8^o, 27^o e 28^o semanas após a 1^o floração, e os maiores índices de queda de frutos doentes atingiram 3% na 13^o semana e 2,3% na 23^o semana após o 1^o florescimento. Segundo os autores, as causas prováveis dessas perdas podiam ser fisiológicas, apesar de muitos frutos apresentarem lesões que se iniciavam pelo pedúnculo e posteriormente provocavam sua queda ou total mumificação.

No estudo sobre as possibilidades climáticas da manifestação da ferrugem e da CBD na cafeicultura brasileira, Camargo (1985) constatou que, no Brasil, todas as áreas cafeeiras estão situadas em regiões tropicais, fora da faixa equatorial para *Coffea arabica*, sendo assim, as plantas são fotoperiódicas: florescem e produzem chumbinho na primavera, apresentam granação no verão, a maturação no outono e o repouso no inverno. Dessa forma, nas fases fenológicas de chumbinho e granação, quando a CBD pode infeccionar os frutos, as temperaturas médias diárias são demasiadas elevadas, bem acima de 20 °C, não permitindo assim a manifestação epidêmica da doença, apesar da possibilidade de estirpes patogênicas do fungo serem encontradas em região não equatorial, como é o caso do Brasil.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. R.; MANSK, Z.; MATIELO, J. B.; MULLER, R. R. A. Observações preliminares sobre queda dos frutos sob suspeita de ataque de *Colletotrichum* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7, 1985, Araxá. Resumos... Rio de Janeiro: IBC, 1985. p.323-326.
- 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, p.457-470, 1995.
- BIANCHINI, C. Informe resumido sobre la mancha mantecosa, chasparria y ojo de gallo del café en Costa Rica. *Café*, Turrialba, v.2, n.5, p.29-34, 1960.
- BITANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. *O Biológico*, São Paulo, v.24, n.10, p.191-201, Jan. 1958a.
- BITANCOURT, A. A. Um inquérito sobre a seca dos ramos do cafeeiro. *O Biológico*, São Paulo, v.24, n.1, p.19-22, Jan. 1958b.
- CAMARGO, A.P. Possibiliades climáticas da manifestação da ferrugem e da CBD na cafeicultura brasileira. Campinas: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia, 1985, 11p. (Boletim Técnico).
- DORIZZOTTO, A. Caracterização Morfológica e Patogenicidade de *Colletotrichum* sp. Associados a Cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em Dois Municípios de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1992. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia).
- DORIZZOTTO, A. ; ABREU, M.S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeaum* Noack e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26, 1993, Aracajú. Suplementos..., Brasília: SBF, 1993a, v.18 , p. 285.
- DORIZZOTTO, A. ; ABREU, M.S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum coffeaum* Noack e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26, 1993, Aracajú. Suplementos..., Brasília: SBF, 1993b, v.18 , p.306.

- D' SOUZA, G.I. Studies on a die back of Arabica coffee in South India: role of pest and parasitas. Turrialba, San Jose, v.21, n.2, p. 146-8, Abr.-Jun.1971.
- FEITOSA, M.I.; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; ROSSETI, V.; LEITE, Y.R.; Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no estado de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.44, n.1/2, p. 33-54, Jan-Jun 1977.
- FIGUEIREDO, M.B.; MARIOTTO, P.R. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). O Biológico, São Paulo, v.24, n.1, p.25-26, Jan. 1978.
- FOUCART, G. Shedding et coffee berry disease du caféier d' arabie. Review of Applied Mycology, Fanham Royal, v.40, p.120, Jan.1961.
- GIBBS, J.N. Inoculum sources for coffee berry disease. Annals of Applied Biology, London, v.64, p. 515-522. 1969.
- GUTIERREZ, L.H. de Muerte descendente causada por *Colletotrichum* en las plantas de café en el almécigo y su combate por medio de aspersiones en Turrialba, Costa Rica. Turrialba, San Jose, v.4, n.3-4, Jul-Dec 1954.
- HINDORF, H. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: a review. Journal of Coffee Research, Kamataka, v.5, n.3/3, p. 43-56, 1975.
- HOCKING, D. Brown blight (*Colletotrichum coffeanum* Noack) of arabica coffee in East Africa. Annals of Applied Biology, Wellesbourne, v.58, p. 409-421, 1966.
- HOCKING, D.; JOHANNIS, J.C.; VERMEULEN, H. Ascospore production, discharge and infection by *Glomerella cingulata* causing coffee berry disease. Nature, London, v. 214, n. 5093, p.1144-1145, Jun.1967.
- MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café "conilon" (*Coffea canephora*, Pierre), no estado do Espírito Santos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5, 1977, Guarapari. Resumos... Rio de Janeiro: IBC, 1977. p. 172-173.
- MASSABA, D.; WALLER, J.M. Coffee Berry Disease: The current Status. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (eds). *Colletotrichum- Biology, Pathology and Control*. Wallingford, U.K.: CAB International, 1992, p. 1-26.

- MULLER, R.A. L' evolution de l' anthracnose des baies du caféier d' arabie (*Coffea arabica*) due à une forme du *Colletotrichum coffeanum* Noack du Cameron. *Café Cacao Thé*, Paris, v. XIV, n.2, Juin 1970.
- NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. *Boletim da Agricultura*, São Paulo, n.1, Jan. 1902.
- NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F.M. Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noak; I. Some factors affecting by the pathogen . *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 43, n. 3, p. 489-505, 1960.
- NUTMAN, F.J. Coffe berry disease. *PANS*, v. 16, n.2, p. 277-286, Jun. 1970
- PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Antracnose do Cafeeiro. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.4, n. 44, p. 82-90, 1978.
- RAYNER, R.W. Coffee Berry Disease: a survey of investigations carried out up to 1950. *East Africa Agricultural Journal*, v.17, p.130-158, 1952.
- ROSSETI, V.; FEICHTEBERGER, E.; FEITOSA, M.I. A doença dos frutos do cafeeiro denominada "Coffee Berry Disease" (CBD)- Revisão Bibliográfica. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.42, p.265-284, 1975.
- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A E.; MILLS, P.R.; Coffe berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycological Research*, Cambridge, v.97, n.8, p. 995-1000, 1993.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its *Colletotrichum* anamorp. In: BAILEY, J.A; JEGER, M.J. (eds). *Colletotrichum- Biology, Pathology and Control*. Wallingford, U.K.: CAB International, 1992, p. 1-26.
- VAN DER GRAAFF, N.A. On the possible occurrence of coffee berry disease in Brazil. *FAO*, Rome, v.27, p.118, 1979.
- VARGAS, E.; GONZALEZ, L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. *Turrialba*, San Jose, v.22, n.2, 1972.

- VERMEULEN, H. Coffee berry disease in Kenya. I. *Colletotrichum* spp. colonizing the bark of *Coffea arabica* L. II. The role of *Glomerella cingulata* in the *Colletotrichum* population colonizing the bark of *Coffea arabica*. **Netherlands Journal Plant Pathology**, Wageningen, v.76, p. 277-284; 285-292, 1970.
- WALLER, J.M. Water-borne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.71, p.1-18, 1972.
- WALLER, J.M. Coffee diseases: Current status and recent developments. **Review of Tropical Plant Pathology**, v.4, p.1-33, 1987.
- WALLER, J. M.; BRIDGE, P. D.; BLACK, R.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, n.8, p. 989-994, Aug.1993.
- WELLMAN, F.L. Blister spot of Arabica coffee from virus in Costa Rica. **Turrialba**, San Jose, v.7, p.13-15, 1957.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E TESTES DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* PROVENIENTES DE CAFÉ

1 RESUMO

NECHET, K. de L. **Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* provenientes de café.** In: NECHET, K. de L. **Caracterização Biológica e Isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* em cafeeiros (*Coffea arabica* L.).** Lavras: UFLA, 1999. p. 18-48. (Dissertação-Mestrado em Fitopatologia)*

O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *Colletotrichum* obtidos a partir de folhas, hastes e fruto de café infectado, utilizando caracteres morfológicos, tais como Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), capacidade de esporulação (C.E) em três meios de cultura (BDA, MEA e GYA), medição de conídios, utilização de fonte de carbono, conduzidos em condições de laboratório, e testes de patogenicidade em frutos verde sadios, plântulas de seis semanas e mudas da cultivar Mundo Novo. Os teste de patogenicidade em frutos verde e plântulas foram conduzidos em condições de câmara de crescimento (22 ± 2 °C) em blocos casualizados, onde avaliou-se, a cada 5 dias, o número de frutos infectados e o grau de doença, respectivamente. O ensaio com mudas foi conduzido em condições de casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado e avaliado o número de lesões/folha após 30 dias. Todos os isolados apresentaram IVCM lento nos meios testados, sendo menor em GYA, seguido de MEA e BDA, enquanto a C.E foi maior em meio GYA, seguido de MEA e BDA. Os isolados I-1 e I-5 apresentaram conídio tipo cilíndrico curto, e os demais tipo cilíndrico, e, no geral, a variação ficou entre 10,11-14,52 x 3,06-6,47 μ . Todos os isolados foram capazes de utilizar tartarato ou citrato como fonte exclusiva de carbono, e apenas I-2 apresentou resultado variável. Os isolados foram patogênicos a frutos verdes e plântulas, obtendo-se infecção máxima de 51,27 e 24,55%, aos 30 dias, respectivamente, entretanto não foram patogênicos às mudas.

* Comitê Orientador: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Maria das Graças Guimaraes Carvalho Vieira -UFLA

2 ABSTRACT

NECHET, Kátia de Lima. Morphological characterization and pathogenicity tests of isolates of *Colletotrichum* from coffee. In: NECHET, K. de L. Biological and Isoenzymatic characterization of isolates of *Colletotrichum* in coffee plants (*Coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 1999. p. 18-48. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia)*

The objective of this work was to characterize isolates of *Colletotrichum* obtained from leaves, stems and fruits of coffee infected, by utilizing morphological characters, such as index of velocity of mycelial growth (IVMG), sporulating capacity (SC), in three culture media (BDA, MEA and GYA), measurement of conidia, utilization of carbon source, conducted under laboratory conditions and pathogenicity tests in healthy green fruit, six week seedlings and cuttings of the cultivar Mundo Novo. The pathogenicity tests in green fruit and seedlings were conducted under growth chamber conditions (22 ± 2 °C) in randomized blocks, where, every 5 days, the number of infected fruits and degree of disease were evaluated, respectively. The trial with cuttings was conducted in greenhouse conditions in completely randomized design and the number of lesions/leaf after 30 days evaluated. All the isolates presented slow IVMG in the media tested, its being lower in GYA followed by MEA and BDA, whereas S.C was higher in GYA medium, followed by MEA and BDA. Isolates I-1 and I-5 presented short cylindrical type conidia and the others cylindrical type, and in general, variation stayed between 10.11- 14.52 x 3.06- 6.47 μ . All isolates were capable of utilizing tartarate or citrate as the unique source of carbon and only I-2 presented variable result. The isolates were pathogenic to green fruits and seedlings obtaining maximum infection of 51.27 and 24.55 % at 30 days, respectively. However, they were not pathogenic to cuttings.

Guidance Committee: Mario sobral de Abreu - UFLA (Adviser), Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira -UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A descrição original da ocorrência de *Colletotrichum* em café, feita a partir de um isolado do Brasil, e posterior relato da forma patogênica do fungo em regiões da África, geraram confusão quanto à nomenclatura do fungo. Além disso, a sintomatologia apresentada pelo café varia de acordo com a espécie ou forma de *Colletotrichum*, gerando assim distintas nomeações para as doenças causadas por diferentes espécies do fungo. Sabe-se que muitas espécies de *Colletotrichum* colonizam ramos, folhas e frutos de cafeeiros, mas a de maior importância econômica é a que ataca frutos verdes em desenvolvimento de café, restrita aos países africanos. Entretanto, já existem relatos da ocorrência dessa espécie, *C. kahawae*, em outros países, como é o caso do Brasil, mas que não se manifesta de forma epidêmica.

Caracteres morfológicos são muito variáveis, dificultando a identificação de espécies, e levando muitas vezes à confusão quanto ao agente causal da doença. Apesar disso, estudos no sentido de padronizar essas características, enfatizando o agente da CBD, vêm sendo descritos na literatura. Deve se levar em consideração que a utilização de caracteres morfológicos, bem como testes de patogenicidade, são métodos rápidos e relativamente fáceis, podendo ser desenvolvidos sem necessidade de equipamentos sofisticados, levando ao diagnósticos e medidas de controle mais rápidas.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os isolados de *Colletotrichum* sp. de café utilizando caracteres morfológicos descritos na literatura para diferenciação de espécies, e testes de patogenicidade em frutos verdes, plântulas e mudas de *Coffea arabica* cv. Mundo Novo.



4 REFERENCIAL TEÓRICO

Em relação à população de *Colletotrichum* em cafezais, muitos autores referem-se à presença de estirpes não patogênicas conjuntamente com as patogênicas sobre plantas atacadas, principalmente quando o isolamento é feito a partir de lesões velhas, utilizando a técnica de crescimento em nutriente-agar (Waller, 1972; Massaba e Waller, 1992; Waller *et al.*, 1993).

A distinção entre as espécies, baseada em caracteres morfológicos, foi bem definida por Waller *et al.* (1993), o que permitiu novo posicionamento da estirpe patogênica de *Colletotrichum*, agente da CBD, nomeando-a de *Colletotrichum kahawae* Waller e Bridge. O fungo foi caracterizado morfológicamente por apresentar crescimento lento (2-4mm d⁻¹ a 25° C), micélio cinza escuro a esverdeado, mas tornando-se mais claro após sucessivas repicagens; ausência de acérvulos, conídios cilíndricos asseptados, 12-19 x 4.0 µ; apressório moderadamente abundante, marrom claro, circular ou de margens irregulares, de 8.0-9.5 x 5.5-6.5 µ.; não utiliza citrato, tartarato ou ambos como fonte exclusiva de carbono; patogênico a frutos verdes e hipocótilos de *seedlings* de *Coffea arabica*, causando lesão escura deprimida. O crescimento mais rápido, micélio branco a cinza claro, a utilização de citrato e tartarato como fonte exclusiva de carbono e a não patogenicidade a bagas verdes e a hipocótilos de *seedlings* apresentados por *Colletotrichum gloeosporioides* permitiu que esses critérios sejam utilizados para distinção das estirpes de *Colletotrichum* em *Coffea arabica*.

Apesar desses fatos, a variabilidade dentro da mesma espécie é muito grande e os caracteres morfológicos variam muito entre diferentes isolados, como demonstrado por Rodrigues *et al* (1991), estudando características morfológicas e patogênicas de três diferentes isolados de *Colletotrichum* agente

da CBD provenientes da Angola, Malawi e Quênia. Os resultados apresentados pelos autores demonstram diferenças morfológicas entre eles, tanto *in vitro* como nos frutos verdes inoculados. Os isolados apresentaram diferentes graus de virulência, capacidade de esporulação de alta a baixa, presença de acérvulos, setas presentes a raras. Após 10 dias em MEA (extrato de malte agar), no escuro, a 18-20° C, verificou-se uma taxa de crescimento maior do isolado de Angola (7.6mm/24hrs), mudando para preta a cor do substrato, e produção de grande número de acérvulos em massa rosada de conídios; resultado similar encontrou-se para o isolado de Malawi, porém com crescimento mais lento (6.5mm/24horas). O que o diferencia do isolado do Quênia, que produziu conídios a partir de hifas, e com virulência mais baixa.

Diferenças em relação à patogenicidade de isolados de *Colletotrichum kahawae* provenientes de diferentes regiões da África também foram verificados por Beynon *et al.* (1995), quando inoculados em hipocótilos de 8 semanas, de café cultivar Caturra, caracterizando os isolados como altamente agressivos, moderadamente agressivos, e confirmando a não patogenicidade de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, comumente encontradas em associação com a espécie patogênica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção de isolados de *Colletotrichum* sp. de café :

Os isolados de *Colletotrichum* sp. foram obtidos nos meses de Outubro a Dezembro de 1997, a partir de folhas, hastes e frutos verdes de café com sintomas do ataque do fungo, analisados na Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, e provenientes de diferentes cafezais de Minas Gerais e São Paulo (Tabela 1).

Secções do tecido infectado, obtidas em locais de lesões jovens (sem necrose), foram superficialmente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, transferidas para placa de Petri com meio de cultura MEA (Extrato de Malte-Agar), e incubadas por 7 dias em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C e luz alternada em período de 12 horas. Após constatação do fungo *Colletotrichum*, as colônias purificadas foram utilizadas para obtenção de culturas monospóricas e discos do micélio foram transferidos para tubos com água destilada esterelizada e armazenados a temperatura de 10 ± 2 °C, seguindo o método de Castellani, modificado por Figueiredo (1967).

5.2 Obtenção de culturas monospóricas

A partir de colônias puras de *Colletotrichum* cultivados em meio de cultura MEA, obteve-se uma suspensão de esporo pela adição de 20 ml de água destilada esterilizada em placas de Petri. Essa suspensão foi vertida em placas de Petri contendo meio Ágar-água (ágar 20g e água 1000 ml).

Após 24 horas, em capela de fluxo laminar, sob microscópio estereoscópico, transferiu-se individualmente os esporos germinados para placas de Petri contendo MEA. Para cada isolado, foram obtidas quatro culturas monospóricas.

TABELA 1: Identificação, procedência, e órgão afetado por oito isolados de *Colletotrichum* de café. UFLA-Lavras-MG. 1999

Número do Isolado	Procedência	Órgão com Sintoma
I-1	Uberlândia-MG	Haste
I-2	Varginha-MG	Haste
I-4	Boa Esperança-MG	Haste
I-5	Ibituruna-MG	Haste
I-7	Piunhi-MG	Fruto
I-7.1	Piunhi-MG	Folha
I-10	Cajuru-SP	Haste
I-11	Guaxupé-MG	Folha

5.3 Avaliação do crescimento micelial e capacidade de esporulação dos isolados em diferentes meios de cultura

O crescimento micelial dos isolados foi verificado em três diferentes meios de cultura: MEA (extrato de malte agar), BDA (Batata-dextrose-ágar) e GYA (glucose-levedura-ágar).

Discos de micélio obtidos das margens de colônias de *Colletotrichum* cultivadas em meio BDA em câmara de crescimento com ausência de luz a 20 ± 2 °C foram transferidos para placas de Petri contendo os meios de cultura citados anteriormente. As placas foram transferidas para BOD ausente de luz e para BOD com fotoperíodo de doze horas à temperatura de 20 ± 2 °C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 6 placas por tratamento. Para avaliação do crescimento micelial, fez-se medição diária de 2 diâmetros da colônia em posição ortogonal durante 10 dias após

inoculação. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado utilizando a fórmula de Maguire, adaptada por Oliveira (1991):

$$IVC = \Sigma (D - D_a) / N, \text{ onde}$$

IVC= Índice de velocidade de crescimento

D= Diâmetro médio atual

D_a= Diâmetro médio do dia anterior

N= Número de dias após a inoculação

Para análise estatística, os dados foram transformados em Arc. sen $\sqrt{X + 0,5 / 100}$.

Para verificação da capacidade de esporulação no 10º dia, transferiu-se 20 ml de água destilada esterelizada para cada Placa de Petri, obtendo-se uma suspensão de esporo, filtrada em gaze, e retirando-se uma alíquota de 10 µl para contagem do número de esporos/ml em câmara de Newbauer.

5.4 Dimensão dos conídios :

Os conídios foram obtidos a partir das culturas monospóricas descritas no item 5.2, desenvolvidos em meio MEA a 20 ± 22 °C, e medidos utilizando-se o micrômetro ocular de tambor de Huyghens, preparando-se 4 lâminas de cada isolado e medindo-se 25 conídios por lâmina, em objetiva de imersão (100X).

As características microscópicas observadas foram tamanho dos conídios em micra e a relação comprimento/largura, determinando a forma dos conídios, segundo Feitosa *et al.*(1977): Ccc = cilíndrico muito curto, relação menor que 2,00; Cc = cilíndrico curto, relação entre 2,00 e 2,50; C = cilíndrico, entre 2,50 e 3,00; f = fusiforme, entre 3,00 e 3,50; ff = fusiforme muito alongado, relação maior do que 3,5.

5.5 Testes de utilização de tartarato e citrato como fonte exclusiva de carbono

Para esse teste, utilizou-se como meio básico o meio B ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -1g, KCl -0,2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2g, H_2O -1l; Lynch *et al.*, 1981), suplementado com ácido cítrico ou tartarato de amônio (1% p/v). A cada combinação meio B + ácido cítrico e meio B + tartarato de amônio foi adicionada glucose (controle positivo), e a ausência de uma fonte adicional de carbono constou como controle negativo.

A todos os meios, foram adicionados 0,0005% (p/v) de bromocresol púrpuro e o pH ajustado para 4,5, seguido de esterilização em autoclave a 105 °C, por 20 minutos. Após esterilização, foram transferidos discos de micélio de 7 mm, provenientes de culturas de *Colletotrichum*, cultivados em meio B sem suplementação, solidificado com 1% (p/v) de agar Oxoid nº 3, por 7 dias, em BOD, de fotoperíodo de 12 horas a 22 ± 2 °C. As avaliações foram feitas por comparação visual do crescimento em relação ao controle positivo e negativo.

5.6 Teste de patogenicidade dos isolados

5.6.1 Inoculação em plântulas de cafeeiro

Para a formação de plântulas, foram utilizadas sementes da cultivar Mundo Novo LCP 379/19, previamente tratadas com PCNB (0,5g i.a/Kg semente), distribuindo-as em vasos de 5Kg contendo substrato plantmax e, após a germinação, foram deixadas 20 plântulas/vaso.

O teste foi conduzido em câmara climatizada a 22 ± 2 °C, seguindo o delineamento experimental de blocos casualizados com 5 repetições, onde a unidade experimental constou de um vaso com 20 plântulas.

Plântulas no estágio “orelha de onça”, aproximadamente seis semanas após a germinação, foram inoculadas através da pulverização de suspensão de conídios na concentração $\times 10^6$ esporos ml^{-1} , obtidos de culturas de

Colletotrichum mantidas em meio GYA; 24 horas antes da inoculação, as plântulas foram incubadas em câmara úmida no escuro. A inoculação foi feita por meio de um atomizador De Vilbss nº 15, mantendo as mesmas por mais 48 horas em câmara úmida até realizar uma segunda inoculação. Após 24 horas da 2ª inoculação, as plântulas foram expostas às condições normais da câmara climatizada (22 ± 2 °C), sendo a testemunha pulverizada com água destilada e esterilizada.

As avaliações foram feitas em intervalos de 5 dias, observando-se individualmente os sintomas da doença no hipocótilo das plântulas, seguindo a escala adaptada de Van Der Vossen, Cook e Murakuro(1976) (Tabela 2). As análises de variância do índice de doença (ID) foram feitas conforme fórmula proposta por Cirulli e Alexander, citado por Lima (1981).

$$ID = \frac{\sum (F \times V)}{(N \times X)} \times 100, \text{ onde}$$

F= Número de plântulas com determinado grau de infecção

V= Grau de infecção

N= Número total de plântulas inoculadas

X= Grau máximo de infecção

TABELA 2: Critério de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* sp. apresentado por plântulas de café. UFLA-Lavras-MG, 1999

Notas	Severidade/Sintomas
1	Ausência de reação visível
2	Lesões superficiais castanhas
3	Lesões mais profundas e escuras
4	Lesões escuras com início de estrangulamento
5	Estrangulamento mais pronunciado
6	Plântula morta

5.6.2 Inoculação de frutos verdes destacados de cafeeiro :

Para o ensaio com frutos verdes, foram utilizados frutos sadios em estágio verde cana, destacados da cultivar Mundo Novo LCP 379/19, conduzido em câmara climatizada de 22 ± 2 °C, seguindo o delineamento experimental de blocos casualizados com 5 repetições, sendo a unidade experimental uma caixa de Gerbox com 25 frutos.

Os frutos colhidos no campo foram lavados com detergente, hipoclorito de sódio 2% e colocados em um recipiente aberto à temperatura ambiente (22-25 °C) por dois dias; após esse período, os frutos que apresentaram lesões foram descartados. Os frutos sadios foram depositados em caixas plásticas (Gerbox), previamente desinfestada com álcool 50% e hipoclorito de sódio 2%, contendo areia úmida esterilizada durante 2 dias, a 120 °C, em autoclave, observando-se uma distância de 2,5 cm entre eles. Em seguida, efetuou-se a inoculação com uma gota (0,02 ml) da suspensão padronizada de esporos (2×10^6 conídios/ml), colocada na superfície de cada fruto com auxílio de uma micropipeta, sem ferirlos. A testemunha foi inoculada com água destilada e esterelizada.

As avaliações do número de frutos afetados foram feitas em intervalos de cinco dias após a inoculação, durante 30 dias. Para análise estatística, os dados foram transformados para $\text{Arc.sen } \sqrt{X + 0,5/100}$.

5.6.3 Patogenicidade em mudas

Foram inoculadas mudas com dois pares de folhas inteiramente formados da cultivar Mundo Novo LCP 379/19 sem e com ferimento, utilizando carburundun, seguindo a mesma metodologia para a inoculação em plântulas descrita no item 5.6.1. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 10 repetições, uma muda representando a unidade experimental, conduzido em condições de casa de vegetação.

O substrato foi constituído de sub-solo de um latossolo roxo (700 l) misturado com esterco de curral curtido (300 l), ambos previamente peneirados, ao qual adicionou-se 5 Kg de superfosfato simples e 0,5 Kg de cloreto de potássio, segundo recomendações de Van Raij *et al.* (1996).

Após 35 dias da inoculação, retirou-se o 1º par de folha inteiramente formado do ápice para a base em cada planta, avaliando-se o número médio de lesões formado por folhas, com o auxílio de um microscópio esteoroscópio. Para análise estatística, os dados foram transformados para $\sqrt{X + 0,5}$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Crescimento micelial e capacidade de esporulação em diferentes meios de cultura

Os isolados apresentaram índice de velocidade do crescimento micelial e capacidade de esporulação significância estatística, pelo teste F, a 1% de probabilidade, de acordo com o meio utilizado e com o sistema de luz empregado (Tabelas 3, 4, 5, e 6).

Na Tabela 3, observa-se que, no geral, o IVCN dos isolados foi maior em meio BDA, intermediário em MEA e menor em GYA; o I-7 apresentou menor IVCN tanto em meio BDA como em MEA (1,93 e 1,57 mm), enquanto que em GYA os menores valores foram registrados para os isolados I-1, I-7, I-2 e I-10 (1,88; 1,83; 1,79; 1,75 mm; respectivamente). Os resultados obtidos permitiram diferenciar 3 grupos distintos em MEA: os de crescimento mais rápido, obtidos de haste, os intermediários, obtidos de folhas e hastes, e o de crescimento lento, obtido de fruto. Todos os valores de IVCN verificados em MEA estão de acordo com os valores apresentados por Waller *et al.*, 1993 e Rodrigues *et al.*, 1991, para caracterizar a taxa de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum kahawae*.

Apenas o meio MEA é descrito na literatura para caracterizar *in vitro* o crescimento de isolados de *Colletotrichum* provenientes de café, principalmente o patógeno CBD, e ainda assim poucos trabalhos se referem a essa característica no estudo de patógenos. O meio BDA foi utilizado por ser um meio de rotina no Laboratório de Fitopatologia da UFLA e pode ser utilizado para maior produção de micélio dos isolados, já que apresentou as maiores taxas de IVCN em todos os isolados testados, enquanto o meio GYA é recomendado para produção de

micélio visando a extração de DNA (Sreenivasaprasad, Brown e Mills, 1993; Alfenas *et al.*, 1991; Beynon *et al.*, 1995).

TABELA 3: Índice de velocidade do crescimento de isolados de *Colletotrichum* sp. de café, em diferentes meios de cultura, independente do sistema de luz empregado. UFLA-Lavras-MG, 1999

Isolados	BDA	GYA	MEA	Médias
I-1	2,2337 Acd	1,8831 Acde	2,0535 Bb	2,0568 c
I-2	2,2295 Acd	1,7968 Ae	2,0258 Bb	2,0173 c
I-4	2,4994 Abc	2,3741 Ba	2,6467 Aa	2,5067a
I-5	2,8030 Aa	2,2883 Bab	2,8770 Aa	2,6561a
I-7	1,9307 Ae	1,8330 Ade	1,5785 Bc	1,7807 d
I-7.1	2,3979 Abc	2,0962 Bbcd	2,1594 Bb	2,2179 b
I-10	2,0344 Ade	1,7555 Be	1,9719 Ab	1,9205 cd
I-11	2,6307 Aab	2,1320 Babc	1,8948 Cb	2,2192 b
Médias	2,3449 A	2,0199 C	2,1510 B	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas e maiúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

CV=10,18.

Em relação ao sistema de luz utilizado, observa-se, na Tabela 4, que apenas o I-5 não apresentou diferença estatística quanto ao sistema de luz empregado, e o I-4 cresceu mais em escuro, enquanto que, para os outros isolados, o regime de fotoperíodo estimulou o crescimento micelial.

TABELA 4: Índice de velocidade de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* sp. de café em diferentes sistemas de luz, independente do meio de cultura utilizado. UFLA:Lavras-MG, 1999.

Isolados	Fotoperíodo	Escuro
I-1	2,2231 Abc	1,8904 Bbc
I-2	2,1138 Acd	1,9208 Bbc
I-4	2,2570 Bbc	2,7564 Aa
I-5	2,6180 Aa	2,6942 Aa
I-7	1,8602 Ae	1,7012 Bc
I-7.1	2,4464 Aab	1,9893 Bb
I-10	1,9976 Ade	1,8435 Bbc
I-11	2,5504 Aa	1,8881 Bbc
Médias	2,2583 A	2,0855 B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas e maiúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

CV=10,18.

Os dados obtidos em relação à capacidade de esporulação dos isolados em diferentes meios de cultura são apresentados na Tabela 5, e observa-se que, em geral, a maior capacidade de esporulação dos isolados ocorreu em meio GYA, seguido do meio MEA e do meio BDA, com exceção dos isolados I-4, I-7, I-10 e I-11, que não apresentaram diferença estatística em relação a essa variável. Rodrigues *et al.* (1991) relatam a variação da capacidade de esporulação, em meio MEA, de raças de *Colletotrichum coffeanum*, de acordo

com sua agressividade, apresentando os isolados testados valores acima dos relatados para raças virulentas.

O meio GYA foi o que propiciou maior capacidade de esporulação dos fungos, devendo portanto ser recomendado para obtenção de inóculo para testes de patogenicidade. Os maiores valores de esporulação nesse meio foram dos isolados I-1, I-5, e I-7.1 (33,02; 39,98; e 36,44 x 10⁵ esporos/ml, respectivamente).

TABELA 5: Capacidade de esporulação em nº de esporos x 10⁵/ml de isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes de cafeeiro em diferentes meios de cultura, independente do sistema de luz empregado. UFLA, Lavras-MG, 1999

Isolados	BDA	GYA	MEA	Médias
I-1	0,8854 Ba	33,0208 Aa	4,7083 Bb	12,8715ab
I-2	3,7083 Ba	18,0750 Ab	4,2500 Bb	8,6778 bc
I-4	3,9417 Aa	2,2083 Ac	6,7292 Aab	4,2931 c
I-5	2,0625 Ca	39,9833 Aa	20,8542 Ba	20,9667a
I-7	0,8924 Aa	5,3542 Abc	3,5625 Ab	3,2697 c
I-7.1	1,2500 Ba	36,4458 Aa	6,7417 Bab	14,8125 ab
I-10	0,1250 Aa	2,3542 Ac	0,4167 Ab	0,9653 c
I-11	0,6458 Aa	7,3708 Abc	2,2433 Ab	3,4200 c
Médias	1,6889 C	6,1882 B	18,1016 A	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas e maiúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

CV=13,19

Quanto ao sistema de luz empregado, verifica-se, na Tabela 6, que os isolados I-5 e I-7.1 apresentaram maior capacidade de esporulação em sistema de fotoperíodo, enquanto que, para os demais isolados, o sistema de luz empregado não influenciou na capacidade de esporulação.

TABELA 6: Capacidade de esporulação em nº de esporos x 10⁵/ml de isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes de cafeiros em diferentes sistemas de luz, independente do meio de cultura utilizado. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Isolados	Fotoperíodo	Escuro
I-1	14,4028 Abc	11,3403 Aab
I-2	7,9667 Acd	9,3889 Aab
I-4	6,1111 Ac	2,4750 Aab
I-5	2,5833 Aa	13,350 Ba
I-7	4,4144 Acd	2,1250 Aab
I-7.1	24,8833 Aab	4,7417 Bab
I-10	0,3056 Ad	1,6250 Ab
I-11	3,2011 Acd	3,6389 Aab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas e maiúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

CV=13,19

6.2 Dimensão de conídios

Como mostra a Tabela 7, apenas os isolados I-1 e I-5 produziram conídios do tipo Cc, enquanto os demais isolados produziram conídios do tipo C. Resultados similares foram encontrados por Feitosa *et al.* (1977), em 24 de 37 cepas de *Colletotrichum* estudadas no estado de São Paulo, porém com conídios mais largos (4,08-7,41 μ) que os conídios dos isolados em estudos.

O isolado I-11 apresentou a menor média tanto de comprimento como de largura (11,76 x 4,46 μ); o maior comprimento foi verificado no isolado I-10 (12,70 μ) e maior largura nos isolados I-1 e I-5 (5,39 μ). Os isolados apresentaram uma variação de 10,11-14,52 x 3,06-6,47 μ , que está dentro da variação encontrada por Vargas e Gonzalez (1972), no estudo do agente causal da mancha manteigosa na Costa Rica, mas abaixo da variação encontrada por Mac Donald (1926) e Dorizzotto (1993) para conídios de *Colletotrichum coffeanum*. Entretanto, os isolados I-1, I-4, I-5, I-7, e I-10 apresentaram comprimento médio que estão dentro da variação encontrada por Noack (1902), e apenas I-4 e I-10 se enquadram na variação encontrada por Waller *et al.* (1993) para o agente causal da CBD, porém com conídios mais largos.

TABELA 7: Características microscópicas dos isolados de *Colletotrichum* provenientes de café. UFLA: Lavras-MG, 1999.

Isolado	Tamanho dos conídios (μm)		Relação Comp/Larg	Forma dos conídios
	Taxa de Variação (Comprimento x largura)	Média*		
I-1	10,32-14,52 x 3,77-6,47	12,09 x 5,39	2,24	Cc
I-2	10,11-12,24 x 3,06-5,55	11,94 x 4,30	2,77	C
I-4	10,89-14,09 x 3,70-6,05	12,50 x 4,84	2,58	C
I-5	10,46-14,24 x 3,77-6,47	12,26 x 5,39	2,27	Cc
I-7	10,82-13,52 x 3,70-5,55	12,32 x 4,76	2,58	C
I-7.1	10,32-13,67 x 3,20-5,69	11,97 x 4,18	2,86	C
I-10	10,75-13,81 x 3,41-5,55	12,70 x 4,46	2,84	C
I-11	10,32-14,24 x 3,20-5,48	11,76 x 4,04	2,91	C

* Média de 100 conídios

6.3 Utilização de tartarato, citrato como fonte exclusiva de carbono

Com exceção do isolado I-2, todos os demais isolados foram capazes de utilizar tartarato e citrato como fonte exclusiva de carbono (Tabela 8), característica encontrada por Waller *et al.* (1993), para os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de café, sugerindo que esta característica esteja relacionada com a capacidade saprofítica dos isolados.

Entretanto, esta característica não deve ser utilizada exclusivamente no diagnóstico da espécie, pois, segundo Bridge, 1985, fatores como o pH podem interferir no crescimento do controle negativo. Este fato pode ter ocorrido com o isolado I-2, que apresentou resultado variável, não sendo capaz de utilizar tartarato, mas capaz de utilizar citrato.

TABELA 8: Utilização de tartarato (T) e citrato (C) por isolados de *Colletotrichum* provenientes de café após 7 dias de incubação a 25 °C em fotoperíodo. UFLA:Lavras-MG, 1999

	I-1	I-2	I-4	I-5	I-7	I-7.1	I-10	I-11
T0	+	-	+	+	+	+	+	+
C0	+	+	+	+	+	+	+	+
TG	+	+	+	+	+	+	+	+
CG	+	+	+	+	+	+	+	+

T0- Tartarato e ausência de glicose; C0- citrato e ausência de glicose; TG- tartarato e glicose; CG- citrato e glicose

(+) utilização do substrato; (-) não utilização do substrato.

6.4 Teste de patogenicidade em plântulas

Os isolados estudados apresentaram patogenicidade às plântulas de café cultivar Mundo Novo, no estágio "orelha de onça"; entretanto, não foi verificada morte de plântulas até 30 dias após a inoculação das mesmas. Resultados similares foram verificados por Beynon *et al.* (1995), em plântulas de café cultivar Caturra inoculados com isolados de *C. kahawae*, provenientes de diferentes regiões da África. Vale ressaltar que, na maioria dos testes de patogenicidade com isolados de *C. kahawae* em plântulas de café, são verificadas mortes dessas plântulas; em geral, após 15 dias da inoculação (Van der Vossen *et al.*, 1976; Waller *et al.*, 1993).

Neste ensaio, os sintomas que ocorreram com maior frequência foram os correspondentes à nota 2 (lesões superficiais castanhas) e nota 3 (lesões mais profundas e escuras) que, em alguns casos, evoluíram para lesões com início de

estrangulamento (nota 4) e estrangulamento mais pronunciado (nota 5). É importante ressaltar que além de morte de plântulas, lesões profundas e escuras também são encontradas em plântulas inoculados com *C. kahawae* (Gielink e Vermeulen, 1983).

Os índices de doença calculados encontram-se na Tabela 9 e verifica-se que 10 dias após a inoculação, os isolados I-1, I-4, I-5 e I-11 já apresentavam sinais de patogenicidade, apesar de não diferiram significativamente da testemunha. A partir do 15º dia, todos os isolados se apresentaram patogênicos, com índices de doença superior à testemunha apenas para os isolados I-1, I-4, I-7.1, I-5, e I-11. A partir do 20º dia, foi verificada patogenicidade superior para todos os isolados testados.

No Brasil, isolados de *Colletotrichum* suspeitos de serem relacionados ao CBD são testados em mudas e principalmente em frutos verdes de café, apenas Dorizzotto (1993) relata patogenicidade em plântulas de café 25 dias após a inoculação, enquanto que, na Costa Rica, isolados de *Colletotrichum* obtidos de sintomas de mancha manteigosa só se mostraram patogênicos a plântulas de café provenientes de sementes de plantas enfermas (Vargas e Gonzalez, 1972).

TABELA 9: Índice de doença (%) em diferentes dias de avaliação, apresentado por plântulas de café cv. Mundo Novo quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* de café em diferentes dias de avaliação. UFLA: Lavras-MG, 1999

ÍNDICE DE DOENÇA (%)*						
DIAS APÓS A INOCULAÇÃO						
	05	10	15	20	25	30
Test.	5,73 1	5,73 1	5,73 1	5,73 1	5,73 1	5,73 1
I-1	5,73 1	7,95 1	18,04 3	18,69 2	22,89 3	24,55 2
I-2	5,73 1	5,73 1	11,57 2	15,39 2	19,04 3	21,60 2
I-4	5,73 1	8,54 1	13,96 2	16,16 2	19,89 3	21,70 2
I-5	5,73 1	9,06 1	12,86 2	15,37 2	20,75 3	21,57 2
I-7	5,73 1	5,73 1	12,15 2	13,28 2	16,41 2	19,70 2
I-7.1	5,73 1	5,73 1	13,47 2	15,17 2	19,27 3	21,27 2
I-10	5,73 1	5,73 1	10,88 2	13,16 2	15,07 2	17,30 2
I-11	5,73 1	7,20 1	12,71 2	16,47 2	19,30 3	20,07 2

* Dados transformados para $\text{Arc.sen } \sqrt{X + 0,5} / 100$.

Tratamentos dentro do mesmo grupo na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Test.=Testemunha

CV= 19,17

Através do cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), observa-se que todos os isolados apresentaram índice de doença superior à testemunha, e não houve diferença estatística entre os isolados, com exceção dos isolados I-1 e I-10, que diferiram entre si (Figura 1). Pelos resultados obtidos, não se pode afirmar que a patogenicidade de isolados de

Colletotrichum esteja ligada à origem de seus isolamentos, pois apesar dos isolados testados serem obtidos de órgãos diferentes de café, todos apresentaram o mesmo índice de doença.

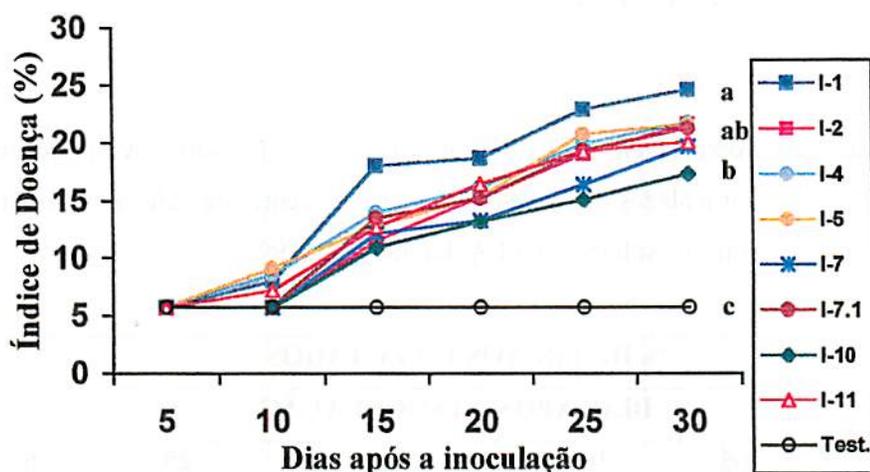


FIGURA 1: Área abaixo da curva de progresso da doença dos isolados de *Colletotrichum* provenientes de café em teste de patogenicidade em plântulas de seis semanas de café cv. Mundo Novo.

6.5 Teste de patogenicidade em frutos verdes

Os resultados da patogenicidade dos isolados em fruto verde encontram-se na Tabela 10. Os primeiros sintomas foram observados com 10 dias e apenas os isolados I-1, I-2, I-5, I-7.1 apresentaram patogenicidade aos frutos verdes, mas não diferiram significativamente da testemunha. Aos 15 dias, todos os isolados produziram lesões nos frutos, apenas os isolados I-10 e I-11 não

diferiram significativamente da testemunha. A partir do 20 ° dia, todos os isolados apresentaram porcentagem de infecção superior, mantidos até a última avaliação, apresentando os isolados I-1, I-5, I-7 e I-7.1 a maior porcentagem de frutos com lesão aos 30 dias após a inoculação (45,28; 44,69; 51,27; 45,44%, respectivamente); mas, da mesma forma, não foi possível associar o grau de patogenicidade à origem de seus isolamentos.

TABELA 10: Porcentagem média de frutos de café cv. Mundo Novo infectados por isolados de *Colletotrichum* provenientes de café em diferentes dias de avaliação. UFLA: Lavras-MG, 1999

% DE FRUTOS INFECTADOS *												
DIAS APÓS A INOCULAÇÃO												
	05		10		15		20		25		30	
Test.	4,05	1	4,05	1	4,05	1	4,05	1	4,05	1	4,05	1
I-1	4,05	1	7,27	1	15,91	2	23,56	2	32,12	3	45,28	3
I-2	4,05	1	6,10	1	11,37	2	18,17	2	23,25	2	34,00	2
I-4	4,05	1	4,05	1	12,55	2	17,35	2	24,58	2	38,79	2
I-5	4,05	1	6,10	1	12,31	2	18,46	2	27,19	2	44,69	3
I-7	4,05	1	4,05	1	13,42	2	24,21	2	33,75	3	51,27	3
I-7.1	4,05	1	6,10	1	14,36	2	22,59	2	34,02	3	45,44	3
I-10	4,05	1	4,05	1	9,32	1	20,58	2	27,07	2	38,23	2
I-11	4,05	1	4,05	1	8,15	1	17,65	2	23,07	2	35,13	2

* Dados transformados para Arc.sen. $\sqrt{X+0,5}/100$.

Tratamentos dentro do mesmo grupo na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Test.=Testemunha

CV=20,29

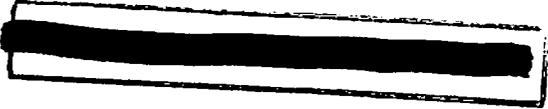
~~_____~~

A maior porcentagem de frutos infectados foi de 51,27%, apresentada pelo isolado I-7. Esse valor foi alto, se comparado com os resultados obtidos por Dorizzotto (1993) para a mesma cultivar, mas baixo se compararmos com outras cultivares testadas pelo autor, que chegou a obter 71% de infecção com *C. gloeosporioides* aos 35 dias de inoculação, e Figueiredo e Mariotto (1978), que obtiveram 88% de infecção, mas com inóculo superior a 10^8 esporos/ml. Feitosa *et al.* (1977) obtiveram um máximo de 23% de frutos afetados em testes com 70 isolados de *Colletotrichum* obtidos de ramos e frutos de cafeeiros, enquanto que Almeida *et al* (1985) não obtiveram resultados de patogenicidade positivo.

A porcentagem de infecção observada nesse ensaio não se assemelha aos resultados descritos na literatura para isolados de *Colletotrichum kahawae*, agente da CBD, provenientes de cafezais africanos. Rodrigues *et al.* (1991) obtiveram 90,7%, 94%, e 99% de infecção para isolados do Quênia, Angola e Malawi, respectivamente, aos 12 dias de inoculação. Além disso, as lesões obtidas no fruto foram superficiais, não podendo ser classificadas como lesões ativas descritas para o CBD (Massaba e Waller, 1992), mas sim como lesões tipo “sarna” (Muller, 1970) por ser superficial e apresentar acérvulos. Resultados similares foram obtidos por Dorizzotto (1993), para isolados de Minas Gerais, e por Vargas e Gonzalez (1972) na Costa Rica.

6.6 Teste de patogenicidade em mudas

No 1º ensaio de patogenicidade de mudas, efetuada sem fermento, não foram observadas lesões nas folhas, nem necrose de ponteiros. No 2º ensaio, em que foram efetuados fermentos nas folhas antes da inoculação, apenas uma muda das 10 inoculadas com o isolado I-2 apresentou queima de folíolos, causado por *Colletotrichum*, confirmado após isolamento *in vitro*. Algumas



manchas em folhas foram observadas para os isolados I-1, I-4, I-11 e I-7, mas que não apresentaram evolução e não permitiram sua quantificação.

Segundo Zambolim *et al.* (1997), no Brasil, o fungo *Colletotrichum* só consegue colonizar tecidos que sofreram algum tipo de injúria, seja ela mecânica, física ou química, condição essa necessária para reprodução dos sintomas em condições de laboratório. Entretanto, resultados positivos de manchas em folhas de cafeeiro foram obtidos por Dorizzotto (1993) e por Vargas e Gonzalez (1972), e necrose de ponteiros por Silva *et al.* (1998).

Os resultados variáveis quanto à reprodução dos sintomas, tanto de manchas em folhas como necrose de ponteiros, podem estar relacionados a algum fator condicionante no campo que favorece o aparecimento da doença, como deficiência nutricional da planta e condições climáticas adversas, conforme relatado por Bittancourt (1958b). Há necessidade de estudos que relatem a associação de algum fator que predisponha a planta ao patógeno, ligado às condições de cultivo, ou à resistência ou susceptibilidade dessas plantas, já que dentro de um mesmo cafezal são observadas plantas com ataque generalizado da doença e outras que não apresentam nenhum sinal de infecção.

Outro fato que pode estar associado à ausência de reprodução dos sintomas em condições de laboratório é que a probabilidade do isolamento de estirpes patogênicas de *Colletotrichum*, quando feito a partir de lesões velhas, pode ser muito pequena, uma vez que a população de saprófita encontra-se em maior proporção (Waller, 1972). Assim, é necessário fazer isolamentos assim que aparecerem os primeiros sintomas em campo, na tentativa de se obter as cepas patogênicas, o que pode ser dificultado pela falta de troca de informações entre produtores e pesquisadores.

7 CONCLUSÕES

1. Os isolados apresentam taxa de crescimento micelial lenta para os três meios testados, sendo menor em meio GYA, seguida de MEA e BDA. A capacidade de esporulação foi maior em meio GYA, seguido de MEA e BDA, com os maiores valores observados nos isolados I-1, I-5, e I-7.1.
2. Em relação ao sistema de luz empregado o regime de fotoperíodo estimulou o crescimento micelial dos isolados, com exceção dos isolados I-4, estimulado pelo escuro, e I-5, que não apresentou diferença estatística quanto ao sistema de luz empregado. O sistema de fotoperíodo estimulou a capacidade de esporulação dos isolados I-5 e I-7.1 e não influenciou na capacidade de esporulação dos demais isolados.
3. Os isolados produziram conídios do tipo C (cilíndrico), e apenas I-1 e I-5 produziram conídios do tipo Cc. E, no geral, a variação ficou entre 10,11-14,52 x 3,06-6,47 μ .
4. Todos os isolados foram capazes de utilizar taratarato e citrato como fonte exclusiva de carbono. Resultado variável foi observado para o isolado I-2.
5. Os sintomas de infecção em frutos verdes e plântulas de café foram observados aos 10 dias após a inoculação, com porcentagem máxima de infecção obtida de 24,55%, para plântulas, e 51,27% para frutos verdes aos 30 dias.
6. Nenhum dos isolados foi patogênico à mudas, com ou sem ferimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- ALMEIDA, S. R.; MANSK, Z.; MATIELO, J. B.; MULLER, R. R. A Observações preliminares sobre queda dos frutos sob suspeita de ataque de *Colletotrichum* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7, 1985, Araxá. Resumos... Rio de Janeiro: IBC, 1985. p.323-326.
- BEYNON, S.M.; CODDINGTON, B.G.; LEWIS, B.G.; VARZEA, V. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v.46, pg. 457-470, 1995.
- BITANCOURT, A. A. Um inquérito sobre a seca dos ramos do cafeeiro. *O Biológico*, São Paulo, v.24, n.1, p.19-22, Jan. 1958.
- BRIDGE, P.D. An evaluation of some physiological and biochemical methods as na aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *Fasciculata*. *Journal of General Microbiology*, Colchester, v.131, p.1887-1895, 1985.
- DORIZZOTTO, A. Caracterização Morfológica e Patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1993. (Dissertação-Mestrado em Fitopatologia).
- FEITOSA, M.I.; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; ROSSETI, V.; LEITE, Y.R.; Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.44, n.1/2, p. 33-54, Jan-Jun 1977.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógeno em plantas. *O Biológico*, São Paulo, v.33, n.1, p.9-13, Jan. 1967.
- FIGUEIREDO, M.B.; MARIOTTO, P.R. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *O Biológico*, São Paulo, v.24, p.25-26, 1978.

- GIELINK, A.J.; VERMEULEN, H. The ability of American and African *Colletotrichum* isolates to cause coffee berry disease symptoms and the association of some isolates with *Glomerella cingulata*. *Netherland Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.89, p.188-190, 1983.
- LIMA, E.F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *Cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. Viçosa: UFV, 1981, 47p. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia).
- LYNCH, J.M.; SLATER, J.H.; BENNET, J.A.; HARPER, S.H.T. Cellulose activities of some aerobic micro-organisms isolated from soil. *Journal of General Microbiology*, Colchester, v.127, n.2, p.231-236, Dec.1981.
- MAC DONALD, J.A.; Preliminar account of disease green coffee berries in Kenya colony. *Transaction of the British Mycological Society*, London, v.2, p.145-54, 1926.
- MASSABA, D.; WALLER, J.M.; Coffee berry disease : the current status. In : BAILEY, J.A; JEGER, M.J. (eds). *Colletotrichum- Biology, Pathology and Control*. Wallingford, U.K : CAB International, 1992. p.337-249.
- MULLER, R.A. L' evolution de l' anthracnose des baies du caféier d' arabie (*Coffea arabica*) due à une forme du *Colletotrichum coffeanum* Noack du Cameron. *Café Cacao Thé*, Paris, v. XIV, n.2, Juin 1970.
- 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 e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). Lavras: UFLA, 1991, 111p. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia).
- RODRIGUES, C.J.; VARZEA, V.M.P.; HINDORF, H.; MEDEIROS, E.F. Strains of *Colletotrichum coffeanum* Noak causing coffee berry disease in Angola and Malawi with characteristics different to the Kenya strain. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.131, pg. 205-209, 1991.

- SILVA, C.C.N.; JULIATTI, F.C.; POZZA, E.A.; GIOVANINI, M.P.; SILVA, S.A. da. Características fisiológicas e genéticas de isolados de *Colletotrichum* sp. Coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica*) de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24, 1998, Poços de Caldas. **Trabalhos.....**, 1998. p. 231-214.
- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A E.; MILLS, P.R.; Coffe berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycological Research*, Cambridge, v.97, n.8, p. 995-1000, 1993.
- VAN DER VOSSEN, H.A.M.; COOK, R.T.A.; MURAKURO, N.W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noack (*sensu* Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. *Euphytica*, Wageningen, v.25, p.733-745, 1976.
- VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (eds). **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed.. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundação IAC, 1996. n. 100, 285p.
- VARGAS, E.; GONZALEZ, L. C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. *Turrialba*, San Jose, v.22, n.2, 1972.
- WALLER, J.M. Water-borne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, v.71, p.1-8, 1972.
- WALLER, J.M.; BRIDGE, P.D.; BLACK, R.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research*, Cambridge, v.97, n.8, pg 989-994, Aug. 1993.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.) Controle de Doenças. In: VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, L. (eds). **Controle de Doenças de Plantas de Grandes Culturas**. Viçosa: F.X.R. do Vale, 1997, Cap.3.p.83-180.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* EM CAFEIEIRO ATRAVÉS DE PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE ISOENZIMAS

1 RESUMO

NECHET, K. de L. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* em cafeeiro através de padrões eletroforéticos de isoenzimas. . In: NECHET, K. de L. Caracterização Biológica e Isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 1999. p. 49-66. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia)*

Marcadores protéicos, na maioria isoenzimas, vêm sendo utilizados como uma ferramenta adicional na taxonomia de fungos. O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade dos padrões de eletroforese das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP) e malato desidrogenase (MDH) na diferenciação dos isolados patogênicos de *Colletotrichum* de um isolados saprófita, ambos obtidos de café. A extração foi feita adicionando-se 300 µl do tampão Tris-Hcl pH 8,0 em 50 mg do micélio, obtido a partir de culturas crescidas em meio BDA, por 5 dias, a 22 ± 2 °C, e mantidos a 4 °C por 12 horas. O sobrenadante obtido por centrifugação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, sistema descontínuo, em sistema vertical, a 150V e 4 °C por 4 horas. Após revelação, para as enzimas ADH, EST, ACP e MDH os padrões obtidos foram comparados e os resultados permitiram verificar a viabilidade do uso de isoenzimas na diferenciação de isolados patogênicos dentro da população de *Colletotrichum* em café, apresentando o isolado saprófita bandas características nos padrões de eletroforese das enzimas ADH, ACP e EST. Não houve relação entre os padrões obtidos e a origem dos isolados, mas foi possível relacioná-los com a patogenicidade dos isolados testados.

Comitê Orientador: Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Maria das Graças Guimaraes Carvalho Vieira – UFLA.

2 ABSTRACT

Nechet, K de L. **Characterization of isolates of *Colletotrichum* in coffee plants through electrophoresis patterns of isoenzymes.** In: Nechet , K de L. In: **Biological and isoenzymatic characterization of isolates of *Colletotrichum* in coffee plants (*Coffea arabica* L.).** Lavras: UFLA, 1999. p. 49-66. (Dissertation-Master of Science in Phytopatology).

Protein markers, most isoenzymes, have been utilized as an additional tool in fungus taxonomy. The objective of this work was to assess the viability electrophoresis pattern of the isoenzymes alcohol deshydrogenase (ADH), esterase (EST) acid phosphatase (ACP) and malate desidrogenase (MDH) in the differentiation of the pathogenic isolates of *Colletotrichum* from a saprophyte isolate, both obtained from coffee. Extraction was done by adding 300 µl of the Tris-Hcl buffer, pH 8.0 in 50 mg of the mycelium, obtained from cultures grown in BDA medium, for 5 days, at 22 ± 2 °C, and kept at 4 °C for 12 hours. The supernatant obtained by centrifugation was submitted to electrophoresis in polyacrylamide gel, discontinuous system, in vertical system at 150 V and 4 °C for 4 hours. After stained, for ADH, EST, ACP and MDH enzymes, the patterns obtained were compared and the results enabled to verify the viability of the use of isoenzymes in the differentiation of pathogenic isolates within a *Colletotrichum* population in coffee, the saprophyte isolate presenting the characteristic bands in the electrophoresis pattern of ADH, ACP and EST enzymes. There was no relationship among the patterns obtained and the origin of the isolates, but it was possible to relate them with the pathogenicity of the isolates tested.

Guidance Committee: Mario Sobral de Abreu - UFLA (Adviser), Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira-UFLA

3 INTRODUÇÃO

Caracteres morfológicos foram, por longo período, as únicas ferramentas disponíveis e usadas na identificação e taxonomia de fungos fitopatogênicos, mas que em alguns casos deixavam a desejar, principalmente na diferenciação de espécies, uma vez que a maioria dos estudos são feitos *in vitro*. Isto acarreta numa grande variabilidade do fungo devido à influência do meio ambiente, fato esse observado com *C. kahawae*, que quando cultivado sucessivamente em meio de cultura torna-se indistinguível das formas saprófitas de *Colletotrichum* encontrados em cafeiros.

Com o advento da biologia molecular, novas técnicas tornaram-se disponíveis visando, no caso da fitopatologia, diagnósticos de maior eficácia, rapidez e especificidade. Essas técnicas são baseadas no uso de marcadores protéicos, representados em sua maioria por isoenzimas, e no de marcadores de DNA, através do uso de enzimas de restrição para fragmentar o DNA (RFLPs), amplificação enzimática de DNA (PCR), bem como a amplificação arbitrária de fragmentos de DNA (RAPDs, AP-PCR, DAF), o que permite o exame direto do genótipo dos indivíduos, além de um número quase ilimitado de polimorfismo poder ser detectado.

Dentre essas técnicas, destaca-se o uso de marcadores protéicos, por apresentar, entre outras vantagens, ser co- dominante, o que permite identificar genótipos homozigotos e heterozigotos num determinado loco; a detecção de muitos indivíduos para vários loci de aloenzimas dentro de um curto espaço de tempo, ser uma técnica de baixo custo, acessível e fornecer ampla informação genética. Apesar de ser limitante em outros aspectos, como cobertura completa do genoma, detecção de diferenças apenas significantes na estrutura da enzima, e sofrer influências das condições ambientais na atividade enzimática, essa

técnica vem sendo bastante utilizada como uma ferramenta adicional não só na taxonomia de fungos, mas também de outro patógenos.

O objetivo do trabalho foi verificar a viabilidade da análise eletroforética de isoenzimas na diferenciação de isolados patogênicos de *Colletotrichum* sp quando comparados com um isolado saprófita e diagnosticado como *C. gloeosporioides*, ambos obtidos de cafeeiro, além de verificar a relação dos padrões obtidos com a origem e patogenicidade dos isolados.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Isoenzimas são definidas como múltiplas formas moleculares de uma única enzima, geralmente similares, quando não idênticas, em suas propriedades enzimáticas, mas diferentes quanto à composição do aminoácido e conseqüentemente diferentes na sequência nucleotídica do DNA, que codifica para a proteína (Micales e Bonde, 1994), o que permite verificar diferenças na mobilidade quando submetidos a um campo elétrico (Micales, Stipes e Bonde, 1987; Bonde, Micales e Peterson, 1993). O número de isoenzimas de uma determinada enzima está relacionado ao número de compartimentos subcelulares onde a mesma reação catalítica é realizada (Gottlieb, 1982).

Alguns trabalhos demonstram que padrões de proteína total são úteis na identificação de espécies dos gêneros *Pythium* (Clare, 1963), *Phytophthora* (Hall, Zentmyer e Erwin, 1969; Kaosiri e Zentmyer, 1980), *Cylindrocladium* (Moreira, 1989; Moreira e Alfenas, 1985), e *Taphrina* (Snider e Kramer, 1974), mas observa-se que as diferenças interespecíficas são maiores que as intraespecíficas (Gill e Zentmyer, 1978). Alguns autores afirmam que a técnica de isoenzimas oferece vantagens em relação à eletroforese de proteína total, por apresentar bandas menos complexas, sendo mais fáceis de diferenciar e interpretar; além disso, as bandas são obtidas em relação à função protéica e não com base nas suas propriedades físicas, como ocorre em proteína total (Nygaard *et al*, 1989; Boisselier-Dubayle, 1983).

Muitos autores vêm adotando a técnica de eletroforese de isoenzimas como uma ferramenta adicional nos estudos taxonômicos na diferenciação de uma gama de espécies fúngicas como *Aspergillus* (Nealson e Garber, 1967), *Penicillium* (Cruickshank e Pitt, 1987), *Trichoderma* e *Gliocladium* (Stasz, Weedwwn e Harman, 1988), *Colletotrichum* (Bonde, Peterson e Mass, 1991),

Colletotrichum gossypii e seu variante *cephalosporioides* (Vieira, 1996). Outros estudos têm proporcionado informações genéticas necessárias para separar *formae speciales* de *Phytophthora megasperma* (Nygaard *et al.*, 1989), *Puccinia sorghi* (Bergquist e Prior, 1984), *Phyllotopsis nidulana* (Boisselier-Dubayle, 1983), *Fusarium oxysporum* (Bosland e Williams, 1987).

Alfenas, Jeng e Hubbes (1984) verificaram indicação de que isolados de *Cryptonectria cubensis* com mesmos padrões de isoenzimas esterase, peroxidase, fosfoglucomutase e hexoquinase mostraram, em geral, um grau de virulência similar à *Eucalyptus* spp; diferenciação de isolados agressivos e não agressivos também foram observados por Bernier, Jeng e Hubbes (1983), para *Ceratocystis ulmi*. Entretanto, não foi detectada associação entre padrões de isoenzimas e grupos de virulência de *C. gloeosporioides* em *Stylosanthes guianensis* (Lenné e Burdon, 1990).

Em muitos casos, o uso de isoenzimas permite diferenciar isolados de uma mesma espécie provenientes de diversas origens geográficas, identificando assim sua origem e disseminação, requisitos para o estudo da epidemiologia do patógeno (Micales e Bonde, 1994). Fato demonstrado, por exemplo, para *Puccinia recondita*, nos Estados Unidos (Burdon e Roelfs, 1985) e *P. graminis* f. sp. *tritici*, na Austrália (Burdon *et al.*, 1982).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção do micélio:

Os isolados utilizados nesse ensaio foram os mesmos dos teste de patogenicidade, com inclusão de um isolado saprófita de *C. gloeosporioides* denominado I-12, proveniente de manchas de folhas de café (Tabela 11). Inicialmente, determinou-se a curva de crescimento micelial dos isolados em meio líquido GYA (glucose-yeast-agar), de acordo com o procedimento de Alfenas *et al.* (1991). Para a produção do micélio, discos da colônia, de 7 mm de diâmetro, obtidos a partir de culturas puras dos isolados, cultivados por sete dias em meio BDA (batata-dextrose-agar) a 22 ± 2 °C, em escuro, foram transferidos para o centro de placas de Petri (9x9 cm) contendo meio GYA e papel celofane tratado com EDTA 1mM e esterilizado segundo metodologia descrita por Hilbert (1985), citado por Carvalho (1994). Após 5 dias de incubação a 22 ± 2 °C, no escuro, o micélio foi raspado com auxílio de uma alça de platina, transferido 50 mg para eppendorfs de 1,5 ml e mantidos em freezer a -20 °C até proceder-se a extração de proteínas.

5.2 Extração e eletroforese de isoenzimas

Aos 50 mg, foram adicionados 300 µl da solução extratora (Tris-HCl pH 8,0 a 0,2M; PVP 0,4%; PEG 0,4%; EDTA 1mM; H₂O 200ml) + 0,1% de β mercaptoetanol em cada eppendorf, mantidos sob banho de gelo para evitar desnaturação das enzimas. O micélio foi macerado com auxílio de uma haste de teflon, e mantido em geladeira a 4 °C por 12 horas. Vencido este período, foram

centrifugados a 14.000 x g por 60 minutos, à mesma temperatura, para obtenção do extrato protéico livre de detritos miceliais.

A eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida, sistema descontínuo. O gel separador a 7,5% constituiu-se de 3ml de Tris-HCl pH 8,9, 7,5ml de solução acrilamida 30%, 19,3ml de H₂O destilada, 100 µl de solução de persulfato de amônia a 10% e 10 µl de TEMED. A solução foi homogeneizada e, imediatamente após a adição do TEMED, vertida entre as placas de vidro de 32x29x14 cm até 4,5 cm da borda superior, completando com água o espaço entre as duas placas para uniformização da parte superior do gel. Após polimerização, à temperatura ambiente (15-20 minutos), a água foi removida por inversão da placa e adicionado o gel concentrador a 3,5%, constituído de 1,5ml de Tris-HCl pH 6,8; 1,75ml de solução acrilamida 30%; 11,65 ml de H₂O destilada; 50 µl de solução de persulfato de amônia a 10% e 10 µl de TEMED. O pente de teflon foi retirado após a polimerização e as cavidades formadas lavadas com tampão de corrida e removidas por inversão da placa.

Foram aplicados 40 µl de cada amostra por cavidade do gel, e o volume completado com a solução diluída (1:10) do tampão do tanque Tris-Glicina pH 8,9 (63,2g Tris base; 39,9g glicina; H₂O destilada 1000ml). Nos tanques superior e inferior, foram adicionados, respectivamente, 500 e 1000ml da mesma solução, diluída para conduzir a corrente elétrica. As placas contendo os géis foram colocadas em um sistema vertical SE 600 Pharmacia Biotech, e foram mantida em geladeira, a 4 °C, durante a eletroforese, que foi conduzida a 75V por 1 hora e 150 V por mais 3 horas.

Os géis foram revelados para as enzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), e malato desidrogenase (MDH), conforme descrito por Alfenas *et al.*(1991). Após revelação, os géis foram

lavados com água destilada, imersos em uma solução de glicerol 10%. Os géis foram secos utilizando-se o método do bastidor, descrito por Alfenas (1998).

TABELA 11: Identificação, procedência e órgão de origem dos isolados de *Colletotrichum* provenientes de cafeeiro. UFLA: Lavras-MG, 1999.

Número do Isolado	Procedência	Órgão com Sintoma
I-1	Uberlândia-MG	Haste
I-2	Varginha-MG	Haste
I-4	Boa Esperança-MG	Haste
I-5	Ibituruna-MG	Haste
I-7	Piunhi-MG	Fruto
I-7.1	Piunhi-MG	Folha
I-10	Cajuru-SP	Haste
I-11	Guaxupé-MG	Folha
I-12	Lavras-MG	Folha

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para enzima álcool desidrogenase, foram detectadas 3 bandas entre os 9 isolados utilizados. A banda 1 não foi detectada nos isolados I-5 e I-12, enquanto a banda 2 foi característica apenas do isolado saprófita (I-12), permitindo diferenciá-lo dos demais isolados patogênicos; a banda 3 apresentou baixa atividade no gel e não foi detectada para os isolados I-4, I-7.1 e I-12 e foi a única banda presente no isolado I-5 (Figura 2A).

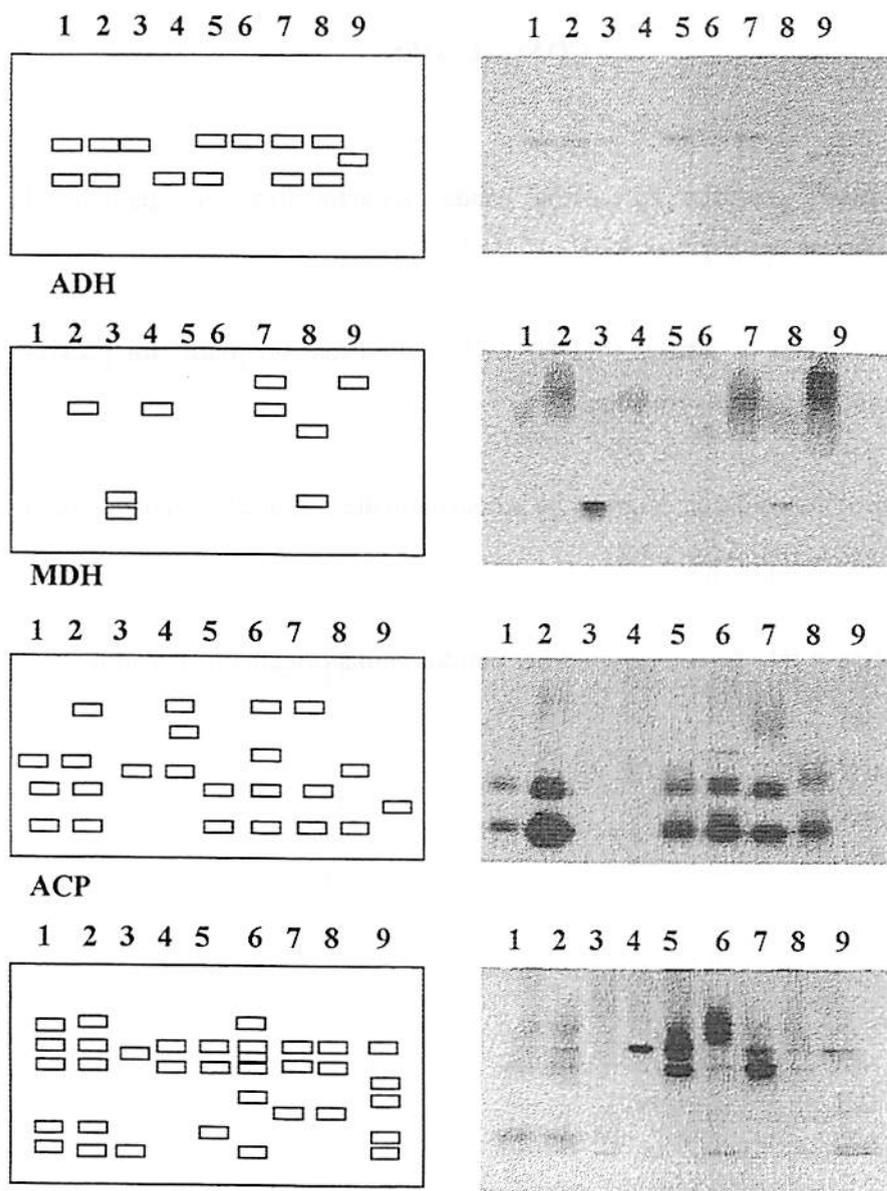
Dessa forma, essa isoenzima, apesar de não ter diferenciado os isolados I-1, I-2, I-7, I-10 e I-11 entre si, foi capaz de diferenciar os isolados I-4, I-5, e I-7.1 dos demais, e apesar dos isolados I-4 e I-7.1 terem sido diferenciados dos demais, eles se apresentaram iguais entre si. Apesar dessa enzima não ser utilizada com muita frequência para fungos por apresentar, na maioria dos casos, baixa ou nenhuma atividade, como demonstrado por Vieira (1996), para *Colletotrichum gossypii* e seu variante *cephalosporioides*, Roux e Labarere (1990) puderam diferenciar, por essa enzima, isolados de *Agaricus bitorquis*, e Figueiredo (1990), isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Cinco bandas foram detectadas para a enzima malato desidrogenase (MDH), mas essa atividade não foi verificada para os isolados I-1, I-5, e I-7 (Figura 2B). Resultados similares foram encontrados por Bonde, Peterson e Maas (1991), com espécies de *Colletotrichum* patogênicos a morango, embora outros trabalhos demonstrem sua eficácia na identificação de outras espécies fúngicas (Nygaard *et al.*, 1989; Stasz, Weedwn e Harman, 1988; Alfenas, Jeng e Hubes, 1984). Os isolados I-2, I-10, e I-11, que não foram diferenciados pela ADH, puderam ser diferenciados por MDH, apesar do I-10 não ter sido diferenciado do isolado saprófita por essa isoenzima.

A enzima fosfatase apresentou 7 bandas e todos os isolados puderam ser diferenciados por essa isoenzima, apresentando o isolado saprófita a banda única 6 como característica (Figura 2C), enquanto que, para a enzima esterase, foram detectadas 10 bandas e variações quanto à intensidade de bandas (Figura 2D), apresentando o isolado saprófita as bandas 5 e 9 características. Para esta isoenzima, apenas os isolados I-1 e I-2 e os isolados I-10 e I-11 não puderam ser diferenciados entre si, apesar de diferirem dos demais isolados. A revelação para esterase forma um grande número de bandas, porque qualquer enzimas capaz de quebrar a ligação naftil acetato dá reação positiva (Hall, Zentmyer e Erwin, 1969), formando zimogramas complexos de bases genéticas, pois envolvem vários locus e diferentes alelos (Gottlieb, 1982).

Analizando os sistemas em conjunto, foi possível diferenciar o isolado saprófita de todos os demais patogênicos, pelas enzimas ADH, ACP, EST, ao passo que pela MDH, o isolado I-10 não diferenciou do saprófita. Foi possível diferenciar os isolados I-1 e I-10, que apresentam diferenças de patogenicidade tanto no teste em plântulas como em fruto verde, pelos padrões eletroforéticos de MDH, ACP, e EST. Entretanto, não houve associação dos padrões eletroforéticos com a origem dos isolados.

A utilização de apenas enzimas não regulatórias pode detectar um nível desproporcional de variação intraespecífica e superestimar a diversidade genética da população. Por outro lado, a variabilidade associada a esse tipo de enzima pode ser desejável para identificar taxon como raças ou *formae speciales* (Micales e Bonde, 1994). Segundo Paterson e Bridge (1994), sistemas de enzimas desidrogenases parecem ser geralmente conservados e úteis para diferenciação entre espécies ou complexo de espécies, enquanto que as enzimas citoplasmáticas podem ser extremamente variáveis e úteis na diferenciação dentro de espécies e populações.



EST

FIGURA 2: Representação gráfica dos padrões de álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), fosfatase ácida (ACP), e esterase (EST) obtidos por eletroforese em gel de poliácridamida. 1= I-1; 2= I-2; 3= I-4; 4= I-5; 5= I-7; 6= I-7.1; 7= I-10; 8= I-11; 9= I-12.

7 CONCLUSÕES

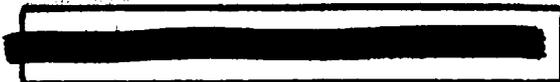
- 1. O isolado saprófita apresentou bandas características nos padrões de eletroforese das enzimas ADH, ACP e EST.**
- 2. Considerando os sistemas ADH, ACP, e EST em conjunto, foi possível diferenciar todos os isolados.**
- 3. Isolados com diferentes graus de patogenicidade foram diferenciados pelos sistemas MDH, ACP, e EST.**
- 4. Não houve relação entre os padrões obtidos com a origem dos isolados.**

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; JENG,R.; HUBBES,M. Isoenzyme and proteins patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, n.8, p. 1756-1762, Aug. 1984.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- ALFENAS, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- BERGQUIST, R.R.; PRYOR, A.J.; Virulence and isozyme differences for establishing racial identity in rusts of mayze. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, p.281-283, 1984.
- BERNIER, L.; JENG, R.S.; HUBBES, M. Differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of *Ceratocystis ulmi* by gel electrophoresis of intramicrobial enzymes. **Mycotaxon**, v.17, p.456-472, 1983.
- BOISSELIER-DUBAYLE, M.C. Taxonomic significance of enzyme polymorphism among isolates of *Pleurotus* (Basidiomycetes) from umbellifers. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.81, n.1, p.121-127, Aug. 1983.
- BONDE, M.R.; PETERSON, G.L.; MAAS, J.L. Isozymes comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n.12, p. 1523-1528, Dec. 1991.
- * BONDE, M.R.; MICALES, J.A.; PETERSON, G.L. The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, n.10, p. 961-968, Oct. 1993.
- BOSLAND, P.W.; WILLIAMS, P.H. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, n. 10, p.2067-2073, Oct.1987.

- BURDON, J.J.; ROELFS, A.P. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 75, n. 8, p. 907-913, Aug. 1985.
- BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R.; LUIG, N.H.; GOW, D.J.S. Isozyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Australia. *Australian Journal Biol. Sci.*, v.35, p. 231-238, 1982.
- CARVALHO, D. Contribution à l' Etude des Protéines Régules par la Symbiose Ectomycorhizienne. Caractérisation des Protéines Membranaires et Pariétales de l' ectomycorhize d' *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius*. Nancy: Ecole National du Génie Rural, 1994. 128p. (Dissertação- Doutorado Engenharia Florestal).
- CLARE, B.G. Starch-gel electrophoresis of protein as na aid in identifying fungi. *Nature*, London, v.200, p.803-804, 1963.
- CRUICKSHANK, R.H.; PITT, J.I. Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* by enzyme electrophoresis. *Mycologia*, Bronx, v.79, n.4, p. 614-620, Jul-Aug.1987.
- FIGUEIREDO, D. de. Padrões Eletroforéticos de Proteínas e Isoenzimas de Raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. Viçosa: UFV, 1990. 144p. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia).
- GILL, H.S.; ZENTMYER, G.A.; Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 68, n.2, p.163-167, Feb. 1978.
- GOTTLIEB, L.D. Conservation and duplication of isozyme in plants. *Science*, Palo Alto, v.216, n.23, p.373-380, Apr. 1982.
- HALL, R.; ZENTMYER, G.A.; ERWIN, D.C. Approach to taxonomy of *Phytophthora* through Acrylamide Gel-Electrophoresis of Proteins. *Phytopathology*, Saint Paul, v.59, n. 6, p. 771-774, Jun. 1969.
- KAOSIRI, T.; ZENTMYER, G.A. Protein, esterase and peroxidase patterns in the *Phytophthora palmivora* complex from cacao. *Mycologia*, Bronx, v.72,n.5, p.988-1000, Sept.-Oct. 1980.

- LENNE, J.M.; BURDON, J.J. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.80, n.8, p. 728-731, Aug. 1990.
- MICALES, J.A.; STIPES, R.J.; BONDE, M.R. On the conspecificity of *Endothia eugeniae* and *Cryphonectria cubensis*. *Mycologia*, Bronx, v.79, n.5, p.707-720, Sept.-Oct. 1987.
- * MICALES, J.A.; BONDE, M.R. Isozymes: methods and applications. In: SINGH, R.P.; SINGH, U. *Molecular methods in plant pathology*. USA: CRC Press, 1994, p. 115-130.
- MOREIRA, A.M.; ALFENAS, A.C.; Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium* por meio da análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacriliamida. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.10, p.258, 1985.
- * MOREIRA, A.M. Caracteres morfológicos e padrões eletroforéticos de proteínas e isoesterases na identificação de espécies de *Cylindrocladium*. Viçosa: UFV, 1989. 118p. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia).
- NEALSON, K.H.; GARBER, E.D. An electrophoretic survey of esterases, phosphatases and leucine aminopeptidases in mycelial extracts of species of *Aspergillus*. *Mycologia*, Bronx, v.59, p.330-336, 1967.
- NYGAARD, S.L.; ELLIOTT, C.K.; CANNON, S.J.; MAXWELL, D.P. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.79, n. 7, p. 773-780, Jul.1989.
- PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D. IMI Technical Handbooks N° 1. Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International, Wallingford, UK, 1994, 125p.
- ROUX, P.; LABARERE, J. Isozyme characterization of dikaryotic strains of the edible basidiomycete *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*). *Experimental Mycology*, New York, v.14, p.101, 1990.
- SNIDER, R.D.; KRAMER, C.L. An electrophoretic protein analysis and numerical taxonomic study of the genus *Taphrina*. *Mycologia*, Bronx, v.66, p.754-772, 1974.



STASZ, T.E.; WEEDWN, N.F.; HARMAN, G.E. Methods of isozyme electrophoresis for *Trichoderma* and *Gliocladium* species. *Mycologia*, Bronx., v. 80, n.6, p. 870-874, 1988.

TUSKAN, G.A.; WALLA, J.A. Isozyme characterization of *Peridermium harknessii* and *Cronartium quercium* f.sp. *banksianae* with starch gel electrophoresis. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 79, n.4, p. 444-448, Apr. 1989.

VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de Marcadores Moleculares no Monitoramento da Qualidade Sanitária e Nível de Deterioração de Sementes de Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) Lavras: UFLA, 1996, 110p. (Dissertação- Doutorado em Agronomia/Fitotecnia).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos estudos vêm sendo realizados em relação à população de *Colletotrichum* em cafeeiros brasileiros. Sabe-se que cepas patogênicas convivem com as saprófitas, e não se manifestam de forma epidêmica em nossas condições. Entretanto, os relatos de ataque do fungo parecem ser bem constantes em condições de campo, mas há falta de informações sobre em que condições essas cepas podem se manifestar e causar prejuízos, além da falta de conhecimento sobre os sintomas que podem ser associados ao patógeno, que muitas vezes leva a diagnósticos errados do agente causal e seu controle.

Neste trabalho, os isolados estudados foram provenientes de diferentes órgãos de café infectados, trazidos pelo próprio produtor para análise, com sintomas característicos de mancha de aspecto oleoso nas folhas, lesões em frutos e seca de ponteiros. Após os resultados obtidos com esse estudo, permitiu-se concluir que apesar de patogênicos, a virulência desses isolados não pode ser comparada ao do patógeno CBD, mas pode ser diferenciada de isolados saprófitas.

A diferenciação dos isolados foi verificada nos testes de patogenicidade em plântulas e frutos verdes destacados, e para as isoenzimas ADH, ACP e EST, o que permite a inclusão desses parâmetros em futuros estudos que visem técnicas de distinção entre cepas patogênicas ou não dentro de uma população de fungo. Além disso, como vem sendo descrito na literatura, o uso de marcadores protéicos foi uma ferramenta adicional para caracterizar os isolados estudados, e outros sistemas de isoenzimas devem ser testados

visando selecionar aqueles que apresentam melhor resultado, para utilizar em diagnósticos de rotina em laboratório.

Os parâmetros morfológicos de índice de velocidade de crescimento micelial, capacidade de esporulação, medição de conídios e utilização de fonte de carbono não devem ser utilizados unicamente na identificação de cepas patogênicas, pois apresentam resultados variáveis que podem ser incluídos em várias espécies dentro de um mesmo gênero.

Esse caracteres devem ser usados na complementação de informações sobre determinado isolado, e pode-se incluir um maior número de caracteres morfológicos e verificar quais apresentam resultados mais contrastantes e que permitam auxiliar na diferenciação de determinadas cepas em uma população.

É indispensável a continuação de estudos com esse mesmo objetivo, visando sempre identificar as cepas patogênicas e compará-las com o agente CBD, pois como ocorreu na África, onde estas não eram prejudiciais até que o desequilíbrio na população do fungo em função do uso do controle químico para doenças como a ferrugem favoreceu seu desenvolvimento, no Brasil podemos ver se repetir o mesmo fato, caso não haja um constante monitoramento dessa população.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	Identificação, procedência e tipo de sintoma de oito isolados de <i>Colletotrichum</i> de café.....25
TABELA 2A	Critério de avaliação do espectro de reação a <i>Colletotrichum</i> apresentado por plântulas de café.....29
TABELA 3A	IVCM de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de café em diferentes meios de cultura, independente do sistema de luz empregado.....32
TABELA 4A	IVCM de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de café em diferentes sistemas de luz, independente do meio de cultura utilizado.....33
TABELA 5A	Capacidade de esporulação em n° de esporos x 10 ⁵ /ml de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de café em diferentes meios de cultura, independente do sistema de luz empregado.....34
TABELA 6A	Capacidade de esporulação em n° de esporos x 10 ⁵ /ml de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de café em diferentes sistemas de luz, independente do meios de cultura utilizado.....35

TABELA 7A	Características microscópicas dos isolados de <i>Colletotrichum</i> provenientes de café.....	37
TABELA 8A	Utilização de tartarato (T) e citrato (C) por isolados de <i>Colletotrichum</i> provenientes de café após 7 dias de incubação à 25 °C, em fotoperíodo.....	38
TABELA 9A	Índice de doença (%) apresentado por plântulas de café cv. Mundo Novo quando inoculado com <i>Colletotrichum</i> de café em diferentes dias de avaliação.....	40
TABELA 10A	Porcentagem média de frutos verde de café cv. Mundo Novo infectados por isolados de <i>Colletotrichum</i> provenientes de café em diferentes dias de avaliação.....	42
TABELA 11A:	Identificação, procedência, e tipo de sintoma de isolados de <i>Colletotrichum</i> de café.....	58

FIGURA 1A	Área abaixo da curva de progresso da doença dos isolados de <i>Colletotrichum</i> provenientes de café em teste de patogenicidade, em plântulas de seis semanas de café cv. Mundo Novo.....	41
FIGURA 2B	Representação gráfica dos padrões de álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), fosfatase ácida (ACP) e esterase (EST) obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	61

ANEXO C

1C: Dados originais do índice de doença (%) apresentado por plântulas de café cv. Mundo Novo quando inoculado com *Colletotrichum* de café em diferentes dias de avaliação.

ÍNDICE DE DOENÇA (%)						
DIAS APÓS A INOCULAÇÃO						
	05	10	15	20	25	30
I-1	0	1,16	8,67	9,67	14,17	16,33
I-2	0	0	3,38	6,33	10,00	13,33
I-4	0	1,66	5,17	7,33	11,17	13,33
I-5	0	2,00	4,33	6,33	11,66	12,67
I-7	0	0	3,50	4,33	7,00	10,50
I-7.1	0	0	5,00	6,17	10,17	12,67
I-10	0	0	2,67	4,33	6,00	8,33
I-11	0	0,66	4,50	7,17	10,17	11,17
Test.	0	0	0	0	0	0

ANEXO D

1D: Dados originais da porcentagem média de frutos verde de café cv. Mundo Novo infectados por isolados de *Colletotrichum* provenientes de café em diferentes dias de avaliação.

% DE FRUTOS INFECTADOS						
DIAS APÓS A INOCULAÇÃO						
	05	10	15	20	25	30
Test.	0	0	0	0	0	0
I-1	0	2,00	8,00	16,00	28,00	50,00
I-2	0	1,00	4,00	11,00	16,00	31,00
I-4	0	0	5,00	10,00	18,00	39,00
I-5	0	1,25	5,00	10,00	21,00	49,00
I-7	0	0	5,00	17,00	31,00	60,00
I-7.1	0	1	6,00	16,00	32,00	51,00
I-10	0	0	3,00	12,00	21,00	38,00
I-11	0	0	2,00	9,00	15,00	33,00



