



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

VIVIANI VIEIRA MARQUES

**PATOGENICIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
*Colletotrichum* spp. EM CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

---

Londrina  
2009

VIVIANI VIEIRA MARQUES

**PATOGENICIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
*Colletotrichum* spp. EM CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador(a): Dra. Luzia Doretto Paccola Meirelles

Co-Orientador: Dr. Rui Pereira Leite Júnior

Londrina  
2009

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M357p Marques, Viviani Vieira.  
Patogenicidade e variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro  
(*Coffea arabica* L.) / Viviani Vieira Marques. – Londrina, 2009.  
114 f.: il.

Orientador: Luzia Doretto Paccola Meirelles.  
Co-orientador: Rui Pereira Leite Júnior.  
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,  
2009.  
Inclui bibliografia.

1. Café – Melhoramento genético – Teses. 2. Café – Fungos patogênicos –  
Teses. 3. Antracnose – Teses. 4. *Colletotrichum* – Teses. I. Paccola-Meirelles,  
Luzia Doretto. II. Leite Júnior, Rui Pereira. III. Universidade Estadual de  
Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia. IV. Título.

CDU 631.52:633.73

VIVIANI VIEIRA MARQUES

**PATOGENICIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
*Colletotrichum* spp. EM CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Dauri José Tessman  
UEM – Maringá- PR

---

Dr. Éberson Sanches Calvo  
TMG

---

Dr. Laurival Antônio Vilas Boas  
IAPAR – Londrina – PR

---

Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior  
ESALQ/USP – SP

---

Dra. Luciana Grange  
IAPAR – Londrina – PR

---

Dra. Regina M. Villas Bôas de Campos Leite  
Embrapa Soja – Londrina - PR

---

Dra. Luzia Doretto Paccola Meirelles  
Universidade Estadual de Londrina

---

Dr. Rui Pereira Leite Júnior  
Instituto Agrônômico do Paraná

Londrina, 28 de abril de 2009.

## **DEDICO**

Aos meus pais **João e Maria**, meus exemplos de vida e determinação. Responsáveis pela minha formação, donos de um amor incondicional. Agradeço pela compreensão, carinho, incentivo e educação recebida.

## **OFEREÇO**

Ao meu irmão **Valteir**, meus sobrinhos **Isabelli e Vinícius e Miguel Peres Marçal**.

## **AGRADECIMENTOS**

Principalmente à Deus, a quem devo tudo que tenho e tudo o que sou.

À Coodenação e aos docentes do curso de pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

À Dr. Luzia Doretto Paccola Meirelles, pela orientação durante o mestrado e o doutorado, por seus ensinamentos, seu profissionalismo, sua compreensão e sua amizade

Ao Dr. Rui Pereira Leite Júnior, pela orientação, pela amizade, pelo profissionalismo, pelos ensinamentos e, principalmente, pela confiança durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos integrantes da Comissão examinadora, Dr. Dauri José Tessmann, Dr. Laurival Vilas Boas, Dra. Luciana Grange, Dr. Éberson Sanches Calvo; Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior e Dra. Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite.

Ao meu grande amigo e grande mestre Fabio Sartori, que teve papel fundamental em minha formação por seu exemplo de caráter e amor pela profissão.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do IAPAR, Andrey Cordeiro, Cláudia de Paula, Eliana Favaro, Franklin Behlau, Israel Aurora, Juliana Gonçalves, Juliana Pistori, Liliane Nunes, Luís Gustavo Rampazo, Luciana Meneguim, Maria de Fátima, Mayara Murata, Michele Lopes da Silva, Michelle Buassi, Ricardo Gonçalves, Rodrigo Martins, Thiago Bagio, Valter Neves.

Agradeço também ao amigo Hugo Bruno Molinari, por seus ensinamentos, seu exemplo de determinação, sua humildade e profissionalismo.

Ao grande amigo Higo Forlan Amaral, pela amizade incondicional e pela orientação com as análises estatísticas.

Às amigas Luciana Meneguim & Michele R. Lopes da Silva, companheiras dos “bons” e dos “melhores” momentos, obrigada por tudo!

Em especial, aos amigos Higo Forlan Amaral, Laurival Vilas Boas e Luciana Meneguim. Agradeço pelo companherismo, pelas sugestões, pelas discussões, pelo apoio e por toda colaboração durante a execução deste trabalho. Muito Obrigada!!!

À amiga Tatiane Dalla Nora, amizade iniciada na seleção do curso de pós- graduação e que vou levar para a vida toda. Obrigada pela amizade, carinho e exemplo de profissionalismo.

Aos amigos Angélica Toledo, Alexandre Valim, Carolina Castro, Cláudio Lísias, Daiana Silva, Giordani Meireles, Iraci Policastro, Josiane Venâncio, Laura Albuquerque e Fernanda Zoppi, Maria Paula Nunes, Rodrigo Brogin, Sathya Meira. Obrigada pela amizade, pela cumplicidade, pelo incentivo e pelos bons momentos.

Aos meus sobrinhos Isabelli da Silva Marques e Vinícius Peres Mendes, por tornarem meus dias tão especiais.

Miguel Carlos Peres Marçal, obrigada pelo apoio, esta conquista também é sua. Muito obrigada!

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do curso.

Ao CNP&D/Café pelo financiamento do projeto e pela capacitação profissional.

Enfim, a todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, contribuíram durante as etapas de realização deste trabalho.

“Um pouco de Ciência nos afasta de Deus...  
...Muito, nos aproxima”

**Louis Pasteur**

“Aprender é a única coisa de que a mente  
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se  
arrepende.”

**Leonardo da Vinci**

MARQUES, Viviani Vieira. **Patogenicidade e variabilidade genética de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.

## RESUMO

Fungos do gênero *Colletotrichum* são cosmopolitas e compreendem um grande número de espécies que são responsáveis por doenças em diversas plantas de importância agrônômica. Em cafeeiro, três espécies pertencem a este gênero, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum kahawae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *C. kahawae* é agente causal da 'Coffee Berry Disease' (CBD), doença responsável por grandes perdas na cultura do cafeeiro em países da África. *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* estão associados a sintomas como antracnoses, "die-back", "elon dieback" e mancha manteigosa em países onde a cultura do cafeeiro está presente. No Brasil, *Colletotrichum* spp. têm sido constantemente associado à necrose de ramos e frutos, e à mancha manteigosa em folhas, além de seca e morte de ponteiros e ramos. Embora, isolados de *Colletotrichum* spp. tenham sido descritos como causadores destes sintomas, pouco se conhece sobre a interação *Colletotrichum*-cafeeiro. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo ampliar estes conhecimentos, avaliando a variabilidade patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum* spp. e sua interação com *Coffea arabica*. O trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira, foi avaliada a resistência de diferentes cultivares de *C. arabica* à inoculação de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e outras culturas. Os cultivares de cafeeiro apresentaram variabilidade quanto à reprodução dos sintomas, sendo que, o cultivar IAPAR 59 mostrou-se o mais resistente aos isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados. Frutos verdes destacados do cultivar IAPAR 103 foram inoculados com 87 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e 77 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de outras culturas. Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro causaram sintomas como lesões secas e deprimidas em frutos verdes de cafeeiro. Os isolados obtidos de outras culturas, como abacate, citrus, goiaba, maçã, mamão e maracujá, também causaram lesões, porém, foram menos agressivos que os isolados do próprio cafeeiro. Na segunda parte deste trabalho, análises moleculares foram realizadas e a confirmação da identidade dos isolados obtidos do Paraná foi conduzida usando amplificação e restrição da região ITS do rDNA. Este estudo evidenciou que todos os isolados foram agrupados com isolados de *C. gloeosporioides*. A variabilidade genética da população de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro foi examinada com a técnica de ISSR, que originou uma subpopulação representada por isolados das regiões Norte e Norte Pioneiro do Estado do Paraná. Além disso, isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro apresentaram perfil distinto dos isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de outras culturas. Não foi possível correlacionar a variabilidade genética destes isolados com características culturais ou patogênicas. No entanto, foi possível observar especialização patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro.

**Palavras-chave:** Antracnose. ITS. ISSR. Patogenicidade. Diversidade genética.

MARQUES, Viviani Vieira. **Pathogenicity and genetic variability of *Colletotrichum* spp. from coffee (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 114 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

*Colletotrichum* spp. are cosmopolitan, comprising a large number of species that cause diseases on several crops of agronomic importance. On coffee, three species are present, *C. acutatum*, *C. kahawae* and *C. gloeosporioides*. *C. kahawae* is the causal agent of *Coffee Berry Disease* (CBD) which is restricted to countries of Africa. In Brazil, *C. gloeosporioides* has been consistently associated with necrosis on branches and fruits, and buttery leaf spot and die back symptoms. Although isolates of *Colletotrichum* spp. have been described as responsible for these symptoms, very few information are available on the interaction of *Colletotrichum* spp. with coffee. Further, there is a lack of information on the pathogenic and genetic variability of these isolates. So, this study aimed to extend the knowledge, and evaluate the genetic variability and pathogenicity of the isolates of *Colletotrichum* spp. and their interaction with *Coffea arabica*. The work was divided in two parts. In the first part, the reaction of different cultivars of *C. arabica* was evaluated when inoculated with isolates of *C. gloeosporioides* obtained from coffee. The cultivars showed different behaviors in response to the inoculation with *C. gloeosporioides*. The cultivar IAPAR 59 was the most resistant. Eighty seven isolates of *Colletotrichum* spp. from coffee and 77 isolates from other crops were inoculated on detached green coffee fruits after superficial desinfection. Isolates from coffee caused typical necrotic, dried and depressed lesions. Isolates obtained from other crops, such as avocado, citrus, guava, apple, papaya and passion fruit, also caused lesions, however, they were less aggressive on coffee. Molecular analysis were performed to confirm the identity of the *Colletotrichum* spp. isolates from Paraná. All isolates were grouped with isolates of *C. gloeosporioides*, and only three isolates of coffee showed distinct genetic profile among the 68 ones included in the study. The genetic variability of the population of isolates from coffee was evident only with the ISSR technique, which resulted in a subpopulation represented by isolates from the North and North Pioneer regions of the State. Furthermore, isolates of *C. gloeosporioides* had a distinct profile than the isolates from other crops. It was not possible to correlate the genetic variability of the *Colletotrichum* isolates with cultural or pathogenic characteristics. However, these results showed pathogenic specialization among the isolates of *C. gloeosporioides* from coffee.

**Key-words:** Anthracnose. ITS. ISSR. Cross reaction. Genetic variability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> – Sintomas de <i>Coffee Berry Disease</i> (CBD) causada pelo fungo <i>Colletotrichum kahawae</i> em plantas de cafeeiro.....	25
<b>Figura 2.2</b> – Sintomas associados à <i>Colletotrichum</i> spp. em cafeeiros no Brasil.....	26
<b>Figura 2.3</b> – Hipótese do surgimento das três espécies de <i>Colletotrichum</i> associadas à <i>Coffea arabica</i> após estudos de diversidade intra e interespecífica.....	38
<b>Figura 3.1</b> – Frutos verdes de diferentes cultivares de cafeeiro inoculados com o isolado I-12 de <i>C. gloeosporioides</i> .....	48
<b>Figura 3.2</b> – Frutos de <i>Coffea arabica</i> (L.) evidenciando os diferentes sintomas obtidos após a inoculação com isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	53
<b>Figura 3.3</b> – Percentual médio de lesões em frutos de cafeeiro em estágio de expansão, após inoculação com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos de quatro regiões do Estado do Paraná. ....	54
<b>Figura 4.1</b> – Fragmento gerado pela amplificação da região ITS1 e ITS2 e gene 5,8 S do rDNA de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro e outros hospedeiros. ....	73
<b>Figura 4.2</b> – Perfil representativo de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro após clivagem com enzimas de restrição (ARDRA).....	74
<b>Figura 4.3.</b> Perfil representativo de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. de diferentes culturas utilizados na análise de ARDRA após clivagem com enzimas de restrição.....	75
<b>Figura 4.4</b> – Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de <i>Jaccard</i> mostrando as relações genéticas entre isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. com base em padrões de ARDRA. ....	77

<b>Figura 4.5</b> – Perfil representativo da amplificação com os <i>primers</i> arbitrários (AP) que amplificam as sequências repetitivas (ISSR) de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. de diferentes culturas. ....	79
<b>Figura 4.6</b> – Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Pearson com base na análise dos fragmentos obtidos com os primers AP1, AP2, AP3 e AP4 de população de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro e <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	81
<b>Figura 4.7</b> – Dendrograma mostrando a relação entre 142 isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro e outros hospedeiros. As distâncias genéticas foram obtidas por UPGMA com base na amplificação com quatro <i>primers</i> . ....	83
<b>Anexo B</b> – Comparação entre a seqüência parcial da região ITS1, ITS2 e 5,8 S do rDNA amplificada do isolado 17c (cafeeiro) e seqüência de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> depositada em banco de dados.....	109
<b>Anexo C</b> – Comparação entre a seqüência parcial da região ITS1, ITS2 e 5,8 S do rDNA amplificada do isolado obtido de pimentão e seqüência de <i>Colletotrichum acutatum</i> ( <i>Glomerella acutata</i> ) da mesma cultura depositada no banco de dados.....	110
<b>Anexo D</b> – Comparação entre a seqüência parcial da região ITS1, ITS2 e 5,8 S do rDNA amplificada do isolado 436 (abacate) e sequencia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> da mesma cultura depositada em banco de dados. ....	111
<b>Anexo E</b> – Comparação entre a seqüência parcial da região ITS1, ITS2 e 5,8 S do rDNA amplificada do isolado 526 (caqui) e sequencia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> da mesma cultura depositada em banco de dados. ....	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Hospedeiro, origem, número, região e ano de obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro e outras plantas hospedeiras. ....	46
<b>Tabela 3.2</b> - Incidência média de necrose causada por <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos verdes de diferentes cultivares de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.) em avaliação realizada no quinto dia após a inoculação.....	47
<b>Tabela 3.3</b> - Incidência média de necrose por <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos verdes de diferentes cultivares de cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.) em avaliação realizada no décimo dia após a inoculação. ....	49
<b>Tabela 3.4</b> – Agrupamento de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. com base na incidência de frutos lesionados de <i>Coffea arabica</i> no 5º e 10º dia após a inoculação. ....	52
<b>Tabela 4.1</b> - Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiro e outras culturas utilizados nos estudos de diversidade genética.....	66
<b>Tabela 4.2</b> - Espécies tipo de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizadas para fins comparativos.....	69
<b>Anexo A</b> – Procedência dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de cafeeiros e de outras culturas utilizados neste estudo.....	106

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1	CAFEICULTURA NO BRASIL .....	17
2.2	MECANISMO E MANEJO DE DOENÇA EM CAFEIEIRO .....	19
2.3	GÊNERO <i>Colletotrichum</i> .....	21
2.3.1	<i>Colletotrichum</i> spp. em Cafeeiro.....	23
2.4	MECANISMOS DA PATOGENICIDADE DE <i>Colletotrichum</i> spp .....	28
2.5	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES MOLECULARES.....	31
2.5.1	Diversidade Genética com Base na Região Intergênica (ITS) do rDNA .....	33
2.5.2	Diversidade Genética com Base em Primers Arbitrários de Sequências Repetitivas .....	35
2.6	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>Colletotrichum</i> spp. OBTIDOS DE CAFEIEIRO .....	36
<b>3</b>	<b>PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. em <i>Coffea arabica</i> (L.)</b> .....	39
	RESUMO .....	39
	ABSTRACT.....	39
3.1	INTRODUÇÃO.....	40
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.2.1	Isolamento, Cultivo e Manutenção dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	43
3.2.2	Desinfestação, Preparo do Inóculo e Inoculação de <i>Colletotrichum</i> spp. <i>G</i> .....	44
3.2.3	Reação de Diferentes Cultivares de Café ( <i>Coffea arabica</i> L.) a <i>C.</i> <i>gloeosporioides</i> .....	44
3.2.4	Avaliação da Patogenicidade de Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em Frutos Verdes de Cafeeiro. ....	45
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
3.3.1	Reação Patogênica de <i>C. gloeosporioides</i> em Diferentes Cultivares de Cafeeiro .....	47

3.3.2 Patogenicidade de Diferentes Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em Frutos Verdes de Cafeeiro .....	51
3.4 CONCLUSÕES .....	59
<b>4 VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Colletotrichum</i> spp. OBTIDOS DE CAFEEIROS (<i>Coffea arabica</i> L.) DO ESTADO DO PARANÁ .....</b>	<b>61</b>
RESUMO .....	61
ABSTRACT.....	61
4.1 INTRODUÇÃO.....	62
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.2.1 Isolamento e Armazenamento dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	64
4.2.2 Caracterização Genética por Meio de Marcadores Moleculares .....	69
4.2.2.1 Extração do DNA genômico .....	69
4.2.2.2 Amplificação, ARDRA e sequenciamento das regiões intergênicas ITS1 e ITS2 e do gene 5,8 S do rDNA.....	69
4.2.2.3 Variabilidade genética por marcadores ISSR ( <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> ).....	71
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
4.3.1 Amplificação, ARDRA e Sequenciamento das Regiões Espaçadoras do rDNA: ITS1, gene 5,8S e ITS2 .....	72
4.3.2 Variabilidade Genética por Marcadores ISSR .....	78
4.4 CONCLUSÕES .....	85
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>105</b>
ANEXO A .....	106
ANEXO B .....	109
ANEXO C .....	110
ANEXO D .....	111
ANEXO E .....	112

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um produto agrícola de extrema importância econômica e social para o Brasil. Embora nos últimos anos a cultura tenha se estendido para muitas outras regiões do mundo, o Brasil ainda é o maior produtor e exportador mundial de café (MAPA, 2009). O mercado tem exigido padrões de qualidade do produto cada vez mais elevados, pois é um dos poucos produtos agrícolas que tem seus preços baseados em parâmetros qualitativos. Dentre os aspectos qualitativos do café, a incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita tem sido um dos principais fatores envolvidos (SOUZA; CARVALHO, 1997). Os fungos filamentosos, por sua vez, representam um grupo de microrganismos causadores dos maiores danos em grãos de café.

Espécies do gênero *Colletotrichum* ocorrem em cafeeiros em todas as regiões produtoras do mundo (MASABA; WALLER, 1992; SILVA et al., 2006). *Colletotrichum* spp. são fungos cosmopolitas e compreendem uma grande quantidade de espécies conhecidas, sobretudo por causar doenças em culturas de importância agrônômica. O fungo tem comportamento destrutivo em diferentes espécies vegetais, apresentando ampla distribuição geográfica. E embora perdas severas ocorram em todas as regiões, em países tropicais e subtropicais ocorrem os maiores danos causados por este patógeno (BAILEY et al., 1992). Em cafeeiro, os sintomas caracterizam-se principalmente pela formação de lesões deprimidas em frutos verdes, com a presença de esporos de coloração laranja, sendo que estas lesões se expandem rapidamente, e podem atingir as sementes (HINDORF, 1975; MASABA; WALLER, 1992). Fatores climáticos como chuvas e ventos, são primordiais para o ciclo da doença e as fontes de inóculo são principalmente restos culturais e sementes infectadas. Ferimentos causados por insetos ou injúria mecânica nos frutos favorecem a penetração do fungo (AGRIOS, 2005).

A doença Coffe Berry Disease (CBD) ocorrida em países da África onde o café é cultivado é causada pela espécie *C. kahawae* e tem sido um dos principais problemas. No Brasil, a espécie *C. kahawae* ainda não foi descrita, no entanto, espécies de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* são frequentemente isolados de cafeeiros e associados com sintomas como necrose em frutos, seca de ramos e ponteiros e mancha manteigosa nas folhas (PARADELA-FILHO, 2001). Alguns

desses sintomas são muito similares aos causados por *C. kahawae* na África. Nos últimos anos, estudos da interação *Colletotrichum* spp. x cafeeiro tem sido realizado e a maior dificuldade na confirmação do patossistema está no estabelecimento e reprodução in vivo dos sintomas associados ao fungo, seja em plântulas, ramos ou frutos de cafeeiro (NECHET; ABREU, 2002; DORIZZOTO, 1993; OROZCO-MIRANDA, 2003; ZAMBOLIM et al., 2003).

Existe uma grande discussão a respeito da patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em cafeeiros do Brasil (DORIZZOTO, 1993; ZAMBOLIM et al., 2003, 2005; FERREIRA et al., 2005), no entanto, a literatura a respeito desta interação é escassa, principalmente quando relacionada às informações sobre a patogenicidade de isolados, danos que este fungo pode causar à cultura e à susceptibilidade de diferentes cultivares de *Coffea arabica*. Além disso, são poucas as informações a respeito da variabilidade genética existente entre isolados do fungo nas regiões produtoras de café.

Neste contexto, se faz necessário elucidar a relação do fungo *Colletotrichum* com a cultura do café no Brasil. Sendo imprescindível esclarecer se os sintomas em questão são realmente causados pela espécie fúngica, bem como determinar a espécie de *Colletotrichum* normalmente associada ao cafeeiro. A identificação e caracterização da espécie poderão distingui-la entre as espécies encontradas causando doenças em outros países. Este estudo poderá ampliar o conhecimento sobre a etiologia das necroses em frutos e ramos, visando o desenvolvimento de medidas de controle ainda não exploradas e praticadas por produtores da cultura.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar a patogenicidade de *Colletotrichum* spp.. em frutos verdes destacados de diferentes genótipos de cafeeiro;
2. Avaliar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes hospedeiros em frutos verdes destacados de cafeeiro;
3. Verificar a ocorrência de genótipos patogênicos e não patogênicos e a especificidade pelo hospedeiro;
4. Estudar a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* spp. Por meio das técnicas de PCR-RFLP das regiões ITS1, ITS2 e 5,8 do rDNA e por meio de marcadores microssatélites (ISSR).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CAFEICULTURA NO BRASIL

O café é considerado um dos produtos agrícolas mais importantes para o mundo. Países como Brasil, Indonésia e Colômbia detêm juntos mais de 50% do mercado mundial, sendo o Brasil o primeiro na produção, consumo e exportação de café (MAPA, 2009). Na última safra, o Brasil produziu aproximadamente 21,53 milhões de sacas. Sua produção é representada por aproximadamente 320.000 propriedades, distribuídas em 14 Estados (MAPA, 2009). Além de ser um produto de exportação com papel fundamental na geração de riquezas para o país, o café também possui grande função social gerando em média três milhões de empregos diretos (RESENDE; ROSADO, 2003). Levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) relata que aproximadamente 4% do volume total das exportações brasileiras são representados pela cultura do café, o que propicia uma receita de aproximadamente US\$ 1,5 a 2,0 bilhões por ano (MAPA, 2009). O Estado do Paraná é o quarto maior produtor de café do Brasil, sendo o primeiro Minas Gerais, seguido por Espírito Santo e São Paulo, com uma produção estimada para o ano de 2009 entre 1,65 a 1,8 milhões de sacas, em uma área de 93,1 mil hectares (MAPA, 2009).

Membro da família Rubiaceae, o gênero *Coffea* compreende mais de 70 espécies, entretanto, apenas duas são economicamente importantes, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P., que correspondem a 70% e 30%, respectivamente, do café cultivado no mundo (EIRA et al., 2007). As demais espécies de *Coffea* são importantes em programas de melhoramento, servindo como fontes de variabilidade genética, principalmente para tolerância a fatores bióticos e abióticos entre outras características de interesse agrônomo (GAPARI-PEZZOPANE, 2007). A espécie *C. arabica* e *C. canephora* são originárias de regiões tropicais e subtropicais da África (DAVIS et al., 2006). As demais espécies são provenientes das Ilhas de Madagascar e Mascarenhas (DAVIS et al., 2006). A espécie *C. canephora* é diplóide ( $2n=2$ ) e possui auto-incompatibilidade do tipo gametofítica (CONAGIN, 1961), o que a torna alógama, reproduzindo-se por

fecundação cruzada. Plantas da espécie *C. arabica* são tetraplóides ( $2n = 44$  cromossomos) e se reproduzem por autofecundação. A fecundação cruzada varia a uma taxa média da ordem de 10% em função das condições climáticas e ação de polinizadores (CARVALHO; MÔNACO, 1962).

A expansão cafeeira no Brasil foi possível graças às condições de solo e clima, bem como à diversificação de materiais genéticos pela seleção de cultivares adaptados às diversas condições edafoclimáticas do país. Hoje, o Brasil conta com 103 cultivares de *C. arabica* e 10 cultivares de *C. canephora* registrados no MAPA, sendo o único país no mundo a cultivar as duas espécies em escala comercial (MAPA, 2008).

Atualmente a demanda pelo produto no país é elevada, no entanto, fatores bióticos e abióticos têm resultado em um decréscimo na produção, podendo não corresponder às necessidades do mercado nacional (MAPA, 2009). Entre estes fatores, variações climáticas, manejo da cultura e variabilidade genética são considerados os principais responsáveis pelo estado fisiológico e o ciclo fenológico do cafeeiro (GASPARI-PEZZOPANE, 2007). Este ciclo compreende as fases vegetativas e reprodutivas do cafeeiro, no qual a cultura apresenta várias floradas, uma principal e outras que se repetem em função das variáveis descritas acima. Consequentemente ocorre uma desuniformidade na maturação dos frutos que pode se repetir dentro de uma mesma florada (GASPARI-PEZZOPANE, 2007), sendo esta desuniformidade, considerada um dos principais fatores limitantes para a cultura (MAPA, 2009).

Além disso, a incidência de insetos pragas e doenças acarretadas por microrganismos estão entre as principais limitações para a cultura nas diversas fases da produção, por gerar queda de produtividade e redução na qualidade do café (SOUSA; CARVALHO, 1997). Entre os fatores bióticos, espécies fúngicas são amplamente estudadas por serem agentes etiológicos de várias doenças na cafeicultura, afetando negativamente a produtividade em diferentes fases da produção. Neste contexto, têm-se buscado alternativas para o aumento da produção, assim como, compreender os vários aspectos biológicos dos fungos e de sua interação com a planta hospedeira, no intuito de adotar medidas de controle mais eficientes (LINS et al., 2007).

## 2.2 MECANISMO E MANEJO DE DOENÇAS EM CAFEIEIRO

Um dos grandes desafios no manejo integrado das doenças de plantas, sobretudo de cafeeiro, consiste em prever com antecedência, quando determinada doença poderá causar dano econômico à cultura. São escassos os modelos matemáticos desenvolvidos com objetivo de estabelecer a relação existente entre severidade das doenças e as perdas na produção, assim como, épocas críticas da cultura e as condições edafoclimáticas que favorecem as epidemias. Sendo assim, é extremamente relevante ter conhecimento dos três fatores responsáveis pelas epidemias: o patógeno, o hospedeiro e o ambiente (ZAMBOLIM et al., 2003).

A ocorrência de doenças na cultura do cafeeiro é influenciada principalmente por fatores relacionados à virulência do patógeno, resistência do hospedeiro, densidade de plantio, grau de enfolhamento, carga pendente e estado nutricional das plantas (ZAMBOLIM et al., 2003). Além destes, fatores ambientais como temperatura, chuva, intensidade dos ventos, umidade relativa, molhamento foliar, luz, disponibilidade de nutrientes no solo, entre outros, são indispensáveis para a avaliação e o diagnóstico correto de doenças nesta cultura (CARVALHO et al., 2002).

A densidade de plantas por área é um dos fatores que influencia diretamente na incidência e multiplicação do patógeno, agindo principalmente no aumento da severidade da doença devido às mudanças profundas no meio, sobretudo, alterações no microclima. As condições microclimáticas estabelecidas nas lavouras de café são notadamente determinadas pelo efeito da temperatura, umidade relativa e insolação, fatores que são influenciados muitas vezes, pela densidade da lavoura (CARVALHO et al., 2002). Em sistemas de plantios adensados e superadensados, por exemplo, o microclima favorece a incidência da ferrugem ao mesmo tempo em que reduzem a incidência da cercosporiose (CARVALHO, L.; CHALFOUN, S.M., 2001).

Outro elemento importante é o equilíbrio nutricional, este fator é fundamental para o estabelecimento de doenças, mesmo plantas com excesso de nutrição podem tornar-se predispostas às doenças (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993; WALTERS; BINGHAM, 2007). Huber (1981) relata que o zinco pode aumentar a

resistência das plantas, bem como a severidade de certas doenças. O papel do Zn, nesse caso, é aumentar o conteúdo de ácido ascórbico e carboidratos das plantas, conferindo, desta forma, resistência do material vegetal (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993). Efeito positivo na diminuição da severidade da ferrugem foi observado quando, um aumento das concentrações de sulfato de zinco (0,6 % a 0,75 %) foi realizado, no entanto, maiores concentrações de sulfato de zinco, aumentaram a incidência de cercosporiose, manchas foliares e a desfolha dos cafeeiros (CARVALHO, et al, 2008).

No caso da doença mancha-de-olho-pardo, melhor controle foi alcançado com o aumento da nutrição nitrogenada. A nutrição nitrogenada reduz, mas não impede a incidência da mancha-de-olho-pardo em mudas de café. Enquanto doses excessivas de potássio em viveiro favorecem a doença e prejudicam o desenvolvimento da muda (POZZA, et al., 2001).

O efeito do Silício no controle de doenças foi relatado tanto em mono, quanto em dicotiledôneas. Para o cafeeiro, esse efeito ainda não foi bem esclarecido. Pozza e colaboradores (2004) relatam interações significativas entre diferentes variedades e a presença de silício em relação à intensidade da doença cercosporiose. Plantas da variedade catuaí com silício incorporado ao substrato apresentaram 63,2% menos folhas lesionadas e 43% menos lesões, quando comparadas à testemunha. Além do Si, as amostras tratadas apresentaram maior quantidade de Fe, Zn e Cu, a qual não foi verificada nas testemunhas. Esses nutrientes parecem não só, estar relacionado com a ação antifúngica (MARSCHNER, 1995), mas, também atuar como co-fatores na síntese de enzimas, inclusive naquelas ligadas a patogênese tornando-se mais uma evidência da atuação destas substâncias no processo de defesa da planta. Geralmente, teores elevados de nitrogênio tendem a aumentar a suscetibilidade do cafeeiro, enquanto altas doses de potássio reduzem a predisposição a muitas doenças.

A disponibilidade de nutrientes para o patógeno no hospedeiro, por exemplo, está relacionada com o aumento da taxa de respiração, permeabilidade celular e os níveis de translocação de nutrientes que podem aumentar. De maneira geral, o estado nutricional do hospedeiro é crítico no processo de infecção, principalmente no caso de patógenos obrigatórios. Nestas circunstâncias, o estado nutricional e o grau de resistência das plantas podem determinar a severidade de importantes doenças do cafeeiro (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

A colonização de alguns fungos depende necessariamente de fontes externas de nitrogênio que podem ser convertidas em  $\text{NH}_3$  e ativar a infecção latente requerida pela alcalinização do tecido (KRAMER-HAIMOVICH et al., 2006).

Os mecanismos envolvidos na interação hospedeiro-patógeno-nutriente não são completamente conhecidos, mas sabe-se que os aspectos fisiológicos da resistência estão intimamente relacionados com equilíbrio nutricional das plantas e refletem tanto na alteração do ambiente nutricional do patógeno como na produção e acúmulo de compostos inibidores da patogênese (WALTERS; BINGHAM, 2007). Além de agir como substrato, os elementos minerais acionam rotas de reações fisiológicas do metabolismo que podem por sua vez agir negativa ou positivamente na interação do hospedeiro com o patógeno. É o caso do Silício, e outros microelementos, seu acúmulo pode estar associado à indução da resistência sistêmica (BÉLANGER; MENZIES, 2003) e contribuir para melhor nutrição das mudas. Outro efeito do silício é o da ativação das defesas químicas e bioquímicas da planta, aumentando o conteúdo de fenóis, a atividade de quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, peroxidases,  $\beta$ -glicosidases, fenilamônia liase e polifenoloxidase (FAWE et al., 1998; RODRIGUES et al., 2001; BÉLANGER; MENZIES, 2003).

Embora, as doenças bióticas possam ter suas atividades reduzidas na presença de fatores ambientais e nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento de plantas, influenciam direta ou indiretamente na infecção e na taxa de reprodução do patógeno. Esses fatores podem ser minimizados com as principais técnicas de manejo de doença da cultura, garantindo a diminuição do potencial de inóculo e aumento da resistência dos cafeeiros às doenças e/ou mesmo, o aumento de condições desfavoráveis ao desenvolvimento dos patógenos. Portanto, as estratégias integradas de controle de doenças do cafeeiro devem ser empregadas para a solução de problemas fitossanitários de origem biótica e abiótica (LIMA et al., 2003).

### 2.3 GÊNERO *Colletotrichum*

*Colletotrichum* é um fungo cosmopolita, e um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos em todo o mundo. Com ampla distribuição

geográfica, acarretam danos na cultura em todas as regiões, sobretudo, tropicais e subtropicais (AGRIOS, 1988; BAILEY; JEGER, 1992).

Espécies deste gênero causam sintomas como necrose e podridões em frutos, manchas foliares, seca de pecíolo e ramos e *damping-off*, em uma grande variedade de plantas cultivadas (BAILEY; JEGER, 1992). Doenças causadas por *Colletotrichum* spp. são facilmente identificadas por acarretar lesões deprimidas com a presença de esporos de coloração laranja. Estas lesões se expandem rapidamente, e muitas vezes atingem até mesmo as sementes (KUROZAWA, C., PAVAN, 1997). Uma ampla variabilidade de aspectos morfológicos, culturais, genéticos e patogênicos são descritas em todas as espécies do gênero (BAILEY; JEGER, 1992), podendo ser isolados tanto de tecidos sadios como doentes (JEFFRIES et al., 1990; RODRIGUES; PETRINI, 1997; CANNON; SIMMONS, 2002) e muitas vezes, são definidos como patógeno oportunista (BAILEY; JEGER, 1992).

Uma das principais características do gênero *Colletotrichum*, e que é importante para sua classificação, está na formação de estruturas denominadas acérvulos (BAILEY; JEGER, 1992). Estes possuem forma de disco achatado, são subepidérmicos, com setas, apresentam conidióforos simples e alongados, contendo conídios hialinos unicelulares e cilíndricos (MENEZES; HALIN, 1996). Em meio de cultivo Batata-Dextrose-Ágar (BDA), apresenta crescimento rápido, formando colônias concêntricas, de coloração verde-oliva à marrom, podendo ocorrer a formação ou não de setores (BAILEY et al., 1992). Apesar destes fungos não apresentarem estruturas de resistência, o micélio pode permanecer viável por longo período de tempo em sementes, restos culturais ou latentes em frutos sadios.

Em doenças causadas por *Colletotrichum* spp., o processo de disseminação inicia-se pela liberação dos conídios que ocorre necessariamente com a presença de um filme de água (BAILEY; JEGER, 1992). Os esporos produzidos na superfície do tecido do hospedeiro são disseminados principalmente por chuvas associadas com ventos, sendo, portanto, esses fatores primordiais para a iniciação do ciclo do patógeno. Restos culturais e hospedeiros alternativos infectados, também auxiliam na sobrevivência do patógeno, implicando no aumento da exposição de plantas sadias à doença de um ano para outro (BAILEY et al., 1992, KUROZAWA; PAVAN, 1997). A longa distância e em áreas livres da doença, sementes infectadas podem ser a principal fonte de inóculo (KUROZAWA; PAVAN, 1997). A partir da disseminação, a doença se inicia de forma ativa pela germinação

dos esporos e penetração da hifa ou, em alguns patossistemas, o início se dá através de ferimentos causados por insetos ou injúria mecânica nos frutos, que pode ser causada tanto pelo manejo como por fatores climáticos, sendo indispensáveis para a penetração do fungo e desenvolvimento da doença (AGRIOS, 2005).

Espécies do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por doenças economicamente importantes em cereais, gramíneas, leguminosas e plantações perenes, incluindo o cafeeiro (BAILEY et al., 1992; FREEMAN; SHABI, 1996; SILVA et al., 2006). No gênero *Colletotrichum* é também comum encontrar múltiplos hospedeiros afetados por uma mesma espécie e múltiplas espécies infectando um único hospedeiro (FREEMAN et al., 1998). Por exemplo, *C. gloeosporioides*, conhecido por ser uma espécie complexa, tem sido reportado em muitos hospedeiros, tais como maçã, abacate, citros, manga e morango, entre outras (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; ALAHAKOON et al., 1994; FREEMAN et al., 2000; JAYASINGHE; FERNANDO, 2000; PERES et al., 2002). Da mesma forma, tem sido reportado que várias espécies de *Colletotrichum* ou biótipos de uma determinada espécie podem ser associados com um único hospedeiro, como em abacate, citros, café, curcubitáceas, manga, pimenta, morango e tomate (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; ALAHAKOON et al., 1994; BROWN et al., 1996; CORRELL et al., 1993; FREEMAN; KATAN, 1997; FREEMAN et al., 2000; FREEMAN; SHABI, 1996; GUNNELL; GUBLER, 1992).

### 2.3.1 *Colletotrichum* spp. em Cafeeiro

O primeiro relato da ocorrência de espécies de *Colletotrichum* em cafeeiro foi feito por Noack em 1901, que o denominou como *Colletotrichum coffeanum* Noack, nomenclatura utilizada durante várias décadas para todas as espécies do gênero isoladas nesta cultura (WALLER et al., 1993). Porém, estudos com base em critérios morfológicos, bioquímicos e de patogenicidade (VON ARX, 1957; HINDORF, 1975; WALLER et al., 1993), evidenciaram que são três as espécies de *Colletotrichum* que podem ser isoladas de frutos, folhas e ramos de cafeeiro, *Colletotrichum acutatum* Simmond, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum kahawae* Waller (HINDORF, 1975; MASABA; WALLER, 1992;), sendo

esta última espécie restrita em países do continente africano (WALLER et al., 1993) e recentemente detectada em Cuba (FREITAS; MENDES, 2005).

Entre as principais doenças em cafeeiro atribuídas a espécies do gênero *Colletotrichum* estão: a) antracnoses, as quais incluem lesões subcirculares ou angulares irregulares, grandes e de coloração castanha, ocorrendo, comumente, nas margens da folha, nas quais massas de esporos e estruturas da fase sexual do fungo são visíveis (HINDORF, 1975; SUTTON, 1980; CHALFOUN, 1997; LOPEZ, 2001); b) “*die-back*”, queima das folhas do cafeeiro, próxima à extremidade dos ramos secundários, com posterior morte e queda, e, em seguida, os internódios verdes dos ramos novos tornam-se necróticos; c) “*elon dieback*”, lesões escuras, deprimidas em frutos maduros ou em processo de maturação, incapaz de atacar frutos verdes e, em alguns casos, observa-se a fase sexuada do fungo denominada *Glomerella cingulata*. Estes sintomas foram identificados em materiais oriundos do Leste Africano, em regiões onde não foi constatada a presença de *C. kahawae* (HOCKING, 1966); d) *coffee berry disease* (CBD), doença restrita ao Continente Africano, causada por *C. kahawae*, que ocasiona manchas deprimidas e escuras nos frutos verdes (Figura 2.1). À medida que a doença evolui, estas manchas aumentam rapidamente de tamanho e eventualmente cobrem todo o fruto. Em ataques severos, a maior parte dos frutos são mumificados, porém, não caem. É comum, notar em ramos, acérvulos com massa de esporos de coloração róseo pálido, característicos de *Colletotrichum* spp. (NUTMAN; ROBERTS, 1964); e) mancha manteigosa, a doença apresenta sintomas característicos como manchas circulares, não-necróticas, folhas de coloração verde-pálida a amarela, queda prematura da folhas e frutos com os mesmos sintomas (SHAW, 1968). Sintomas inicialmente identificados na Costa Rica foram descritos como uma doença de natureza virótica, porém sem comprovação de transmissão (WELLMAN, 1957). Posteriormente, foram atribuídos a espécies de *Colletotrichum* spp. e denominado como mancha-manteigosa (VARGAS; GONZALEZ, 1972). No Brasil, Bitencourt (1958) já havia observado os sintomas em 1938, no entanto, não considerou a doença significativa para a cultura.

Entre as doenças causadas por espécies de *Colletotrichum*, a CBD é, sem dúvida, a mais importante doença que afeta a cultura do café, causando perdas de até 80% na produção, considerada um fator limitante nas áreas de ocorrência (SILVA et al., 2006). Inicialmente, a doença atacava cafeeiros apenas presentes no Quênia, e posteriormente foi disseminada para a África do Sul, Angola,

Congo, Camarões, Etiópia, Ilhas Maurício, Malawi, Moçambique, República da África Central, Ruanda, Tanzânia, Uganda, Zaire e Zâmbia (HOLLIDAY, 1980).

Em função da importância da CBD dentro da cultura do cafeeiro, ela tem recebido maior atenção entre os grupos de pesquisa. Estudos mostram que a concentração ótima da suspensão de conídios para reprodução dos sintomas em frutos verdes foi entre  $10^5$  e  $10^6$  conídios por ml (NUTMAN, 1970; FEITOSA et al., 1977). O período de incubação para lesões nos frutos variou entre cinco e oito dias, podendo ocorrer até 30 dias após a inoculação, para a reprodução dos sintomas em flores. A penetração do fungo foi estabelecida 2,5 horas após a inoculação (PEREIRA; CHAVES, 1978). A temperatura ótima para a germinação dos esporos foi determinada próxima de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , podendo variar de  $17$  a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  e o crescimento micelial foi de  $23\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (NUTMAN; ROBERTS, 1960; VERMEULEN, 1970; FEITOSA et al., 1977; PEREIRA; CHAVES, 1978). A alta umidade afeta diretamente a germinação e a infecção pelos esporos (NUTMAN; ROBERTS, 1960). Nenhum relato da doença foi descrito na América do Sul, onde *C. arabica* é extensivamente cultivada. Embora a doença esteja restrita ao continente Africano, regiões produtoras devem adotar medidas preventivas para evitar sua introdução (SILVA et al., 2006).

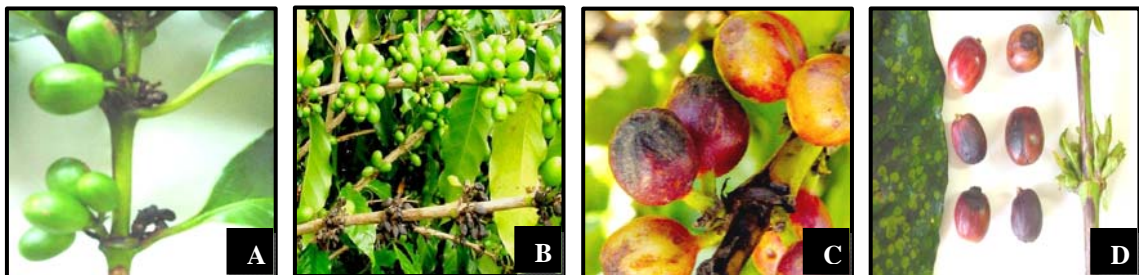


**Figura 2.1** – Sintomas de *Coffee Berry Disease* (CBD) causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae* em plantas de cafeeiro. A, lesão necrótica deprimida com a presença de esporos em frutos verdes de café; B, frutos mumificados em ramos de cafeeiros; C, cafeeiro com sintomas de CBD em diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos (SILVA et al., 2006; VÁRZEA et al., 2002).

Nos últimos anos, sintomas como necrose, seca e mumificação de frutos verdes tem sido relatados no Brasil em todas as regiões produtoras de café

arábica. Além destes, seca de ramos e ponteiros e mancha-manteigosa em folhas (Figura 2.2) são sintomas observados e constantemente associados com a presença de *Colletotrichum* spp. (ALMEIDA et al., 1979; DORIZZOTTO; ABREU, 1993; NECHET; ABREU, 1992; PARADELLA-FILHO et al, 2001; OROZCO-MIRANDA, 2003; FERREIRA, 2004; PEREIRA, 2005; SERA et al., 2005; LINS et al., 2007).

Embora, *Colletotrichum* spp. seja isolado de plantas com sintomas característicos, a importância do fungo na cultura do cafeeiro no Brasil ainda é bastante questionável, sobretudo devido à dificuldade na indução dos sintomas em condições controladas (DORIZZOTTO, 1993; DIAS, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003; FERREIRA, 2004; ZAMBOLIM et al., 2003; 2005). Segundo Orozco-Miranda (2003), o patossistema *Colletotrichum* cafeeiro no Brasil é composto por populações de espécies de *Colletotrichum* associadas, ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma invasiva, sem manifestação de sintomas. A interação entre *Colletotrichum* spp. e plântulas de cafeeiro foi observada por Ferreira (2004) que constatou que o patossistema é muito variável, dependendo sobretudo da suscetibilidade do hospedeiro, da variabilidade genética dos isolados e do período necessário para expressão dos sintomas após inoculação.



**Figura 2.2** – Sintomas associados à *Colletotrichum* spp. em cafeeiros no Brasil. A, necrose em inflorescências e abortamento de frutos; B, necrose e mumificação de frutos verdes em estágio de expansão; C, necrose em frutos no estágio cereja; D, folha com sintoma de mancha manteigosa e frutos no estágio cereja com sintomas de necrose (SILVA et al., 2005).

A mancha manteigosa corresponde à doença de cafeeiro causada por *Colletotrichum* sp. mais estudada até o momento no Brasil. Mansk e Matiello (1977) detectaram a ocorrência de mancha manteigosa em mudas de *C. canephora*

ainda no viveiro, porém, maior severidade da doença foi observada em folhas e ramos jovens de plantas adultas. Desfolha e seca progressiva dos ramos foram observadas da extremidade para a base em todas as brotações afetadas, acarretando morte prematura das plantas. A partir de 1993, uma série de trabalhos tem sido realizados no intuito de investigar as populações de *Colletotrichum* spp. isoladas de cafeeiros sintomáticos, assim como a confirmação do agente patogênico e indução dos sintomas observados no campo. Estudo realizado por Dorizzoto (1993) caracterizou morfologicamente e por meio de testes de patogenicidade isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de regiões cafeeiras do Estado de Minas Gerais. O autor identificou o fungo isolado da mancha manteigosa como *C. gloeosporioides*, com características morfológicas idênticas às do agente da CBD, porém não se tratando da variante (CBD) presente na África. Outros trabalhos com base em critérios morfológicos, bioquímicos e moleculares foram empregados na caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de diferentes regiões cafeeiras e confirmaram a presença da espécie *C. gloeosporioides* associada aos sintomas de cafeeiro, apresentando variabilidade nessas características (NECHET; ABREU, 2002; DIAS, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003; JULLIATI et al., 2006). Ferreira (2004), estudou a flutuação sazonal e a associação de *C. gloeosporioides* com diferentes órgãos e tecidos de cafeeiros, constatando a incidência do fungo nos diferentes estádios de formação dos frutos e em ovários de flores recém-fecundadas, com a presença e ausência de sintomas da mancha manteigosa. Observação semelhante foi descrita por Lins et al. (2004), quando relataram a presença de *C. gloeosporioides* em diferentes tecidos de hipocótilos e frutos de cafeeiro com incidência média de 86% em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos.

Por meio de compatibilidade vegetativa e sexual e estudos histopatológicos foi possível observar a variabilidade da população de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de ramos e frutos de cafeeiros (PEREIRA, 2005). O autor constatou ainda, que frutos de cafeeiro com mancha manteigosa apresentam alta colonização por *C. gloeosporioides* bem como ramos com secas descendentes apresentam o xilema, floema e o tecido corticoso colonizados por esta espécie, inferindo, portanto, que *C. gloeosporioides* é o agente causal da seca de ponteiros. Lins et al. (2007) realizaram um estudo detalhado de microscopia eletrônica, acompanhando os processos de pré e pós-penetração de

diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas de cafeeiro obtidas por cultura de embrião e reportaram a capacidade de infecção de *C. gloeosporioides* em tecidos de cafeeiro

Com relação aos testes de patogenicidade, vários autores inocularam frutos verdes, plântulas de cafeeiro com intuito de induzir os sintomas observados em campo. Nechet e Abreu (2002) verificaram a patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides* em frutos verdes e plântulas e observaram infecção máxima de 51,27% e 24,55%, respectivamente, aos trinta dias após a inoculação, entretanto os isolados não induziram sintomas em mudas. Fernandes (2000) induziram lesões em frutos verdes, apresentando incidência entre 12,5% e 37,5%. Porém, as lesões foram observadas somente em frutos feridos mecanicamente, não sendo observadas lesões nos frutos em estágio cereja. Dias (2002) realizou teste de patogenicidade em plântulas de cafeeiro obtidas por cultura de embrião e verificou que isolados provenientes de tecidos sintomáticos com mancha manteigosa foram patogênicos em hipocótilos (estádio palito de fósforo), sugerindo, portanto, que o agente causal da mancha manteigosa é *C. gloeosporioides*. Este resultado foi reforçado posteriormente por Orozco-Miranda (2003), que comprovou a variabilidade genética entre isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de plantas de cafeeiro, sugerindo a existência de raças patogênicas nesta cultura.

São escassas as informações a respeito de perdas causadas por *Colletotrichum* spp. em cafeeiros. Segundo Dorizoto (1993), as perdas são relatadas nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta, principalmente, durante o crescimento vegetativo, onde a queda prematura de frutos e inflorescências ocorre em conjunto com disfunções fisiológicas e fotossintéticas.

#### 2.4 MECANISMOS DA PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum* spp.

No reino Fungi, a capacidade de causar doenças em plantas parece ter originado múltiplas vezes durante a evolução. Cada espécie tem evoluído de maneira especial para invadir as plantas e causar doença (KOGEL et al., 2006). Um aspecto importante é que a evolução da patogenicidade pode estar relacionada à expansão de certas famílias de genes, provavelmente associadas a processos

patogênicos tais como degradação da parede celular vegetal, biossíntese de toxinas e metabólitos secundários, formação e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (SOANES et al., 2008). Uma vez dentro da planta, três estratégias de colonização podem ser empregadas: necrotrofia, biotrofia ou hemibiotrofia (KOGEL et al., 2006).

Em espécies do gênero *Colletotrichum* a infecção ocorre pela presença de várias enzimas produzidas pelo fungo (cutinases, celulasas, pectinases e poligalacturonases). A hifa penetra a cutícula do tecido e a infecção se desenvolve a partir de um apressório observado três a quatro dias após a inoculação (WALLER, 1992). A partir deste ponto, várias estratégias de colonização dos tecidos são utilizadas pelo fungo, variando de acordo com o hospedeiro (BAILEY; JEGER, 1992). Em frutos, a penetração é geralmente direta, por hifas não diferenciadas, através de células com cutícula fina, estômatos ou ferimentos. Alguns estudos têm demonstrado que o fungo apresenta estratégias especializadas para alguns hospedeiros, como ocorre na interação com solanáceas (KUROZAWA; PAVAN, 1997).

Espécies de *Colletotrichum* hemibiotróficos intracelulares podem ser divididas em dois grupos: I) fase biotrófica se estende para muitas células do hospedeiro, como por exemplo *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*) e *C. kahawae* em café (*C. arabica*); II) fase biotrófica ocorre somente dentro da célula epidérmica infectada, como por exemplo *Colletotrichum destructivum* em alfafa (*Medicago stiva*). Poucas espécies de *Colletotrichum* (principalmente *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*) são endófitos mutualistas ou endófitos quiescentes o qual utilizam algum recurso após um período de latência para iniciar seu estado necrotrófico (PRUSKY; PLUMBIEY, 1992; SILVA et al., 2006). Espécies de *Colletotrichum* podem expressar seu estilo de vida mutualista ou parasítico, dependendo do genótipo do hospedeiro colonizado (RODRIGUEZ; REDMON, 2008). Em mamão, quando os frutos estão imaturos, o patógeno normalmente penetra pela cutícula, mas seu desenvolvimento é interrompido, permanecendo na forma latente nas células epidérmicas. O fungo só é capaz de colonizar os tecidos deste hospedeiro, após seu amadurecimento, quando mudanças fisiológicas estimulam o desenvolvimento do patógeno (LOPEZ, 2001). Em cafeeiro, *Colletotrichum* spp. podem ser isolados tanto de tecidos necrosados como aqueles sem sintomas, o que torna sua importância para a cultura ainda muito discutida, pois tratam-se de

populações de espécies de *Colletotrichum* ocasionando diversos sintomas ou colonizando plantas de forma endofítica (ZAMBOLIM et al., 2003).

Ferreira et al. (2005), realizaram um estudo detalhado da incidência de *Colletotrichum* em frutos assintomáticos de cafeeiro, observando diferentes estádios de desenvolvimento do fruto de cafeeiro e nos tecidos do exocarpo + mesocarpo, endocarpo e endosperma de frutos maduros. O estudo possibilitou verificar que nos estádios de formação do fruto foi encontrada alta incidência do fungo, com média de 86,6%. Foi possível verificar ainda que a incidência do fungo variou de acordo com os cultivares testados, assim como nos diferentes tecidos do fruto. Estes resultados evidenciam a presença de colonização endofítica de *Colletotrichum* spp., a qual é independente do estágio de formação do fruto. O termo endofítico tem sido utilizado para organismos que habitam plantas sem causar sintomas de doenças. Porém, o termo é determinado a estes organismos no momento de sua descoberta, não levando em consideração suas interações futuras, isto é, este organismo poderá atuar como patógeno em um determinado momento de interação com o hospedeiro e o ambiente (SCHULZ; BOYLE, 2005).

A hipótese de que estas interações são neutras é relatada por Schulz e Boyle (2005). Esta neutralidade é adquirida pelo equilíbrio antagonista gerado entre o endófito e o hospedeiro, independente do órgão da planta infectada. Fungos endofíticos apresentam fatores de virulência que habilitam sua infecção, sendo, portanto o mecanismo de defesa do hospedeiro o limite para o desenvolvimento de doenças. Além disso, estes autores retratam que fungos identificados como endófitos contrariamente aos patogênicos, apresentam maior plasticidade fenotípica, conseqüentemente adquirem um número maior de estratégias de infecção, colonização, latência, virulência, patogenicidade e/ ou saprofitismo. Esta plasticidade é um acelerador na evolução destes fungos e muitas vezes atribuem maior habilidade patogênica que as já determinadas aos fungos patogênicos (SCHULZ; BOYLE, 2005).

A capacidade de infecção de *C. gloeosporioides* em cafeeiro foi relatada por Lins et al. (2007), após detalhado estudo dos processos de pré e pós-penetração de *Colletotrichum* spp. em plantas de cafeeiro obtidas por cultura de embrião. Através da microscopia eletrônica, verificou-se que conídios de *Colletotrichum* spp. aderiram com maior frequência nas depressões de hipocótilos e células guardas originando um septo antes da germinação. O processo germinativo

foi iniciado cinco horas após a inoculação, emitindo tubos germinativos tanto nas extremidades como lateralmente. Apressórios globosos foram produzidos por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* 24 horas após a inoculação e hifas de todos os isolados penetraram nos tecidos através de estômatos ou ferimentos. A produção de acérvulos foi obtida 72 horas após a inoculação por *C. gloeosporioides* obtidos de ramos de cafeeiro, 96 horas para *C. demathium* e seis dias após a inoculação para o isolado de *C. acutatum*. Isolado de *C. gloeosporioides* obtido de manga (*Mangifera indica*) colonizou tecidos de cafeeiro, no entanto, sem produção de acérvulo.

## 2.5 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

O componente genético da biodiversidade é fundamental para estudos de diversidade, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (ALLCOCK et al., 1995). Além disto, a variabilidade genética presente em uma população pode ser utilizada como instrumento de investigação em diversos ramos da biologia (SOLÉ-CAVA, 2001). Durante muito tempo, características morfológicas e fisiológicas foram as únicas ferramentas utilizadas para a definição das filogenias (ARRIEL et al., 2006). Com o desenvolvimento dos marcadores moleculares, os estudos de variação genética foram facilitados, no entanto, critérios morfológicos, culturais e fisiológicos não podem ser abandonados, uma vez que, estes dados são complementares e importantes para a melhor compreensão de uma população (ARRIEL et al., 2006).

As técnicas baseadas em marcadores moleculares permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores cobrindo todo o genoma do organismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Marcadores moleculares são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade e que podem ser associadas com o problema a ser estudado. Essa variabilidade, permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (RUSSO et al., 2001). Para escolha de um marcador adequado, deve-se considerar a adequação do grau de variabilidade do marcador molecular escolhido ao nível da divergência que se deseja obter. Marcadores que evoluem mais rapidamente são úteis para o estudo

de indivíduos, famílias e populações, enquanto que marcadores que evoluem mais lentamente são melhor utilizados no estudo de espécies ou táxons supra específicos (SOLÉ-CAVA, 2001).

A atuação das forças evolutivas no processo de coevolução gera variabilidade tanto nas populações de plantas como de fungos. Por meio de mutações surgem novos alelos nas populações, os quais sofrem seleção e são rearranjados graças à recombinação genética, havendo dispersão destes alelos quando ocorrem migrações de indivíduos de um local para outro (BARBIERI; CARVALHO, 2001). Segundo Burdon e Silk (1997), a combinação de mecanismos como seleção, deriva genética, migração e mutação definem a estrutura genética e a diversidade de todas as populações patogênicas, sendo que o papel relativo de cada um destes fatores pode variar intensamente entre diferentes associações planta/patógeno, entre os estádios do ciclo epidemiológico, e entre associações em ecossistemas naturais ou agrícolas.

A origem de novos alelos pode ser ocasionada pela substituição de um nucleotídeo por outro, denominadas mutações pontuais, pela inserção, deleção ou ainda inversões de sequências de nucleotídeos (CALCAGNOTTO, 2001). A taxa de substituição de nucleotídeos apresenta-se bastante variável e depende muito de qual parte do genoma está sendo analisada. Alguns dados moleculares podem ser usados para acessar relações evolutivas entre organismos distantemente relacionado (como sequências de proteínas e RNA ribossomal usados para reconstruir as relações entre fungos, plantas e animais) enquanto poucos caracteres morfológicos podem ser usados para esse propósito.

A partir dos anos 90, diferentes técnicas foram utilizadas para caracterizar diferentes espécies de *Colletotrichum*: PCR com iniciadores específicos (MILLS et al., 1992b; MARTÍNEZ-CULEBRAS et al., 2003), análise de fragmentos ricos em A+T (FREEMAN; RODRIGUEZ, 1995; FREEMAN; KATAN, 1997), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e hibridização DNA-DNA (LYANAGE et al., 1992; BERSTEIN et al., 1995; BROWN et al., 1996), RFLP de rDNA e mtDNA (SREENIVASAPRASAD et al., 1992; ALAHAKOON et al., 1994; HODSON et al., 1993; BUDDIE et al., 1999; TALHINHAS et al., 2002), RAPD (ALAHAKOON et al., 1994; MILLS et al., 1992b; LARDNER, 1999), sequenciamento da região 28S rRNA (SHERIFF et al., 1994; BAILEY et al., 1996), sequenciamento da região ITS do rDNA (SREENIVASAPRASAD et al., 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1994; SAHA et

al., 2002) e AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (O' NEIL et al., 1997). Estas informações têm possibilitado acessar a diversidade existente entre populações, além de distinguir espécies muito próximas como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, caracterizar a especificidade por hospedeiro, caracterizar isolados patogênicos de não patogênicos, caracterizar a produção de metabólitos e em alguns casos possibilitam a construção direta de *primers* específicos para estas características.

### 2.5.1 Diversidade Genética com Base na Região Intergênica (ITS) do rDNA

A amplificação do DNA ribossomal (rDNA) foi uma das primeiras aplicações da PCR na micologia (WHITE et al., 1990). Estudos moleculares envolvendo o grupo gênico do rDNA e as regiões espaçadoras internas transcritas (regiões ITS1 e ITS2) têm facilitado a identificação de fungos e contribuído para ampliar o conhecimento da diversidade microbiana nos últimos anos (FUNGARO, 2000 ; MORIWAKI et al., 2002; VILLA et al, 2006). As sequências do rDNA constituída pelos genes 18 S, 5,8 S e 28 S são organizadas em tandem e estão presentes de maneira conservada em todos os organismos. Estas regiões evoluem lentamente quando comparada com outras regiões do genoma e, portanto, são amplamente utilizadas para estudos filogenéticos de fungos, permitindo discriminar espécies relacionadas ou variedades de uma mesma espécie (APEL; GORDON, 1995; FUNGARO, 2000). As regiões ITS do rDNA evoluem de forma bastante rápida quando comparado ao DNA nuclear e ao DNA mitocondrial e pode variar entre espécies de um mesmo gênero ou entre populações (WHITE et al.,1990). O fato das regiões ITS serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permitem agregar maior vantagem ao seu uso, facilitando sua amplificação por PCR e sequenciamento (CARBONE; KOHN, 1997; COOKE; DUNCAN, 1997; SLOUBOE et al., 1999; LEAL-JUNIOR, 2002). Como consequência, um grande número de sequências ITS de diferentes fungos estão atualmente disponíveis para estudo e comparações nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos propiciando inferir sobre sua filogenia em níveis taxonômicos superiores. A utilização de programas computacionais permite a

comparação de sequências entre organismos alvos e não alvos, propiciando a definição de regiões adequadas para a síntese de *primers* específicos, utilizados para detectar uma determinada espécie fúngica (FUNGARO, 2000). Em estudos filogenéticos comparando *Colletotrichum* patogênicos na cultura do morango, Martinez-Culebras et al. (2003) identificaram uma região em *C. acutatum* que foi usada para a construção de *primers* específicos para essa espécie.

Outra metodologia aplicada ao estudo da diversidade genética de fungos é a técnica de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), que consiste na amplificação específica da região ITS do rDNA e posterior clivagem com enzimas de restrição (JORGENSEN; CLUSTER, 1989). O valor deste método está na sua rapidez e habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, efetuando análises em vários níveis de classificação, inclusive em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações e diversidade microbiana (JORGENSEN; CLUSTER, 1989; ABD-ELSALAM et al., 2003).

Para a separação de espécies muito próximas como *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, a técnica de ARDRA tem sido amplamente utilizada. Freeman et al. (2001) relatam a separação destas espécies após restrição do produto amplificado da região ITS com a enzima *RsaI*, no entanto, com as enzimas *BamHI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HindIII*, *MspI*, *PstI*, *StuI* e *TaqI* esta distinção não foi possível. Para as espécies muito próximas, como no caso de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, diversos *primers* são construídos com base nas sequências de ITS do rDNA, porém, em alguns casos, o único método de separação entre as espécies só é possível com a utilização da clivagem do produto amplificado (MARTINEZ-CULEBRAS et al., 2003)

#### 2.5.2 Diversidade Genética com Base em *Primers* Arbitrários de Sequências Repetitivas

No início dos anos 80, diferentes estudos demonstraram que genomas eucariotos possuem uma ampla variedade de sequências repetitivas, denominadas SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites (TAUTZ, 1989).

Estas regiões correspondem a sequências curtas (6 nucleotídeos) frequentes e distribuídas em *tandem*. Os marcadores SSR utilizam iniciadores específicos que amplificam regiões do DNA repetitivo reconhecendo regiões flanqueadoras às mesmas (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998). Os locos SSR apresentam uma vasta aplicabilidade, porém, o uso deste marcador requer o conhecimento prévio das sequências flanqueadoras do SSR para a seleção dos *primers* que serão utilizados na reação de PCR (LIU; WENDEL, 2001). Além disso, caracterizar um número grande de SSR demanda tempo, e é um processo bastante oneroso.

Como opção, Gupta et al. (1994) propuseram a técnica de SPAR (*Single Primer Amplification Reaction*) ou ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Esta técnica utiliza um único *primer* correspondendo à sequência repetitiva. O produto existente entre as duas regiões repetitivas, e ao contrário do que acontece na análise de locos de microssatélite não é necessário conhecer as regiões flanqueadoras, isto é, não necessitam de sequenciamento prévio. Em adição, a análise de ISSR é tecnicamente simples quando comparada a outros tipos de marcadores e apresenta alta reprodutibilidade com abundante polimorfismo (LIU; WENDEL, 2001). Este método apresenta resultados similares aos marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), porém, apresentam maior reprodutibilidade e grande consistência dos resultados (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001). Este tipo de marcador tem sido muito utilizado no intuito de verificar a homogeneidade genética entre populações avaliadas. Freeman et al. (2001), estudando uma população de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, conseguiram observar heterogeneidade entre isolados de *C. gloeosporioides*. Já os isolados de *C. acutatum* investigados foram separados em duas subpopulações: uma subpopulação com clonalidade dos isolados e outra separada de acordo com origem do isolado ou hospedeiro. Em estudo semelhante, Talhinhos et al. (2005) descreveram cinco subpopulações de isolados de *C. acutatum* e os diferenciaram de isolados de *C. gloeosporioides*.

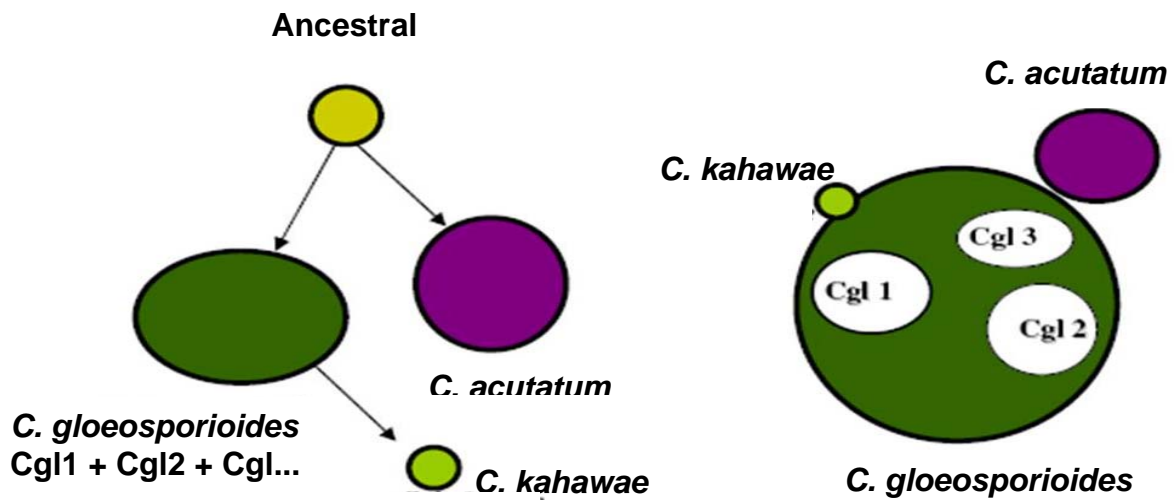
## 2.6 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Colletotrichum* spp. OBTIDOS DE CAFEIEIRO

Von Arx (1957) deu início aos estudos taxonômicos sobre *C. coffeanum* e, posteriormente, outros trabalhos foram realizados no intuito de separar isolados patogênicos dos não-patogênicos, inferindo caracteres morfológicos capazes de diferenciá-los (RAYNER, 1948; MASSABA; WALLER, 1992). Diferenças significativas foram observadas na morfologia, genética e também na epidemiologia entre isolados desta espécie. Rayner (1952) propôs a nomenclatura *C. coffeanum* “var. *virulans*” para denominar somente fungos causadores da CBD (*Coffee Berry Disease*) (apud DORIZOTO, 1993). Entretanto, Sutton (1992) afirma que a identificação dessa espécie como um táxon específico para o gênero *Coffea* é incorreta, pois outras espécies são também identificadas na cultura. Com base em caracteres culturais, metabólicos e de patogenicidade, Waller et al. (1993) propuseram a mudança do nome *C. coffeanum sensu* Hindorf para *C. kahawae* J. M. Waller e P. D. Bridge, para aqueles isolados de CBD, já que *C. coffeanum* foi descrito no Brasil. Atualmente, com o uso de técnicas moleculares, foi possível confirmar que o nome *C. coffeanum* empregada inicialmente para designar isolados provenientes de *C. arabica* é sinônimo de *C. gloeosporioides* (SREENIVASAPRASAD et al., 1993; MILLS et al., 1992a).

Análises moleculares, como a clivagem do produto amplificado do rDNA e sequenciamento de suas regiões conservadas (ITS) têm sido utilizadas para elucidar a variação molecular de isolados de *C. gloeosporioides* em outras culturas (BEYNON et al., 1995; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; AGWANDA et al., 1997; FREEMAN et al., 2000; LOPEZ, 2001). Com base nas sequências ITS 1 e ITS 2 do rDNA, Sreenivasaprasad et al. (1996) reorganizaram 93 isolados de *Colletotrichum* em 18 espécies, pertencentes a seis grandes grupos. Esses grupos não foram congruentes com as categorias de espécie estabelecidas com base na morfologia de conídios e a evidência molecular sugere que a classificação de algumas categorias deve ser revista. Os autores sugerem ainda que *C. kahawae* deveria ser incluído nos grupos de *C. gloeosporioides*, em nível subespecífico. Esta observação é confirmada por González (2007), ao realizar estudos inter e intraespecíficos entre as espécies de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* presentes em cafeeiro na Venezuela. O autor compara estas espécies com isolados de *C. kahawae* e conclui que isolados de *C.*

*kahawae* e *C. gloeosporioides* apresentam diferenças morfológicas e bioquímicas, no entanto, estão presentes no mesmo grupo filogenético.

A espécie *C. kahawae* tem sido considerada uma espécie que co-evoluiu recentemente com espécies de *Coffea* spp., mas que não foi relatada no centro de diversidade de *C. arabica* L. antes de 1970 (WALLER; BRIDGE, 2000; FREITAS; MENDES, 2005). A hipótese do surgimento desta espécie patogênica é o aparecimento de uma espécie parasítica fraca, associada a espécies selvagens de *Coffea* spp. na África Central e que tornou-se virulenta com o aumento do plantio de *C. arabica* nesta região (OMONDI et al., 1999). Feitosa et al. (1977) sugerem que uma mutação da espécie *C. gloeosporioides* para uma raça patogênica originou a espécie *C. kahawae*. Esta seleção seria resultante do uso intensivo de fungicidas cúpricos aplicados para o controle da doença da ferrugem do cafeeiro (FEITOSA et al., 1977). Isto é reforçado por estudos filogenéticos que evidenciam que as espécies *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* são muito próximas (SREENIVASAPRASAD et al., 1993). González (2007) aponta duas hipóteses para a proximidade destas espécies. A primeira é de que o grupo *C. gloeosporioides* é dividido em subgrupos (Cgl1; Cgl2 + Cgl...) e tende a ser mais similar entre si do que ao restante do grupo em nível intraespecífico. Por ser um grupo tão variável, mudanças ocorridas com o passar do tempo, fizeram com que um dos subgrupos de *C. gloeosporioides* divergisse do grande grupo, adquirindo então a virulência e a capacidade de causar doença em frutos verdes de café e por isso considerado uma espécie distinta (*C. kahawae*). A segunda hipótese (Figura 2.3), é de que assim como na primeira, o processo evolutivo teria sido responsável por mudanças que originou estas duas espécies. Com a espécie *C. acutatum* provavelmente o processo tenha sido mais longo ou ocorreu de forma mais acelerada do que para a espécie *C. kahawae*. A espécie *C. acutatum* é muito próxima de *C. gloeosporioides*, porém, mais virulenta (Figura 2.3). No entanto, para Bridge et al. (2008), estas espécies apresentam características morfológicas, bioquímicas e patogênicas distintas.



**Figura 2.3** – Hipótese do surgimento das três espécies de *Colletotrichum* associadas à *Coffea arabica* após estudos de diversidade intra e interespecíficos. A, hipótese de que tanto *C. acutatum* como *C. gloeosporioides* são considerados monofiléticos, tendo evoluído de um ancestral comum; B, hipótese de que um grande grupo formado por isolados de *C. gloeosporioides* seja ancestral comum das espécies *C. acutatum* e *C. kahawae* (GONZALES, 2007)

### 3 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica* (L.)

#### Resumo

A cultura do café no Brasil vem sendo acometida por uma série de doenças, cujos sintomas vão desde necrose dos frutos e ramos, queima e seca de ponteiros e ocorrência de mancha manteigosa em folhas. A associação de espécies de *Colletotrichum* a estes sintomas tem sido descrita por vários autores, sobretudo as espécies *Colletotrichum acutatum* e predominantemente *Colletotrichum gloeosporioides*. Foi objetivo deste trabalho investigar a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e outras culturas em frutos verdes de diferentes cultivares de *Coffea arabica*. Os frutos verdes destacados dos cultivares Catuaí, Catuaí arrepiado, Costa Rica, Palma, Rubi, Semperflorens, IAPAR 59, IAPAR 101 e IAPAR 103 foram desinfestados, feridos com agulha esterilizada e inoculados com uma suspensão de  $10^6$  conídios/ml de diferentes quatro isolados de *Colletotrichum* spp. Cultivares IAPAR 59 e IAPAR 103 foram considerados, respectivamente, como sendo o mais resistente e o mais suscetível aos isolados de *C. gloeosporioides*. O isolado I-12 mostrou-se o mais agressivo entre os isolados testados e o isolado de caqui não reproduziu sintomas nos frutos de café. Para a avaliação da patogenicidade de *Colletotrichum* spp., frutos verdes destacados de cafeeiro do cultivar IAPAR 103 foram inoculados com 87 isolados do fungo obtidos de cafeeiro de diferentes regiões produtoras e 77 isolados obtidos de outros hospedeiros. Embora isolados de todas as culturas tenham sido efetivos em reproduzir sintomas em frutos verdes de cafeeiro, os isolados considerados mais agressivos foram os provenientes do próprio cafeeiro. Alta variabilidade na reprodução dos sintomas e no tipo de lesão causada foi observada mesmo entre os isolados obtidos de cafeeiro. Os sintomas reproduzidos *in vitro* foram semelhantes aos encontrados no campo em frutos verdes de cafeeiro.

**Palavras Chave:** *Coffea arábica*. Patogenicidade. Antracnose.

### PATHOGENICITY OF *Colletotrichum* spp. ISOLATES ON *Coffea arabica* (L.)

#### Abstract

In Brazil, coffee plantations are affected by several diseases which present a range of symptoms including necrosis on fruits and branches, die back and buttery leaf spot. The association of species of *Colletotrichum* with these symptoms has been described by several authors, particularly the species *Colletotrichum acutatum* and predominantly, *Colletotrichum gloeosporioides*. The objective of this study was to investigate the pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from coffee and other crops to immature coffee berries of different cultivars of *Coffea arabica*. Immature berries of Catuaí, Catuaí Arrepiado, Costa Rica, Palma, Rubi, Semperflorens, IAPAR 59, IAPAR 101 and IAPAR 103 cultivar were initially disinfested, then wounded with sterile needle and inoculated with a suspension of  $10^6$  conidia/ml of four different

*Colletotrichum* spp. The cultivars IAPAR 59 and IAPAR 103, respectively, were the most resistant and most susceptible to *Colletotrichum*. Strain I-12 of *C. gloeosporioides* was the most aggressive among the isolates and a persimmon fruit isolate did not cause symptoms on coffee. For the evaluation of the pathogenicity of *Colletotrichum* spp. green berries detached from IAPAR cultivar were inoculated with 87 isolates of *Colletotrichum* from coffee and 77 isolates from other hosts. Although isolates from all hosts were effective in reproducing symptoms on green berries of coffee, the most aggressive were the isolates from coffee. High variability among isolates observed in reproducing symptoms and the kind of lesions, even among those obtained from coffee. The symptoms *in vitro* were similar to the one found on green coffee berries in the field.

**Key Words:** *Coffea arabica*, pathogenicity; anthracnose

### 3.1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Colletotrichum* (teleomorfo: *Glomerella*) estão entre os principais patógenos responsáveis por doenças em culturas de importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BAILEY; JEGER, 1992; FREEMAN et al., 2000), causando perdas significativas em cereais, gramíneas, hortaliças e em culturas perenes (FREEMAN et al., 1998; SANDERS et al., 2000; SILVA et al., 2006). Uma das doenças causada por fungos desse gênero é a antracnose. Fungos do gênero *Colletotrichum* caracterizam-se por uma ampla variabilidade em seus aspectos morfológicos, culturais, genéticos e patogênicos (BAILEY; JEGER, 1992). Podem ser isolados tanto de tecidos sadios como doentes (JEFFRIES et al., 1990; RODRIGUES; PETRINI, 1997; CANNON; SIMMONS, 2002) e muitas vezes, são definidos como patógenos oportunistas (BAILEY; JEGER, 1992; FREEMAN et al., 2000). São identificados frequentemente em associação com outros patógenos, em tecidos danificados mecanicamente ou em plantas com alterações fisiológicas (BAILEY; JEGER, 1992). Diferentes agrossistemas ou regiões geográficas podem também influenciar na expressão da patogenicidade deste fungo.

Em cafeeiro o primeiro relato da ocorrência do gênero *Colletotrichum* foi feito no Brasil por Noack em 1901, que classificou a espécie como *Colletotrichum coffeanum* Noack. Esta denominação foi utilizada durante várias décadas para identificar todos os isolados do gênero *Colletotrichum* obtidos de cafeeiro. Porém, estudos morfológicos, bioquímicos e de patogenicidade (VON ARX, 1957; HINDORF, 1975; WALLER et al., 1993) evidenciaram que são três as espécies de

*Colletotrichum* que podem ser isoladas de frutos, folhas e ramos de cafeeiro: *Colletotrichum acutatum* Simmond, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum kahawae* Waller (HINDORF, 1975; MASABA; WALLER, 1992; WALLER et al., 1993). Esta última espécie está restrita a países do Continente Africano (SILVA et al., 2006), tendo sido recentemente detectada em Cuba (FREITAS; MENDES, 2005).

Os principais sintomas associados às doenças causadas por *Colletotrichum* spp. em cafeeiro são abortamento de flores, abortamento e mumificação de frutos jovens, lesões deprimidas e necróticas em frutos verdes, seca de espículas e ramos, necrose e mancha manteigosa em folhas (FIRMAN; WALLER, 1977; PARADELA-FILHO et al., 2001).

No Brasil, esses sintomas são observados frequentemente em cafeeiro e embora espécies como *C. acutatum* e principalmente *C. gloeosporioides* sejam isoladas de tecidos sintomáticos, são muitas vezes atribuídos a fatores fisiológicos como, deficiência nutricional e reações fisiológicas do cafeeiro (ZAMBOLIN; VALE; ZAMBOLIN, 2003, 2005). Esta hipótese tem suporte na observação de que fungos da espécie *C. gloeosporioides* podem ser isolados a partir de tecidos sadios, inclusive, de sementes, assim como, sua ocorrência como um saprófito em todas as regiões onde a cultura está instalada (DERSO; WALLER, 2003; CHEN et al., 2005; FERRERIA et al., 2005; SILVA et al., 2006). Isto tem gerado controvérsias sobre a real causa da doença em cafeeiro. No entanto, são encontrados na literatura vários trabalhos descrevendo a ação patogênica de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (ALVES; CASTRO, 1998; PARADELA-FILHO et al., 2001; NECHET; ABREU, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003; FERREIRA et al., 2005; SERA et al., 2005, JULIATTI et al., 2006; LINS et al., 2007; SERA et al., 2008).

Levantamento das espécies de *Colletotrichum* associadas a cafeeiros nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná aponta a espécie *C. gloeosporioides* como predominante nos isolamentos realizados (DORIZOTTO, 1993; JULIATTI et al., 2000; PARADELA-FILHO et al., 2001; OROZCO-MIRANDA, 2003; SILVA et al., 2005). Estudos de caracterização morfológica, cultural, bioquímica, genética e patogênica demonstraram variabilidade entre isolados de *Colletotrichum* spp. (NECHET; ABREU, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003; JULIATTI et al., 2006). Esta variabilidade representa muitas vezes inconsistência

na identificação correta da espécie, mas por outro lado, sugere a existência de raças patogênicas com base em sua diversidade genética (BRYSON et al., 1992).

Lins et al. (2007) acompanharam, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a colonização e reprodução de isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de cafeeiros sintomáticos e de mangueira (*Mangifera indica*) em plântulas de cafeeiro. Embora isolados de *C. gloeosporioides* dos dois hospedeiros tenham colonizado tecidos das plântulas de café, os isolados obtidos de ramos de cafeeiro mostraram-se mais infectivos durante o processo de colonização e formação de estruturas reprodutivas. Em testes de patogenicidade realizados em hipocótilos e frutos verdes de café em fase de desenvolvimento, tanto os isolados de *C. gloeosporioides* quanto os genótipos de cafeeiro utilizados demonstraram variabilidade (VARGAS; GONZALEZ, 1972; FIGUEREDO; MARIOTTO, 1978; ALMEIDA et al., 1979; DORIZZOTTO, 1993; OROZCO-MIRANDA, 2003).

Embora perdas qualitativas e quantitativas da cafeicultura nacional não sejam atribuídas diretamente à antracnose, não se pode descartar seu potencial como doença emergente, necessitando de compreensão do patossistema *Colletotrichum*-cafeeiro e o ambiente em que a cultura está inserida. Nas regiões produtoras de café no Continente Africano, a *Coffee Berry Disease* (CBD), causada por *C. kahawae*, é a principal doença descrita para esta cultura, com perdas de até 80% na produtividade (HINDORF, 1975; MASABA; WALLER, 1992; WALLER et al., 1993; SILVA et al., 2006). *C. kahawae* é considerada uma espécie que co-evoluiu recentemente com espécies de *Coffea* spp., mas que não foi relatada no centro de diversidade de *C. arabica* L., na Etiópia antes de 1970 (WALLER; BRIDGE, 2000; FREITAS; MENDES, 2005). A hipótese do surgimento desta espécie patogênica seria de que uma espécie parasítica do fungo na África Central tornou-se virulenta em espécies selvagens de *Coffea* (OMONDI et al., 1999). Acredita-se que uma mutação tenha sido gerada em *C. gloeosporioides* e tornado uma raça patogênica que originou a espécie *C. kahawae* em consequência do uso intensivo de fungicidas cúpricos aplicados para controle da doença ferrugem do cafeeiro (FEITOSA et al. (1977). Esta observação é reforçada por estudos filogenéticos, que evidenciam que as espécies *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* são muito próximas, e que a espécie *C. gloeosporioides* seria a espécie ancestral de *C. acutatum* e *C. kahawae* (SREENIVASAPRASAD et al., 1993; GONZÁLEZ, 2007).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em frutos verdes de *C. arábica*, compreendendo a análise das interações: I) isolados x cultivares; II) hospedeiro de origem do isolado x cultivar; e III) origem geográfica dos isolados de *Colletotrichum* spp. x cultivar.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Isolamento, Cultivo e Manutenção dos Isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiro foram obtidos a partir de folhas, ramos e frutos oriundos das regiões Norte, Norte Pioneiro, Noroeste e Oeste do Estado do Paraná, no ano de 2004 (Anexo 1). Para fins comparativos, foram utilizados isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes de maçã, manga, abacate, goiaba, limão, laranja, maracujá, caqui, banana, pimentão os quais foram obtidos de frutos adquiridos na CEASA (Central de Abastecimento S.A.) do Município de Londrina, PR, no ano de 2006 (Tabela 3.1; Anexo 1).

Para a obtenção dos isolados de outros hospedeiros, o isolamento foi realizado a partir de lesões jovens com sintomas característicos de antracnose. Os frutos foram inicialmente lavados com água corrente e detergente neutro durante 5 minutos. Para desinfestação, fragmentos do tecido lesionado dos frutos foram inicialmente transferidos para etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 1% por um minuto e por último, água destilada autoclavada por um minuto. Posteriormente, os fragmentos do tecido infectado foram distribuídos em placas de Petri contendo meio de cultura PGA (2,8 g de glucose; 2 g de peptona; 2,72 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,23 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 15 g de Agar; 1000 ml de água destilada (q.s.p.), pH: 6-7). As placas foram mantidas a  $22 \pm 2$  °C por sete dias com fotoperíodo de 12 horas. Após o isolamento, foram obtidas culturas monospóricas e armazenadas em sílica gel segundo o protocolo descrito por Ho e Ko (1997).

Para identificação da espécie *C. gloeosporioides* foram utilizados primers específicos CgInt (5'- 3') e ITS4 (3'-5'), de acordo com Freeman et al. (2003).

### 3.2.2 Desinfestação, Preparo do Inóculo e Inoculação de *Colletotrichum* spp. g

Foram utilizados frutos de café em estágio de expansão e grão verde (PEZZOPANE et al., 2003), coletados em plantas na Estação Experimental de Londrina do Instituto Agrônomo do Paraná, em Londrina, PR. Os frutos foram colocados em béquer contendo água de torneira autoclavada e detergente neutro e lavados por agitação manual durante cinco minutos. A desinfestação superficial foi feita com tratamento sequencial em soluções de etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 1% por um minuto e água destilada autoclavada por um minuto. Posteriormente, os frutos foram transferidos para bandejas plásticas contendo papel toalha autoclavado e mantidos em câmara de fluxo contínuo até secagem completa.

Os frutos desinfestados e secos foram organizados em bandejas plásticas (34 cm x 23 cm x 7 cm) contendo areia autoclavada (aproximadamente 2 cm de altura). Estes foram feridos com agulha esterilizada e inoculados com uma alíquota de 10 µl de uma suspensão aquosa de conídios de *C. gloeosporioides* ( $10^6$  conídios/ml). A suspensão de conídios foi obtida de colônias cultivadas em meio Aveia-Agar (50 g de aveia; 15 g de Agar; 1000 ml de água destilada (q.s.p.), pH 7) a  $22 \pm 2$  °C em câmara climatizada com fotoperíodo de 12 h durante sete dias.

### 3.2.3 Reação de Diferentes Cultivares de Café (*Coffea arabica* L.) a *C. gloeosporioides*

Foram utilizados frutos verdes dos cultivares Catuaí, Catuaí arrepiado, Costa Rica, Palma, Semperflorens, Rubi, IAPAR 59, IAPAR 100 e IAPAR 103, coletados na Estação Experimental de Londrina do Instituto Agrônomo do Paraná, em Londrina, PR.

Após desinfestação superficial e inoculação (item 3.2.2), os frutos foram mantidos a temperatura de  $\pm 23$  °C. As avaliações foram realizadas no quinto e no décimo dia após a inoculação considerando a incidência de frutos necrosados, ou seja, presença ou ausência de lesão, a partir do ponto de inoculação.

Foram utilizados para a inoculação os isolados I-12 proveniente de folha, 121f de fruto e 216a de ramo de cafeeiro (Anexo 1). O isolado 467 obtido de fruto de caqui foi inoculado para comparação entre os isolados obtidos de cafeeiro.

Como tratamento controle, a suspensão de conídios foi substituída por água destilada autoclavada totalizando, portanto, 45 tratamentos. Os tratamentos foram dispostos em delineamento fatorial 5 (cultivares) x 9 (isolados) em parcelas subdivididas, com três repetições, sendo cada repetição composta por 20 frutos de café de cada um dos cultivares. Considerou-se como fator 1 os isolados e fator 2 os cultivares. A média de frutos com incidência de necrose foi submetida à análise de variância e comparada pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0.01$ ) com auxílio do programa estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Para homogeneidade, os dados foram transformados por raiz quadrada de  $x+1$ . A utilização do teste de comparação de médias Scott-Knott proporciona agrupamento dos resultados médios dos tratamentos, sendo que, quanto maior o número de tratamentos maior o poder de separação dos grupos e diminuição do erro experimental sem ambigüidade nos resultados que outro teste poderia gerar (SCOTT KNOTT, 1974).

#### 3.2.4 Avaliação da Patogenicidade de Isolados de *Colletotrichum* spp. em Frutos Verdes de Cafeeiro.

Com base no experimento anterior, o cultivar IAPAR 103 mostrou-se suscetível a *C. gloeosporioides* e, portanto, foi escolhido para este estudo. Além disso, este cultivar tem como característica, maturação tardia. Foram utilizados frutos verdes do cultivar IAPAR 103 no estágio de expansão e grão verde, segundo o parâmetro de Pezzopane (2003). Os frutos foram coletados entre os meses de fevereiro a abril de 2008 em plantas da Estação Experimental de Londrina do Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR. Os frutos foram desinfestados conforme descrito no item 3.2.2 e posteriormente organizados em placas de Petri contendo areia úmida autoclavada.

Para inoculação, os frutos foram perfurados com agulha esterilizada e inoculados com 10  $\mu$ l de suspensão de  $10^6$  conídios/ml (item 3.2.2). Como tratamento controle, a suspensão de conídios foi substituída por água destilada autoclavada. As placas foram mantidas em câmara climatizada com temperatura de  $22 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas.

Foram inoculados 87 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiros, coletados em diferentes regiões produtoras do Estado do Paraná e 77

isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de outras plantas hospedeiras (Tabela 3.1, Anexo 1). Foram considerados patogênicos os isolados que promoveram o desenvolvimento de lesões a partir do ponto de inoculação.

As avaliações foram realizadas no quinto e décimo dia após a inoculação e os frutos foram caracterizados de acordo com a ausência ou presença de sintomas. Ausência de sintomas: frutos sem lesão necrótica no ponto de inoculação; Presença de sintomas: frutos com lesões iniciais secas e necróticas, com aspecto circular e o centro deprimido iniciadas no ponto de inoculação (Figura 3.2).

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições e dez frutos por repetição. A média de frutos com incidência de necrose foi submetida à análise de variância e comparada pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0.01$ ) com auxílio do programa estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Para homogeneidade, os dados foram transformados por raiz de  $x+1$ .

**Tabela 3.1** – Hospedeiro, origem, número, região e ano de obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e outras plantas hospedeiras.

Hospedeiro	Origem	Nº de isolados	Região	Ano de obtenção
Café	Paraná	30	Norte	2004
		18	Norte Pioneiro	2004
		28	Noroeste	2004
		8	Oeste	2004
	Minas Gerais	3	Lavras*	2004
<b>Total</b>		<b>87</b>		
Abacate	Londrina	3	-	2006
Banana	Londrina	2	-	2006
Batata	Lavras*	1	-	NI
Caqui	Londrina	9	-	2006
Goiaba	Londrina	1	-	2006
Laranja	NI**	1	-	NI
Limão	NI	1	-	NI
Maçã	Londrina	10	-	2006
Mamão	Londrina	14	-	2006
Manga	Lavras e Londrina	5	-	NI
Maracujá	Londrina	18	-	2006
Mexerica	NI	1	-	NI
Pimenta	Londrina	3	-	2006
Pimentão	NI	6	-	NI
Uva	Londrina	2	-	2007
<b>Total</b>		<b>77</b>		

\* Isolados originados da Universidade Federal de Lavras (UFLA); \*\*NI-Não identificado; \*\*\* Anexo 1

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Reação Patogênica de *C. gloeosporioides* em Diferentes Cultivares de Cafeeiro

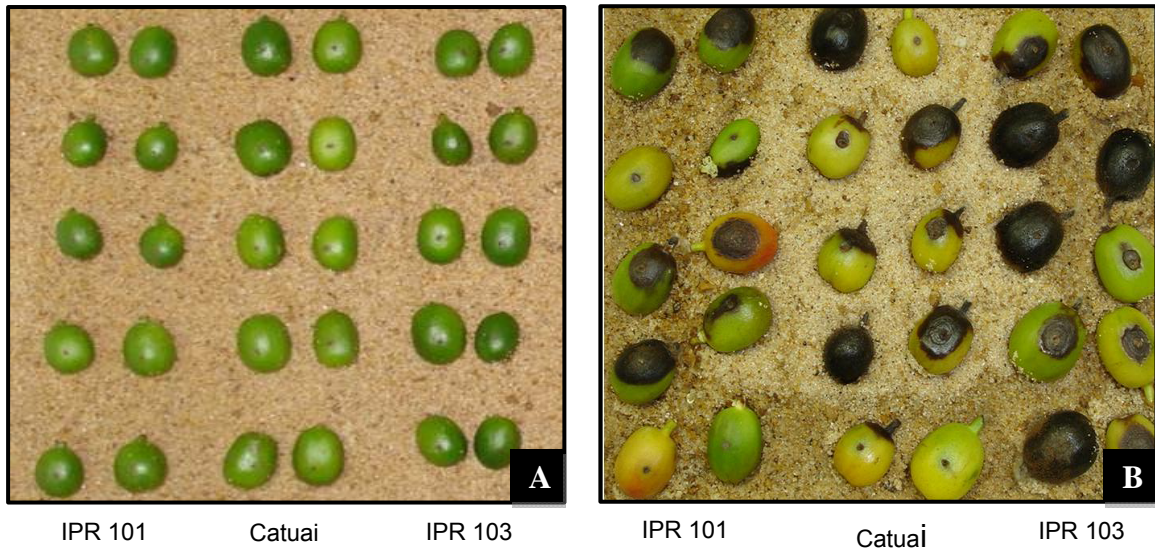
Os isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cafeeiro foram capazes de induzir sintomas de antracnose em todos os cultivares avaliados (Figura 3.1). No entanto, foi observada variabilidade na indução dos sintomas, tanto em função do cultivar inoculado, quanto dos isolados testados nos dois períodos de avaliação.

A avaliação realizada no quinto dia após a inoculação mostrou que o cultivar IAPAR 59 foi mais resistente ao isolado I-12 de *C. gloeosporioides* (Tabela 3.2). No entanto, os demais cultivares foram suscetíveis a este isolado, não diferindo significativamente entre si (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** – Incidência média de necrose causada por *Colletotrichum* spp. em frutos verdes de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em avaliação realizada no quinto dia após a inoculação. Sendo, fator 1 - diferentes isolados e fator 2 - diferentes cultivares de cafeeiro.

Cultivar	Isolados				Controle
	I-12 (folha)	121f (fruto)	216a (ramo)	467 (caqui)	
Catuaí	16,0Aa*	8,3Ba	1,0Cb	0,0Ca	0,0Ca
Catuaí Arrepiado	16,0Aa	3,0Bb	0,0Cb	0,0Ca	0,0Ca
Costa Rica	13,8Aa	6,6Ba	1,3Cb	0,0Ca	0,0Ca
Palma	15,0Aa	5,0Ba	1,0Cb	0,0Ca	0,0Ca
Rubi	14,6Aa	5,0Ba	4,6Ba	0,0Ca	0,0Ca
Semperflorens	14,6Aa	3,3Bb	1,6Ba	0,0Ca	0,0Ca
IAPAR 59	2,6Ab	1,0Bb	0,0Bb	0,0Ba	0,0Ba
IAPAR 101	12,3Aa	7,3Ba	0,0Cb	0,0Ca	0,0Ca
IAPAR 103	16,3Aa	7,3Ba	3,0Ca	0,0Da	0,0Da
<b>Fator 1 (Isolado)</b>	P < 0,01**	<b>C.V. (%) = 17,2</b>			
<b>Fator 2 (Cultivar)</b>	P < 0,01**	<b>C.V. (%) = 18,8</b>			
<b>Fator 1*Fator 2</b>	P < 0,01**				

Dados médios de três repetições com 20 frutos cada. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.01$ ). Letras maiúsculas, nas linhas, comparam isolados dentro de cultivar e letras minúsculas, nas colunas, comparam diferença entre os cultivares para cada isolado. Para análise, os dados foram transformados por raiz quadrada de  $x+1$ .



**Figura 3.1** -- Frutos verdes de diferentes cultivares de cafeeiro inoculados com o isolado I-12 de *C. gloeosporioides*. A, Frutos das cultivares IAPAR 101, Catuai e IAPAR 103 inoculados com água destilada esterilizada dez dias após a inoculação; B, Frutos dos cultivares IAPAR 101, Catuai e IAPAR 103 inoculados com o isolado I-12 dez dias após a inoculação.

Com relação ao isolado 121F, apenas os cultivares Catuai arrepiado, Semperflorens e IAPAR 59 mostraram-se resistentes no quinto dia após a inoculação. Os demais cultivares mostraram-se suscetíveis, apresentando necrose característica de antracnose (Tabela 3.2). No décimo dia, os cultivares Catuai arrepiado, Semperflorens, IAPAR 59 e Rubi apresentaram baixa incidência de frutos lesionados, diferindo estatisticamente dos demais cultivares ( $p < 0,01$ ) e mostrando-se resistentes a este isolado (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3** – Incidência média de necrose causada por *Colletotrichum* spp. em frutos verdes de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em avaliação realizada no décimo dia após a inoculação. Sendo, fator 1 - diferentes isolados e fator 2 - diferentes cultivares de cafeeiro.

Cultivar	Isolados				
	I-12 (folha)	121f (fruto)	216a (ramo)	467	Controle
Catuaí	19,3Aa*	16,6Aa	15,3Aa	7,3Ba	0,0Ca
Catuaí Arrepiado	20,0Aa	15,0Ab	17,0Aa	4,6Bb	0,3Ca
Costa Rica	20,0Aa	18,6Aa	15,3Ba	4,6Cb	0,0Da
Palma	19,6Aa	18,0Aa	15,0Aa	3,6Bc	0,3Ca
Rubi	19,3Aa	14,3Bb	11,0Cb	8,0Da	0,3Ea
Semperflorens	19,3Aa	12,3Bb	11,3Bb	2,3Cc	0,0Da
IAPAR 59	17,3Aa	12,3Bb	9,6Bb	2,0Cc	0,6Ca
IAPAR 101	19,3Aa	16,0Ba	13,0Bb	4,6Cb	0,0Da
IAPAR 103	20,0Aa	20,0Aa	18,6Aa	6,3Ba	0,3Ca
<b>Fator 1 (Isolado)</b>	P < 0.01**	C.V. (%) = 11,84			
<b>Fator 2 (Cultivar)</b>	P < 0.01**	C.V. (%) = 8,89			
<b>Fator 1*Fator 2</b>	P < 0.01**				

\*Dados médios de três repetições com 20 frutos cada. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.01$ ). Letras maiúsculas, nas linhas, comparam isolados dentro de cultivar e letras minúsculas, nas colunas, comparam diferença entre os cultivares para cada isolado. Para análise, os dados foram transformados por raiz quadrada de  $x+1$ .

O isolado 216A apresentou-se menos agressivo, e apenas os cultivares Rubi, Semperflorens e IAPAR103 apresentaram incidência média significativa da doença no quinto dia após a inoculação (Tabela 3.2). Já no décimo dia, foi observado lesões nos cultivares Catuaí, Catuaí Arrepiado, Costa Rica, Palma e IAPAR103, sendo este o cultivar com maior incidência de lesões (Tabelas 3.3).

O isolado 467, utilizado comparativamente e de conhecida patogenicidade em frutos de caqui, não foi capaz de reproduzir sintomas em frutos verdes de café até o quinto dia após a inoculação (Tabela 3.2). Entretanto, no décimo dia, observou lesões em frutos dos cultivares Catuaí, Rubi e IAPAR 103, Catuaí arrepiado, Costa Rica e IAPAR 101. Apenas o cultivar IAPAR 59 não diferiu ( $p < 0,01$ ) do controle (Tabelas 3.3).

A indução de sintomas de necrose em frutos verdes de cafeeiro pela inoculação com *Colletotrichum* spp. foi reportada anteriormente. Frutos de diferentes cultivares de café inoculados com isolados de *C. gloeosporioides* do Estado de Minas Gerais apresentaram 71% de frutos lesionados como incidência máxima (DORIZZOTO, 1993). Resultados similares foram obtidos a partir do décimo dia após a inoculação, com 51,2% de frutos lesionados (NECHET; ABREU, 2002). Neste

trabalho, observou-se até 100% dos frutos com necrose no cultivar IAPAR 103, quando inoculado com os isolados I-12 e 121F, assim como, nos cultivares Catuaí arrepiado e Costa Rica inoculados com o isolado I-12 (Tabela 3.3). Este resultado pode estar relacionado, com a metodologia de inoculação dos isolados em frutos verdes de cafeeiro. O fermento realizado nos frutos antes da inoculação pode ter contribuído na agilidade do aparecimento dos sintomas. Esta técnica permite ao microrganismo se desenvolver, uma vez que, ocorre o rompimento da barreira física imposta pela característica tegumentar do fruto de cafeeiro.

De maneira geral, o cultivar IAPAR 59 foi o mais resistente aos isolados avaliados até o quinto dia após a inoculação (Tabela 3.2 e 3.3) Resultados semelhantes foram observados em campo, onde a incidência de necrose em frutos do cultivar IAPAR 59 foi relacionada com a produtividade do cultivar, tendo demonstrado até 65% mais resistente a *Colletotrichum* spp., quando comparado aos outros cultivares (SERA et al., 2005, 2008).

O isolado I-12 obtido de folhas de cafeeiro no Estado de Minas Gerais foi o mais agressivo e responsável pelo maior número de frutos necrosados em todos os cultivares testados. Sua baixa incidência foi registrada apenas no cultivar IAPAR 59 com média de 2,6 e 17,3 frutos no quinto e no décimo dia após a inoculação, respectivamente (Tabelas 3.2 e 3.3).

No décimo dia após a inoculação, o isolado I-12 mostrou-se o mais agressivo entre os isolados, já os isolados 121F e 216A mostraram-se menos agressivos, sendo esta agressividade diretamente relacionada com o cultivar testado (Tabela 3. 3). Esta variação no nível de agressividade dos isolados foi reportada em isolados de *C. gloeosporioides* provenientes do Estado de Minas Gerais inoculados em diferentes cultivares de cafeeiro (OROZCO-MIRANDA, 2003).

Neste trabalho, isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro, induziram sintomas já no quinto dia após a inoculação, enquanto a incidência de lesões pelo isolado 467, obtido de caqui, foi reportada somente a partir do décimo dia após inoculação. Este resultado mostra especificidade patogênica para os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro.

### 3.3.2 Patogenicidade de Diferentes Isolados de *Colletotrichum* spp. em Frutos Verdes de Cafeeiro

Isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiro, assim como de outras plantas hospedeiras, quando inoculados em frutos verdes de café, reproduziram sintomas característicos de antracnose. Estes foram agrupados em quatro grupos distintos (I, II, III e IV) de acordo com a incidência média de frutos que apresentaram lesão característica após a inoculação (Tabela 3.4).

No quinto dia após a inoculação, os isolados obtidos de cafeeiro foram mais eficientes na indução de sintomas, quando 32% dos isolados foram capazes de induzir sintomas com incidência média entre 5,66 a 7,66 frutos lesionados (Tabela 3.4). Apenas 13% dos isolados obtidos de cafeeiro não diferiram da testemunha quanto à incidência de frutos lesionados ( $p \leq 0.01$ ) (Tabela 3.4). Quando frutos de cafeeiro em estágio de expansão foram inoculados com isolados obtidos de outras culturas, 79% dos isolados apresentaram incidência média entre 0,00 e 2,33 de frutos com lesões (grupo I) e, portanto, não diferiram do tratamento controle ( $p \leq 0.01$ ) (Tabela 3.4).

No décimo dia após a inoculação, 55% dos isolados provenientes de cafeeiro foram efetivos na indução de lesões necróticas, se enquadrando, portanto, no grupo IV de patogenicidade (Tabela 3.4). Neste mesmo período após a inoculação, a maior parte (35%) dos isolados provenientes de outros hospedeiros foram enquadrados no grupo II, ou seja, causaram sintomas em 1,66 a 3,66 dos frutos inoculados, demonstrando baixa eficiência destes isolados em induzir necrose em frutos de café (Tabela 3.4). Apenas 19% desses isolados foram enquadrados no grupo IV de patogenicidade, os quais induziram lesões em cerca de 6 a 10 frutos avaliados (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4** – Agrupamento de isolados de *Colletotrichum* spp. com base na incidência de frutos lesionados de *Coffea arabica* no 5º e 10º dia após a inoculação.

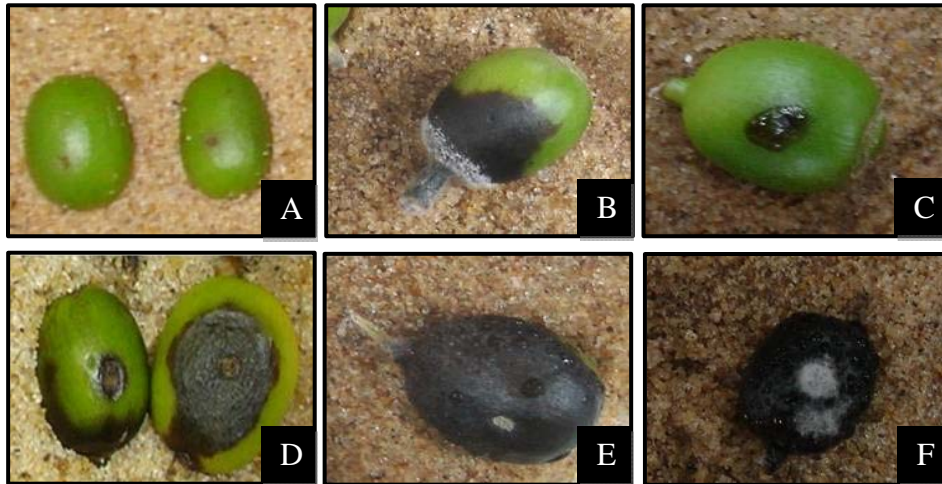
		5º dia após a inoculação			10º dia após a inoculação			
		Incidência de frutos lesionados	Percentual de isolados	Grupos de severidade*	Incidência de frutos lesionados	Percentual de isolados	Grupos de severidade*	
Cafeeiro	0,00 - 1,33	A**	13,0%	<b>Grupo 1</b>	0,00 - 2,00	A	3,0%	<b>Grupo 1</b>
	1,66 - 3,33	B	31,0%	<b>Grupo 2</b>	2,66 - 4,66	B	6,0%	<b>Grupo 2</b>
	3,66 - 5,33	C	24,0%	<b>Grupo 3</b>	5,00 - 7,66	C	33,0%	<b>Grupo 3</b>
	5,66 - 7,66	D	32,0%	<b>Grupo 4</b>	8,00 - 10,00	D	55,0%	<b>Grupo 4</b>
	<b>CV (%) = 20,36</b>			<b>CV (%) = 10,89</b>				
		Incidência de frutos lesionados	Percentual de isolados	Grupos de severidade*	Incidência de frutos lesionados	Percentual de isolados	Grupos de severidade*	
Outras culturas	0,00 - 2,33	A**	79,0%	<b>Grupo 1</b>	0,00 - 1,33	A	26,0%	<b>Grupo 1</b>
	2,66 - 4,00	B	14,0%	<b>Grupo 2</b>	1,66 - 3,66	B	35,0%	<b>Grupo 2</b>
	5,00 - 5,33	C	3,0%	<b>Grupo 3</b>	4,00 - 6,33	C	20,0%	<b>Grupo 3</b>
	7,00 - 8,66	D	4,0%	<b>Grupo 4</b>	6,66 - 10,00	D	19,0%	<b>Grupo 4</b>
	<b>CV (%) = 23,98</b>			<b>CV (%) = 18,82</b>				

\* Grupos estabelecidos com base na incidência de frutos com lesão causadas por isolados de *Colletotrichum* spp. \*\*Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.01$ ). Para análise, os dados foram transformados por raiz quadrada de  $x+1$ .

Os isolados obtidos de cafeeiro apresentaram variabilidade na reprodução dos sintomas nos dois períodos de avaliação (Figura 3.2). Provavelmente, esta variação está relacionada com os tipos de isolados e à dificuldade na padronização dos frutos no mesmo estágio de desenvolvimento para a realização dos experimentos. Lesões do tipo secas e deprimidas somente foram observadas em frutos inoculados com isolados provenientes de cafeeiro (Figura 3.2 D).

A variabilidade na patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides* de cafeeiros do Estado de Minas Gerais foi reportada em frutos de diferentes cultivares (NECHET; ABREU, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003; JULLIATI et al., 2006). Quando esta variabilidade foi comparada ao perfil molecular, foi possível diferenciar raças patogênicas associadas aos sintomas de antracnose (JULLIATI et al., 2006). Resultados similares foram observados por outros autores, estudando isolados obtidos no mesmo Estado, evidenciando a existência de grande variabilidade na indução ou incidência de sintomas de antracnose com relação aos isolados testados (NECHET; ABREU, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003). Esta variabilidade sugere que, tanto os aspectos genéticos dos isolados de *Colletotrichum*, assim como, os genótipos de *C. arabica* utilizados nos testes de

reprodução dos sintomas, podem ser responsáveis pela resposta obtida em frutos de cafeeiro em estágio de expansão.



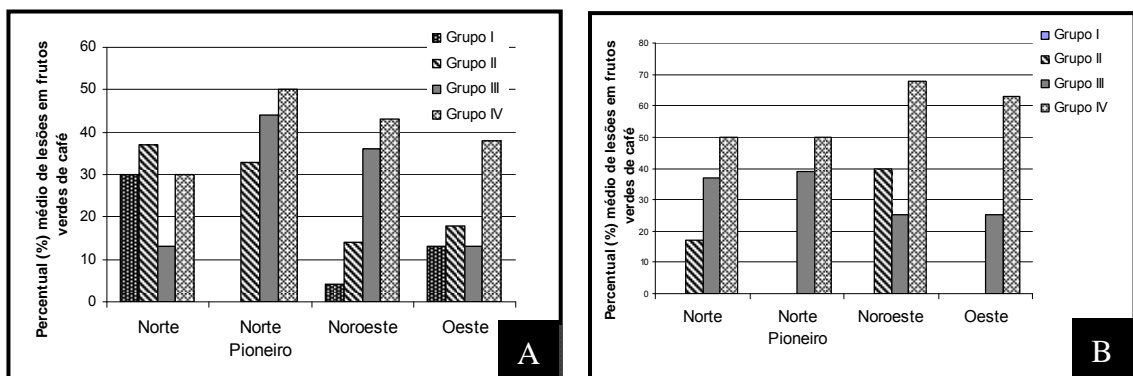
**Figura 3.2** – Frutos de *Coffea arabica* (L.) evidenciando os diferentes sintomas obtidos após a inoculação com isolados de *Colleotrichum* spp. A, fruto sem lesão, dez dias após a inoculação com água esterilizada (controle); B, fruto com lesão quiescente iniciada a partir do pedúnculo; C, fruto com lesão úmida e presença de contaminante no ponto de inoculação; D, fruto sem lesão e presença de exsudados; D, fruto com lesão seca e deprimida (geralmente observada até o 5º dia após a inoculação); E e F, lesão úmida (observada no 10º dia após a inoculação).

Apenas isolados obtidos de banana e caqui apresentaram lesões em frutos verdes de café com incidência representativa nos grupos I e II, em ambos os períodos de avaliação (Tabela 3.4). Os grupos III e IV foram representados por apenas cinco isolados obtidos de outras culturas, sendo um isolado de goiaba, dois de maracujá, um de uva e um isolado de manga no quinto dia após a inoculação (Tabela 3.4). No décimo dia, isolados de outras culturas foram distribuídos entre os quatro grupos de patogenicidade (Tabela 3.4). Entretanto, isolados provenientes de abacate, goiaba, laranja, maçã, manga, mamão, maracujá e uva apresentaram incidência entre 6,66 e 10,00 frutos com necrose (grupo IV) (Tabela 3.4).

Observou-se baixa relação entre a origem geográfica dos isolados de cafeeiro do Estado do Paraná e sua agressividade na indução dos sintomas em frutos de cafeeiro. No quinto dia após a inoculação, 70% dos isolados oriundos da região Norte do Paraná apresentaram baixa incidência de necroses e foram reunidos

no grupo II (média de 1,66 a 3,33 frutos necrosados) e 30% dos isolados desta região foram reunidos no grupo IV (incidência média de 5,66 a 7,66 de frutos necrosados) (Figura 3.3a, Tabela 3.4). Maior número de isolados da região Norte Pioneiro (50%) foram agrupados no grupo IV (incidência média de 5,66 a 7,66 frutos necrosados). Além disso, não foi observado isolado desta região no grupo I (Figura 3.3A, Tabela 3.4). A região Noroeste reuniu o maior número de isolados (42%) no grupo IV e apenas 4% dos isolados apresentaram incidência média entre 0,00 e 1,33 de frutos necrosados (Grupo I) e, portanto não diferiram da testemunha. Na região Oeste, 38% dos isolados foram reunidos no grupo IV, 18% reunidos no grupo II, e 26% dos isolados foram igualmente distribuídos nos grupos III e IV (Figura 3.3A, Tabela 3.4). Os resultados mostraram que as regiões Norte Pioneiro e Noroeste apresentaram os isolados com maior agressividade e, portanto reunidos nos grupos IV e III (Figura 3.3A).

No décimo dia após a avaliação, isolados de todas as regiões cafeeiras apresentaram maior incidência de frutos lesionados e, portanto apresentaram um número maior de isolados reunidos no grupo IV (50% dos isolados das regiões Norte e Norte Pioneiro; 68% da região Noroeste e 62% dos isolados da região Oeste) (Figura 3.3B). Nas regiões Norte Pioneiro e Oeste, além da falta de isolados no grupo I, notou-se a ausência de isolados representantes no grupo II, sendo os mais representativos do grupo IV (Figura 3.3B).



**Figura 3.3** – Percentual médio de lesões em frutos de cafeeiro em estágio de expansão, após inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de quatro regiões do Estado do Paraná. A, avaliação no quinto dia após inoculação; e B, avaliação no décimo dia após inoculação.

Não foi relatada em trabalhos anteriores a inoculação de um número significativo de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiro, assim como de outras culturas em frutos verdes de café. Nos patossistemas de *Colletotrichum* spp. é comum encontrar associações de múltiplas espécies do patógeno e único hospedeiro e/ou uma única espécie do patógeno e múltiplos hospedeiros (FREEMAN et al., 1998). Testes de patogenicidade cruzada são comumente empregados na caracterização da patogenicidade de *C. gloeosporioides* (DENOYES; BAUDRY, 1995; MUNIZ et al., 1998; FURTADO et al., 1999; PEREZ et al., 2002). A patogenicidade cruzada de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em abacate, manga e maçã foi reportada em diferentes estudos (FREEMAN; SHABI, 1996; FREEMAN et al., 1998).

A patogenicidade de isolados da espécie *Colletotrichum* spp. em café em países como o Brasil, tem sido investigada no intuito de esclarecer a real interação entre estas espécies e os sintomas observados em campo (PARADELLA FILHO, 2001; NECHET; ABREU, 2002; FERREIRA et al., 2005; JULIATTI et al., 2006; CHEN et al., 2005; LINS et al., 2007). Uma série de fatores, ainda desconhecidos, podem estar relacionados na indução do mecanismo de infecção e reprodução de sintomas em cafeeiro. Isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de cafeeiro em países como Quênia e China não foram capazes de induzir sintomas quando inoculados isoladamente sem fermento prévio do fruto (CHEN et al., 2005). No entanto, quando inoculados sobre fermentos ou em associação com *C. kahawae*, estes isolados induziram sintomas e/ou promoveram aumento das lesões provocadas por *C. kahawae* (CHEN et al., 2005). Provavelmente, esta incapacidade na indução de sintomas por *C. gloeosporioides* está relacionada com sua incapacidade de produzir enzimas que degradam a parede celular do tecido do hospedeiro. Reconhecidas como principal responsável no mecanismo de infecção em *C. kahawae*, a produção destas enzimas é uma das características que diferencia esta espécie e *C. gloeosporioides* (CHEN et al., 2003; SILVA et al., 2006).

Os mecanismos de penetração na superfície de órgãos da planta (folhas, frutos, ramos e flores) por espécies de *Colletotrichum* têm sido discutidos durante muitos anos e diferentes modelos são propostos (BAILEY et al., 1992). A penetração se dá por aberturas naturais, ferimentos e mais comumente por penetração direta da cutícula (BAILEY et al., 1992). Infecção por ferimento não é muito comum, mas em alguns patossistemas é essencial (AGRIOS, 1988).

Embora o ferimento seja um facilitador, ele não pode ser declarado como um canal de infecção (BAILEY et al., 1992). Neste trabalho, a inoculação de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de outras culturas em frutos de cafeeiro permitiu observar baixo percentual na incidência de lesões, mesmo na presença de ferimentos durante o processo de inoculação. O mesmo resultado não foi observado para os isolados provenientes de cafeeiro que foram capazes de induzir lesões já nos primeiros dias após a inoculação. Esta resposta foi evidenciada no primeiro experimento, quando diferentes cultivares foram inoculados com isolados de café e caqui. O isolado obtido de caqui só induziu sintomas cinco dias após a inoculação e mesmo assim, a incidência de frutos lesionados foi baixa quando comparada à incidência obtida por isolados do próprio cafeeiro. Quando a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes culturas foi avaliada em frutos verdes, a incidência de necrose foi extremamente baixa no quinto dia após a inoculação, sendo apenas 19% dos isolados com incidência distinta do tratamento controle. A determinação de uma espécie patogênica de *Colletotrichum*, combinada a um hospedeiro específico para determinar sintomas de antracnose pode ser insuficiente para diagnosticar a etiologia da doença (FREEMAN et al., 1998). Estes autores sugerem que um parâmetro importante na investigação da patogenicidade é determinar se o mesmo ou diferentes patógenos estão associados com doenças em diferentes tecidos, assim como avaliar a patogenicidade específica tanto do isolado, quanto do hospedeiro.

Espécies de *Colletotrichum* infectam principalmente tecidos vegetais jovens, e sua habilidade para penetrar diretamente pela cutícula é extremamente importante. A penetração ocorre pela formação de um apressório e três mecanismos são propostos para seu desenvolvimento: 1) força mecânica ou pressão de turgor realizada por apressórios melanizados que garantem a penetração na cutícula e na parede celular da planta (BECHINGER et al., 1999); 2) secreção de enzimas que degradam a cutícula; 3) ou a combinação de ambos os mecanismos (BAILEY et al., 1992). Poucas investigações foram referidas aos processos de penetração e colonização de *C. gloeosporioides* em cafeeiro (CHEN, 2002; CHEN et al., 2005). Recentemente, Lins et al. (2007) verificaram que isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de manga, ramos e folhas de cafeeiro, de Minas Gerais, foram capazes de colonizar tecidos de plântulas de cafeeiro. Sendo, o isolado de *C. gloeosporioides*

obtido de ramo de cafeeiro mais infectivo durante o processo de colonização e formação de estruturas reprodutivas.

Outro mecanismo de infecção utilizado por espécies de *Colletotrichum* é estratégia hemibiotrófica, ou seja, o fungo se mantém no hospedeiro em estado latente, aguardando fatores externos para ativação de sua patogenicidade (PERFECT et al., 1999; WHARTON et al., 2001). Os mecanismos de transição do estágio biotrófico para o necrotrófico são relacionados a fatores que modulam o nível intracelular e geralmente são afetados por nível nutricional ou pH do espaço intracelular (PRUSKY; LICHTER, 2007). Em cafeeiro, *C. gloeosporioides* está presente de forma endofítica em tecidos sadios de flores, frutos e ramos (ZAMBOLIN et al., 2003; FERREIRA et al., 2005). Reforçando que a ativação do mecanismo de patogenicidade pode ser acionada pelo ambiente proporcionado pelo hospedeiro, fazendo com que a dificuldade no sucesso da reprodução dos sintomas *in vitro* se torne ainda maior.

A amonificação do tecido do hospedeiro é sugerida como fator-chave para a secreção da enzima pectatoliase, considerada o principal mecanismo para ativar a patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* (YAKOBY et al., 2001; KRAMER-HAIMOVICH et al., 2006; ALKAN et al., 2008). Investigando mecanismos de patogenicidade de *C. gloeosporioides* em frutos de abacate, Drori et al. (2003) observaram que a enzima pectatoliase é apontada como fator de virulência de *C. gloeosporioides*. Sua expressão é afetada pela alcalinização do tecido vegetal que ocorre naturalmente durante o amadurecimento do fruto quando o pH do pericarpo aumenta de 5,2 para 6,1 unidades. A ativação da infecção latente requer a alcalinização do tecido, e a colonização do fungo depende de fontes externas de nitrogênio que pode ser convertido em  $\text{NH}_3$  (KRAMER-HAIMOVICH et al., 2006).

Plantas de cafeeiro requerem 95% do nitrogênio total disponível na planta no período desenvolvimento dos frutos (CANNELL, 1985). O mecanismo fisiológico conhecido como dreno pode ser um fator de alcalinização do tecido, e por sua vez, ativar o mecanismo de patogenicidade deste fungo. Este mecanismo fisiológico, já foi mencionado anteriormente como importante fator no processo de infecção por *Hemileia vastatrix* responsável pela ferrugem do cafeeiro (COSTA et al., 2006). Estudos iniciais, com isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de frutos de abacate foram capazes de reproduzir sintomas similares aos obtidos por isolados provenientes de cafeeiro em frutos verdes do cultivar IAPAR 59, considerado um

cultivar resistente aos isolados de *C. gloeosporioides* (dados não mostrados). Outra associação deste mecanismo foi a amplificação positiva com *primers* específicos para o gene *peIB* (pectatoliase) realizada com isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cafeeiro e outros hospedeiros (dados não mostrados).

A ocorrência de doenças na cultura do cafeeiro é influenciada tanto por fatores relacionados à virulência do patógeno como da resistência do hospedeiro. Neste estudo também foi reportado à variabilidade na reprodução dos sintomas entre os diferentes cultivares de cafeeiro. O cultivar IAPAR 59 mostrou maior resistência entre os cultivares avaliados. Estes resultados corroboram com os obtidos por Sera et al. (2005, 2008), quando verificaram que genótipos como Obatã IAC1669-20, Catucaí Vermelho 4-79, Catuaí Vermelho IAC-99 e IAPAR-59 III-1-9 apresentaram baixa incidência de necrose dos frutos. Estes autores inferem que a resistência atribuída a estes cultivares, seja derivada do cruzamento genético da espécie *C. canephora* nos programas de melhoramento, pois Obatã IAC1669-20 (Sarchimor), Catucaí Vermelho 4-79 e IAPAR-59 III-1-9 (Sarchimor) possuem genes dessa espécie. Além disso, fatores ambientais ou outros genes podem atuar na tolerância à necrose de frutos, já que Catuaí Vermelho IAC-99 não é originada da espécie *C. canephora* e apresentou baixa incidência da doença (SERA et al., 2008).

Características fenotípicas do cafeeiro como, baixo porte, maturação tardia, alto vigor vegetativo e nutrição equilibrada, também foram observados em genótipos com resistência a *C. gloeosporioides* (SERA et al., 2008). Já em alguns genótipos suscetíveis a necrose dos frutos foi observada em plantas com maior produção e alto índice de frutos por nó produtivo (SERA et al., 2005). Estes autores sugerem que o desenvolvimento do fungo no hospedeiro pode estar relacionado com a alta produção de frutos, assim como a condição nutricional oferecida pela planta que pode auxiliar no desenvolvimento do apressório. A taxa de germinação dos conídios dessa espécie pode depender de substratos presentes em pétalas florais e frutos em estágio de expansão que permite rápida difusão das substâncias nutritivas que auxiliam para desenvolvimento da infecção (JULLIATI et al., 2006).

Os mecanismos de resistência em *C. arabica* para a CBD são pré-formados e ativados durante os diferentes estágios da infecção pelo fungo (GICHURU, 1997). Possivelmente, a cutícula é a principal barreira física para a penetração do patógeno. Nutman e Roberts (1960) observaram a expressão de sintomas da doença em cultivares de café (*C. arabica*) resistentes a CBD, quando a

epiderme dos frutos verdes recebeu o inóculo sobre fermento prévio. Estes autores consideraram que o fermento, neste caso, permitiu a transferência de nutrientes para a infecção e também o acesso direto do fungo a tecidos internos.

Os microrganismos são influenciados pelo meio, como fatores climáticos e culturais, que podem expressar alterações fenotípicas (OLIVER; SOLOMON, 2008). Surgem então, evidências de que novas doenças podem ser originadas, principalmente devido às alterações genéticas sofridas pelo patógeno, juntamente com a facilidade de disseminação deste agente de uma planta hospedeira para outra, e até mesmo para outras regiões geográficas. Embora existam dúvidas em considerar a espécie *Colletotrichum* spp. como agente etiológico de necrose em frutos de cafeeiro, foi possível observar neste trabalho a patogenicidade de isolados obtidos de cafeeiro em frutos desta cultura. Esta evidencia é reforçada pela maior incidência de patogenicidade produzida por isolados provenientes de cafeeiro quando comparado com isolados de outras culturas hospedeiras.

### 3.4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- Existe variabilidade na reação de cultivares de *Coffea arabica* quando inoculadas com isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro, assim como a isolados de outros hospedeiros;
- O cultivar IAPAR 59 apresenta diferentes níveis de resistência à necrose dos frutos nas condições avaliadas;
- Existe variabilidade na agressividade de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro;
- Isolados de *C. gloeosporioides* patogênicos em outras culturas são capazes de induzir lesões semelhantes aos causados por isolados obtidos de cafeeiro;

- Outras culturas podem ser consideradas fontes de inóculos para epidemias de doenças causadas por *Colletotrichum* spp.
- Isolados de *Colletotrichum* spp obtidos de cafeeiro são mais agressivos em frutos de cafeeiro do que isolados de outras culturas.

#### 4 VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Colletotrichum* spp. OBTIDOS DE CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.) DO ESTADO DO PARANÁ

##### Resumo

No Brasil, espécies do gênero *Colletotrichum* são frequentemente isoladas de cafeeiro e associadas a sintomas de necrose e mumificação em frutos verdes, mancha manteigosa em folhas e queima de ramo e ponteiros. Métodos moleculares possibilitam uma avaliação mais acurada na identificação e análise da variabilidade genética de fitopatógenos, principalmente quando comparado aos métodos morfológicos. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar por ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiros das regiões Noroeste, Norte, Norte Pioneiro e Oeste do Estado do Paraná e compará-los com isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de outras plantas hospedeiras. O DNA dos isolados foi utilizado na amplificação com *primers* específicos para a região ITS1 e ITS2 do rDNA e posterior clivados com as enzimas *CfoI*, *HinIII*, *MseI*, *RsaI* e *TaqI*. Não foi observada variabilidade genética para isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro, no entanto a metodologia utilizada revelou ampla similaridade dos isolados com isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de outros hospedeiros. A identificação foi confirmada, quando alguns isolados deste grupo foram submetidos ao seqüenciamento e amplificação com *primers* específicos. Para a técnica de ISSR foram testados quatro *primers* e os perfis polimórficos obtidos foram utilizados em uma análise polifásica utilizando o software *Bionumerics*. O coeficiente de similaridade foi construído utilizando o coeficiente de Pearson com o agrupamento UPGMA. A variabilidade genética da população de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro foi evidenciada com a técnica de ISSR, que mostrou uma subpopulação representada por isolados das regiões Norte e Norte Pioneiro. Além disso, isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cafeeiro apresentaram perfil distinto dos isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de outros hospedeiros. Não foi possível correlacionar os dados de diversidade genética com características de interesse como a patogenicidade.

**Palavras chave:** ITS. ISSR. ARDRA. Diversidade genética. Antracnose.

#### GENETIC VARIABILITY OF *Colletotrichum* spp. FROM COFFEE (*Coffea arabica* L.) IN THE STATE OF PARANÁ, BRAZIL

##### Abstract

In Brazil, species of *Colletotrichum* are often isolated from coffee plants and associated with symptoms of stem necrosis, mummification of green fruits, buttery leaf spot and dieback. Molecular methods may allow an accurate assessment for the identification and analysis of the genetic variability of *Colletotrichum* spp. associated

with coffee. The objective of this study was to characterize by ARDRA and ISSR isolates of *Colletotrichum* spp. from different coffee regions of the State of Paraná and to compare them with isolates from other hosts. DNA of the *Colletotrichum* spp. was used for PCR amplification with primers specific for the ITS1 and ITS2 regions of rDNA. The DNA fragment amplified was digested with the enzymes *CfoI*, *HinfIII*, *MseI*, *RsaI* and *TaqI*. No genetic variability was observed among the isolates of *Colletotrichum* spp. from coffee, but the isolates showed large genetic similarity with isolates of *C. gloeosporioides* from other hosts. The identification of the isolates was confirmed by DNA sequencing and specific primers for amplification. For the ISSR technique, primers were tested and four polymorphic profiles were obtained and used in a polyanalysis by using the software Bionumerics. The coefficient of similarity was determined by using the Pearson coefficient with UPGMA clustering. The genetic variability of the population of *Colletotrichum* spp. from coffee was clear with the ISSR technique, which revealed a subpopulation represented by isolates from the North and North Pioneer regions. Furthermore, isolates from coffee have a distinct profile, different from the isolates of *C. gloeosporioides* from other crops. It was not possible to correlate the genetic data with several other characteristics such as pathogenicity.

**Key words:** ITS. ISSR. ARDRA. Genetic diversity. Anthracnose.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por várias doenças, como manchas em folhas, murchas, antracnoses e podridões em frutos em diversas culturas de importância econômica (BAILEY et al., 1992; TALHINHAS et al., 2007; GARRIDO et al., 2008).

A identificação de espécies de *Colletotrichum* é fundamental para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de práticas que visam o controle das doenças causadas por esses fungos (FREEMAN et al., 1998). Para este fim, a caracterização da diversidade genética e cultural e identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* têm sido realizadas, principalmente, com base em caracteres morfológicos, como dimensão de conídios e apressórios, testes de patogenicidade, comparações bioquímicas (SUTTON, 1980; SUTTON, 1992; GUNNELL; GUBLER, 1992; FREEMAN et al., 1998) e análises moleculares (TALHINHAS, 2005). Com base nestas características, três espécies do fungo têm sido identificadas em cafeeiro em diferentes países onde a espécie *Coffea* sp. está presente, *Colletotrichum acutatum* Simmons; *Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum kahawae* Waller (HINDORF, 1975; MASABA; WALLER et al. 1992).

No Brasil, as espécies *C. acutatum* e, principalmente, *C. gloeosporioides* são frequentemente isoladas de cafeeiro e associadas a sintomas de necrose e mumificação de frutos verdes, mancha manteigosa em folhas e queima de folhas e ponteiros (NECHET; ABREU, 2002; FERREIRA et al., 2005; SERA et al., 2005). Entretanto, existem limitações para a identificação de espécies próximas, como *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, principalmente porque, isolados destas espécies apresentam uma ampla variação genética e morfológica (SUTTON, 1992).

A utilização de ferramentas moleculares, identificação e classificação destas espécies, bem como, a busca de variabilidade inter e intraespecífica entre populações obtidas de diferentes hospedeiros têm possibilitado maior rapidez e confiança nos resultados (SAMUELS; SEIFERT, 1995; BRIDGE et al., 1998; FREEMAN et al., 1998; MARTINEZ-CULEBRAS et al., 2003; GARRIDO et al., 2008).

Estudos comparando as espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* têm utilizado técnicas moleculares como PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA mitocondrial (SREENIVASAPRASAD et al., 1992; FREEMAN et al., 1993), de regiões do rDNA (ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) (FREEMAN et al., 2001), ampliações de regiões conservadas do rDNA com *primers* espécie específico (FREEMAN et al., 2001; TALHINHAS et al., 2002; MARTINEZ-CULEBRAS et al., 2003; TALHINHAS et al., 2005), análise de regiões ricas em A+T (FREEMAN et al., 2001), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AP-PCR (*primers* arbitrários) ou ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; WHITELAW-WECKERT et al., 2007), RFLP da amplificação do gene da  $\beta$ -tubulina (WHITELAW-WECKERT et al., 2007), RFLP e sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Sequence*) do DNA ribossomal (rDNA) (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TALHINHAS et al., 2005; WHITELAW-WECKERT et al., 2007) e recentemente, PCR em tempo real com base na região ITS do rDNA, o que possibilita identificar o patógeno 72 horas após sua infecção no tecido do hospedeiro (GARRIDO et al., 2008).

Por meio de critérios morfoculturais, bioquímicos, moleculares e de patogenicidade verificou-se variabilidade entre isolados de *C. gloeosporioides* coletados em diferentes regiões produtoras de cafeeiro do Estado de Minas Gerais (DORIZZOTO, 1993; NECHET; ABREU, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003). Julliat et al. (2006) utilizando 33 marcadores polimórficos gerados por RAPD relataram a

diversidade entre isolados de *C. gloeosporioides*, e quando associaram estes resultados a patogenicidade sugeriram diferentes espécies e/ou raças de *C. gloeosporioides* em cafeeiros no Estado de Minas Gerais.

No Estado do Paraná, Sera et al. (2005, 2007 e 2008) associaram a necrose dos frutos à presença de *C.gloeosporioides* e ainda correlacionaram a presença do patógeno a diferentes características agrônômicas do cafeeiro. No entanto, são poucos os estudos sobre o patossistema *Colletotrichum*-cafeeiro no Estado do Paraná. Este trabalho teve como objetivo caracterizar e avaliar a diversidade genética entre isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro das principais regiões produtoras do Estado do Paraná.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Isolamento e Armazenamento dos Isolados de *Colletotrichum* spp.

Foram utilizados 100 isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp., obtidos de cafeeiro, pertencentes à coleção de microrganismos fitopatogênicos do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina, PR. Foram utilizados isolados provenientes das regiões Norte, Norte Pioneiro, Noroeste e Oeste do Estado do Paraná, obtidos no período de 2004 e 2005 (Tabela 4.1). Estes isolados foram estocados em sílica gel segundo o protocolo descrito por Ho e Ko (1997).

Para fins comparativos, foram utilizados 42 isolados de *Colletotrichum* spp. estabelecidos de frutos de maçã, manga, abacate, goiaba, limão, laranja, maracujá, caqui e banana adquiridos na Central de Abastecimento S.A (CEASA) do Município de Londrina, PR, no ano de 2006 (Tabela 4.1, Anexo 1). Além destes, oito isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes do laboratório de Fitopatologia da ESALQ/USP foram inseridos nas análises para fins comparativos (Tabela 4.2). Para o isolamento, frutos com sintomas de antracnose foram lavados com detergente neutro em água corrente e posteriormente, fragmentos do tecido lesionado foram desinfestados por imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por um minuto, álcool 70% por um minuto e finalmente em água destilada autoclavada por 1 minuto. Os fragmentos do tecido foram transferidos para meio de

cultura PGA (2,8 g de glucose; 2 g de peptona; 2,72 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,23 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 15 g de Agar; 1000 mL água destilada (q.s.p.); pH: 6-7) e mantidos a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  durante sete dias. Após isolamento e identificação, foram obtidas culturas monospóricas e feito armazenamento em sílica gel segundo o protocolo descrito por Ho e Ko (1997).

Tabela 4.1 – Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e outras culturas utilizados nos estudos de diversidade genética.

Isolado	Espécie *	Hospedeiro	Origem do Isolado	Isolado	Espécie*	Hospedeiro	Origem do Isolado
2a <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	43b <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Noroeste, PR
2d <sup>1,4</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	44c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR
3c <sup>4</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	46a <sup>4</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Noroeste, PR
4a <sup>4</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	48b <sup>4</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Noroeste, PR
5b <sup>2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR	50b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR
6a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	52b <sup>2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Noroeste, PR
6c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	53b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR
8b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	55a <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR
11a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	57a <sup>2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR
13a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	60a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
16a <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	63c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
17c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	65b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
18c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	68b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
19c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	72c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
21b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	73c <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR
22b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	74b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
27a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	74c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
28b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	75b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
30 <sup>3,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	80c <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR
31c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	81b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
32a <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	82c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
35c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	84a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
36c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	85c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
37b <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Noroeste, PR	87a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
38 <sup>3,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	90b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
40c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	91c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
41 <sup>3,4</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	99c <sup>1,4</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR

<sup>1</sup> Isolados submetidos à análise de ARDRA; <sup>2</sup> Isolados submetidos à análise de ISSR

C ontinua

\* Caracterização: Características morfológicas e culturais; PCR - Primer específico *Oymt.*; Freeman et al., 2003

Continuação da Tabela 4.1

Isolado	Espécie <sup>a</sup>	Hospedeiro	Origem do Isolado	Isolado	Espécie <sup>a</sup>	Hospedeiro	Origem do Isolado
100a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	202c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
100b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	204c <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR
109a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	205c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
115b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Oeste, PR	208b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
117b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Oeste, PR	213a <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
120c <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Oeste, PR	216a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
121b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	216c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
121f <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	217c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
122f <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	218c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
125a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	220c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
128b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	228c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
129a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	233a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
132c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Oeste, PR	234a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR
134c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Oeste, PR	240b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR
136b <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Oeste, PR	1-12 <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Poço Fundo, MG
139c <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Oeste, PR	436 <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Abacate	Ceasa, Londrina - PR
143c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	437 <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Abacate	Ceasa, Londrina - PR
144c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	438 <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Abacate	Ceasa, Londrina - PR
145b <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	440 <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Maçã	Ceasa, Londrina - PR
146c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Noroeste, PR	446 <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Mamão	Ceasa, Londrina - PR
150a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	448 <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Mamão	Ceasa, Londrina - PR
162c <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	453 <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Pimentão	Ceasa, Londrina - PR
163d <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	455 <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Banana	Ceasa, Londrina - PR
176a <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR	468 <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Laranja	Ceasa, Londrina - PR
185c <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	469 <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Limão	Ceasa, Londrina - PR
196a <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Café	Norte, PR	474 <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Pimenta	Ceasa, Londrina - PR
199a <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporioides</i>	Café	Norte, PR	475 <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Pimenta	Ceasa, Londrina - PR

<sup>1</sup>Isolados submetidos à análise de ARDRA; <sup>2</sup>Isolados submetidos à análise de ISSR

Continua

<sup>a</sup>Caracterização: Características morfológicas e culturais; PCR - Primer específico Cg Int.; Freeman et al., 2003

Continuação da Tabela 4.1

<b>Isolado</b>	<b>Espécie *</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem do Isolado</b>
<b>480</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Pimentão	Ceasa, Londrina – PR
<b>481</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Pimentão	Ceasa, Londrina – PR
<b>483</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Pimentão	Ceasa, Londrina – PR
<b>488</b> <sup>2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Maçã	Ceasa, Londrina - PR
<b>489</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Banana	Ceasa, Londrina – PR
<b>490</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Jiló	Ceasa, Londrina – PR
<b>491</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Goiaba	Ceasa, Londrina – PR
<b>501</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Maracujá	Ceasa, Londrina – PR
<b>502</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Maracujá	Ceasa, Londrina – PR
<b>513</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Mamão	Ceasa, Londrina – PR
<b>515</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Maçã	Ceasa, Londrina – PR
<b>517</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Manga	Ceasa, Londrina – PR
<b>518</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Manga	Ceasa, Londrina – PR
<b>520</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Caqui	Ceasa, Londrina – PR
<b>525</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Caqui	Ceasa, Londrina – PR
<b>526</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Caqui	Ceasa, Londrina – PR
<b>530</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Caqui	Ceasa, Londrina – PR
<b>531</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Caqui	Ceasa, Londrina – PR
<b>540</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Jiló	Ceasa, Londrina – PR
<b>541</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Jiló	Ceasa, Londrina – PR
<b>566</b> <sup>1,2</sup>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Pimentão	Ceasa, Londrina – PR
<b>572</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Maracujá	Ceasa, Londrina – PR
<b>577</b> <sup>1,2</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Caqui	Ceasa, Londrina – PR
<b>8640</b> <sup>1</sup>	<i>C. gloeosporbides</i>	Maçã	Ceasa, Londrina – PR

<sup>1</sup> Isolados submetidos à análise de AR DRA; <sup>2</sup> Isolados submetidos à análise de ISSR

\* Caracterização: Características morfológicas e culturais; PCR - Primer específico

CgInt; Freeman et al., 2003

**Tabela 4.2** – Espécies-tipo de *Colletotrichum* sp. utilizadas para fins comparativos

Isolado	Espécie*	Hospedeiro	Origem do Isolado
1000	<i>C. gloeosporioides</i> <sup>1,2</sup>	Pimentão	ESALQ – Piracicaba, SP
1001	<i>C. gloeosporioides</i> <sup>2</sup>	Pimentão	ESALQ – Piracicaba, SP
1002	<i>C. gloeosporioides</i> <sup>2</sup>	Pimentão	ESALQ – Piracicaba, SP
1003	<i>C. boninense</i> <sup>2</sup>	Pimentão	ESALQ – Piracicaba, SP
1004	<i>C. acutatum</i> típico <sup>1,2</sup>	Pimentão	ESALQ – Piracicaba, SP
1005	<i>C. acutatum</i> atípico <sup>2</sup>	Pimentão	ESALQ – Piracicaba, SP
1006	<i>C. gossypii</i> <sup>2</sup>	Algodão	ESALQ – Piracicaba, SP
1007	<i>C. capsici</i> <sup>2</sup>	Pimentão	ESALQ – Piracicaba, SP

<sup>1</sup>Isolados submetidos à análise de ARDRA; <sup>2</sup>Isolados submetidos à análise de ISSR

\*Caracterização: Características morfológicas e culturais; PCR- Primer específico CgInt.; Freeman et al., 2003

## 4.2.2 Caracterização Genética por Meio de Marcadores Moleculares

### 4.2.2.1 Extração do DNA genômico

A partir de culturas monospóricas crescidas em meio PGA, cinco discos de 5 mm de diâmetro foram transferidos para tubos contendo 15 ml de meio YPD líquido (10 g de extrato de levedura; 20 g de peptona; 20 g de dextrose; água destilada q.s.p. 1000 ml; pH 6-7) e mantidos sob agitação de 90 rpm a 24 °C por sete dias. Após o período de crescimento, o micélio foi filtrado a vácuo, macerado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985).

### 4.2.2.2 Amplificação, ARDRA e sequenciamento das regiões intergênicas ITS1 e ITS2 e do gene 5,8 S do rDNA.

Regiões espaçadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2) e o gene 5,8 S do RNA ribossomal (rRNA) foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando os *primers* universais ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGÇ3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), específicos para as regiões conservadas do

rDNA (WHITE et al., 1990). A reação de amplificação foi realizada com volume final de 50 µl contendo 1X do tampão da enzima, 0,7 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de cada dNTP, 1,25 U/µl de Taq DNA polimerase, 0,25 mM de cada *primer*, 30 ng do DNA genômico e água milliQ esterilizada para completar o volume final da reação. A amplificação foi realizada usando o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 min.; 35 ciclos de 1 min. a 95 °C; 1 min. a 55 °C e 1 min. a 72 °C. Foi realizada uma etapa de extensão final 72 °C por 5 min. e manutenção a 4 °C. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100™ (MJ RESEARCH; Waltham, Massachusetts, USA). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5X (TBE 10X; 90 mM Tampão Tris-borato; 1 mM EDTA; 1000 ml de água destilada; pH 8,0) contendo 0,2 µg de brometo de etídio/ml. O gel foi fotografado com o sistema Kodak EDAS 2.0™ (Waltham, Massachusetts, USA).

Os produtos de PCR obtidos pelas amplificações utilizando os *primers* ITS4 e ITS5 foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *MseI* e *TaqI* (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, California, USA). As reações de digestão foram realizadas em volume final de 10 µl contendo 0,5 µl (5U) da enzima, 1 µl do tampão da enzima 10X, 3,0 µl do produto amplificado 1 µl de BSA e água milliQ (q.s.p). Com exceção da enzima *TaqI*, que teve como temperatura de reação 65 °C, todas as reações foram mantidas a 37 °C durante oito horas. Após o período de reação, o produto de restrição foi examinado em gel de agarose a 3%, utilizando tampão TBE 0,5X (3V/cm por aproximadamente 4 h). O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado com o sistema Kodak EDAS 2.0™. Uma matriz binária foi construída com base na presença ou ausência de fragmentos gerados. Com o auxílio do software NTSYS – (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* - versão 2.2), uma matriz de similaridade foi gerada utilizando o coeficiente de Jaccard (SNEATH; SOKAL, 1973). A partir desta matriz, foi construído o dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*) (SNEATH; SOKAL, 1973).

Entre os fragmentos amplificados, os das espécies tipo *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* e cinco dos isolados de *Colletotrichum* spp. (17c e 216a obtidos de café; 436 obtido de abacate; e 526 obtido de caqui) foram utilizados para sequenciamento. Para tanto, os fragmentos foram purificados por precipitação com álcool-isoamílico e submetidos à reação de sequenciamento pelo kit *BigDye*

*Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems; Foster City, Califórnia, USA) utilizando os mesmos *primers* descritos acima. A reação de sequenciamento foi avaliada em aparelho sequenciador ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems; Foster City, Califórnia, USA). Cada sequência consenso foi comparada com sequências depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), tendo sua qualidade avaliada. A identificação foi feita com base no melhor escore.

#### 4.2.2.3 Variabilidade genética por marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Para a determinação da variabilidade genética por ISSR foram utilizados 100 isolados de *Colletotrichum spp.* obtidos de cafeeiro e 40 isolados de *Colletotrichum spp.* obtidos de outras culturas, além das espécies tipo *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. capsici* e *C. gossypi*. Para a amplificação foram utilizados *primers* derivados de regiões microssatélites: AP1 (5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3') (RODRIGUES; YODER, 1991); AP2 (5'-TGTCTGTCTGTCTGTC-3') (FREEMAN et al., 1993); AP3 (5'-GACACGACACGACAC-3') (GUPTA; FILNER, 1991) e AP4 (5'-GACAGACAGACAGACA-3') (WEISING et al., 1989). A reação de amplificação foi realizada em volume final de 50 µl, contendo tampão da enzima, 0,14 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,25 mM de cada *primer*, 10 - 100 ng do DNA genômico e água milli-Q (qsp). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC100™ usando o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min.; 35 ciclos de 30 seg. a 95 °C, 30 seg. a 60 °C (AP1), 48 °C (AP3 e AP4) ou 44 °C (AP2) e 1,5 min. a 72 °C; foi realizada uma etapa de extensão final a 72 °C por 15 min e manutenção a 4 °C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em agarose 2,5% em tampão TBE 0,5X contendo 0,2 µg de brometo de etídio/ml. Os geis foram registrados utilizando o sistema Kodak EDAS 2.0™ e a avaliação do polimorfismo foi realizada com o auxílio do programa BioNumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01). Para agrupamento e construção dos dendrogramas foram utilizados os algoritmos UPGMA e coeficiente de Pearson com tolerância de 1%.

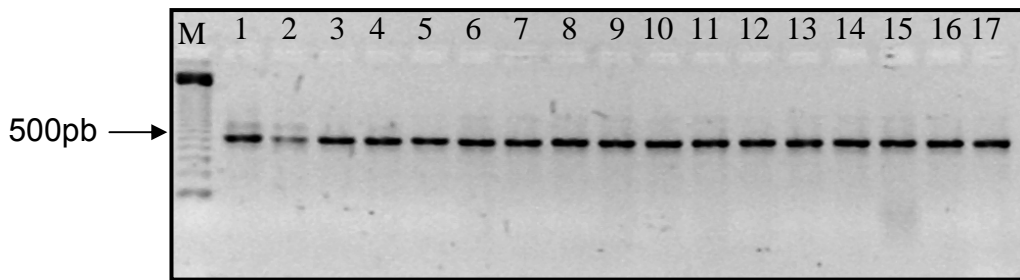
### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Amplificação, ARDRA e Sequenciamento das Regiões Espaçadoras do rDNA: ITS1, gene 5,8S e ITS2

Foram avaliados 64 isolados de *Colletotrichum* spp obtidos de cafeeiro e 34 isolados de *Colletotrichum* spp. de outras culturas, além de duas espécies tipo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Os *primers* ITS4 e ITS5 foram utilizados para amplificar as regiões espaçadoras transcritas do rDNA ITS1 e ITS2, incluindo o gene 5.8S. A amplificação com esses iniciadores resultou em um único fragmento de DNA de aproximadamente 580 pb (Figura 4.1), como descrito para as espécies de *Colletotrichum* utilizadas neste estudo (ANDRADE et al., 2007; FREEMAN et al., 2000).

A técnica de ARDRA permitiu observar que após restrição com as cinco enzimas testadas (*CfoI*, *HinI*, *MseI*, *RsaI* e *TaqI*), o perfil eletroforético obtido, mostrou padrão idêntico em 61 dos 64 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiro (Figura 4.2). Apenas os isolados 43b, 74b e 80c, apresentaram perfil distinto dos demais com as enzimas *HinI* (43b) e *TaqI* (74b e 80c) (Figura 4.3).

A análise combinada dos fragmentos gerados com as diferentes enzimas permitiu a construção de um dendrograma, indicando as relações genéticas entre os isolados avaliados. Utilizando uma linha arbitrária de 40% de similaridade, foi possível estabelecer dois grupos distintos, um agrupando os isolados a espécie *C. gloeosporioides* (GCg) e outro reunindo os isolados a espécie *C. acutatum* (GCa) (Figura 4.4). O grupo GCg reuniu isolados com perfis similares ou idêntico ao da espécie tipo *C. gloeosporioides*, incluindo os 64 isolados obtidos de café e 22 isolados provenientes de outras culturas.



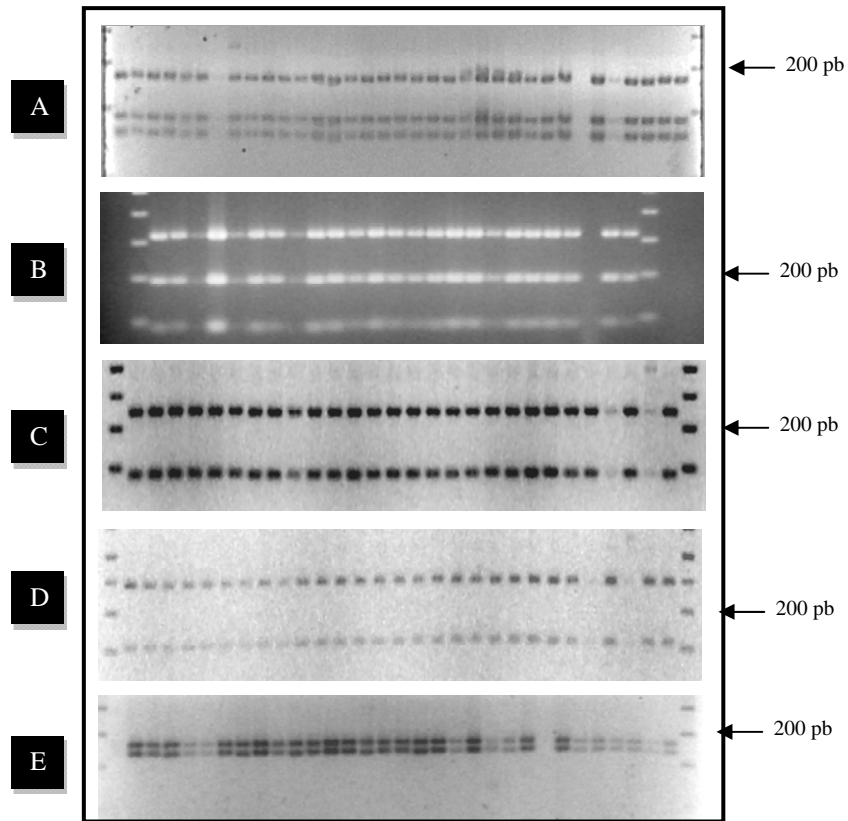
**Figura 4.1** – Fragmento gerado pela amplificação da região ITS1 e ITS2 e gene 5,8 S do rDNA de isolados de *Colletotrichum* spp obtidos de cafeeiro e outros hospedeiros. M, marcador molecular 123 pb (*Invitrogen Life Technologies*). Isolados obtidos de Cafeeiro (1, 43b; 2, 74b; 3, 80c; 4, 170c; 5, 17c); Isolados obtidos de outros hospedeiros (6, 440; 7, 446; 8, 448; 9, 453; 9, 455; 10, 468; 11, 474; 12, 475; 13, 480; 14, 481; 15, 483; 16, 488; 17, 489).

O grupo GCa reuniu 13 isolados obtidos de pimentão, pimenta e jiló, com perfis similares ao da espécie tipo *C. acutatum*, provenientes de solanáceas (Figura 4.4).

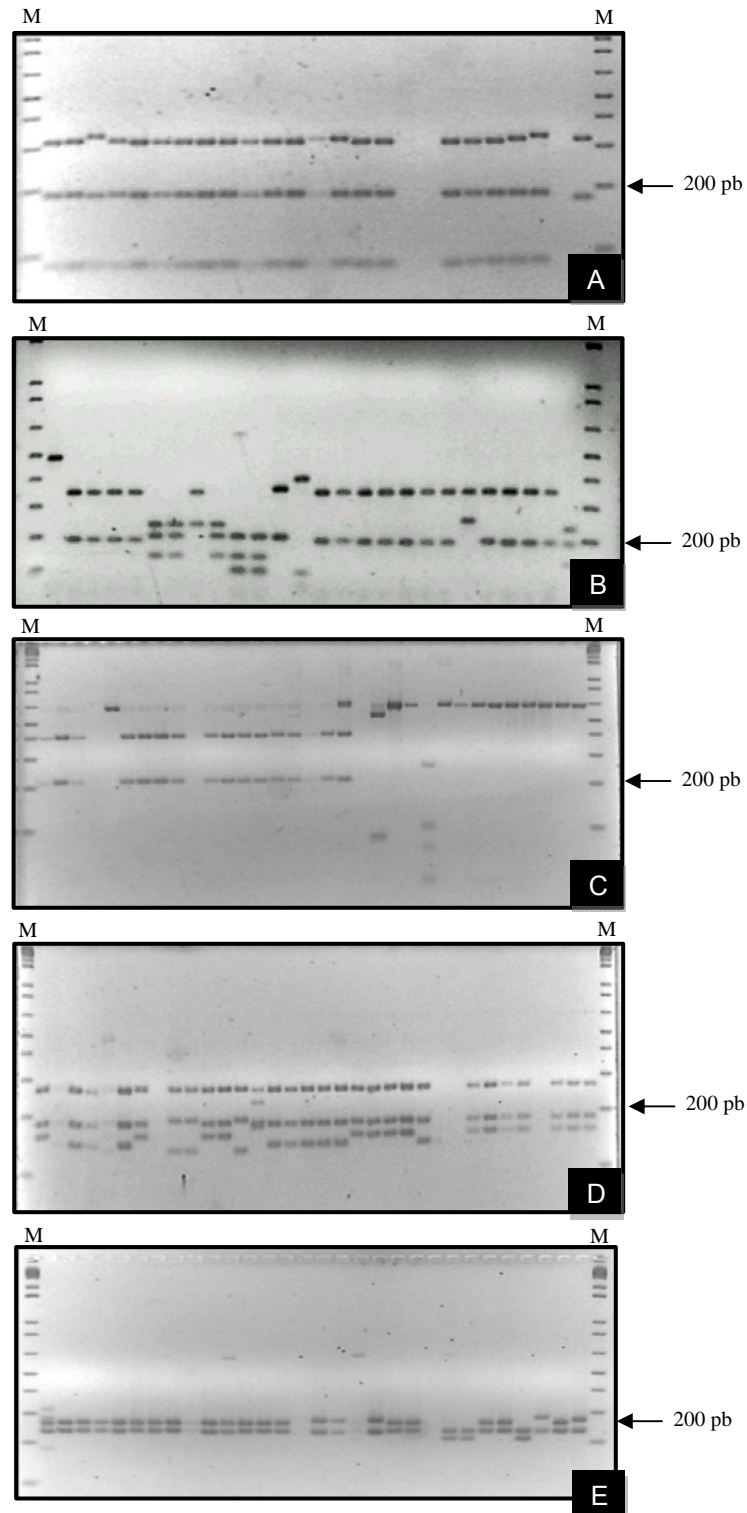
Embora o grupo GCg tenha apresentado diversidade, foi possível observar, além da clara separação entre os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, uma correlação dos perfis de digestão com o hospedeiro de origem. Isto pode ser visto com isolados de caqui e mesmo com os isolados de café, onde 62 dos 64 examinados apresentaram o mesmo perfil genético. Isolados de abacate, banana, laranja, limão e maracujá foram reunidos no mesmo ramo que os isolados de café (Figura 4.4). Três isolados de café divergiram dos demais, no entanto, foram mantidos junto com aos isolados de *C. gloeosporioides*. O grupo GCa reuniu isolados de outras culturas como maçã e solanáceas, apresentando perfis similares ao da espécie *C. acutatum*. Os isolados 490 (jiló) e 502 (maracujá) foram incluídos neste grupo, no entanto, apresentaram perfis distintos entre si e dos demais isolados (Figura 4.4).

Os isolados utilizados para sequenciamento do fragmento amplificado da região ITS foram comparados com as sequências depositadas no banco de dados (NCBI). As sequências indicaram maior similaridade com aquelas obtidas de fungos da espécie *C. gloeosporioides* tanto para as sequências oriundas dos isolados de café (17c e 216a), como para aqueles obtidos de abacate (436) e caqui (526) (Anexos 2; 3; 4;5). A sequência do fragmento da região ITS do isolado de *C. acutatum* espécie tipo, apresentou maior similaridade com sequências da

mesma espécie. O resultado do sequenciamento foi coerente com a disposição dos isolados por meio do agrupamento gerado por UPGMA (Figura 4.4).



**Figura 4.2 –** Perfil representativo de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro após clivagem com enzimas de restrição (ARDRA). A, *CfoI*; B, *HinfI*; C, *MseI*; D, *RsaI*; e E, *TaqI*.

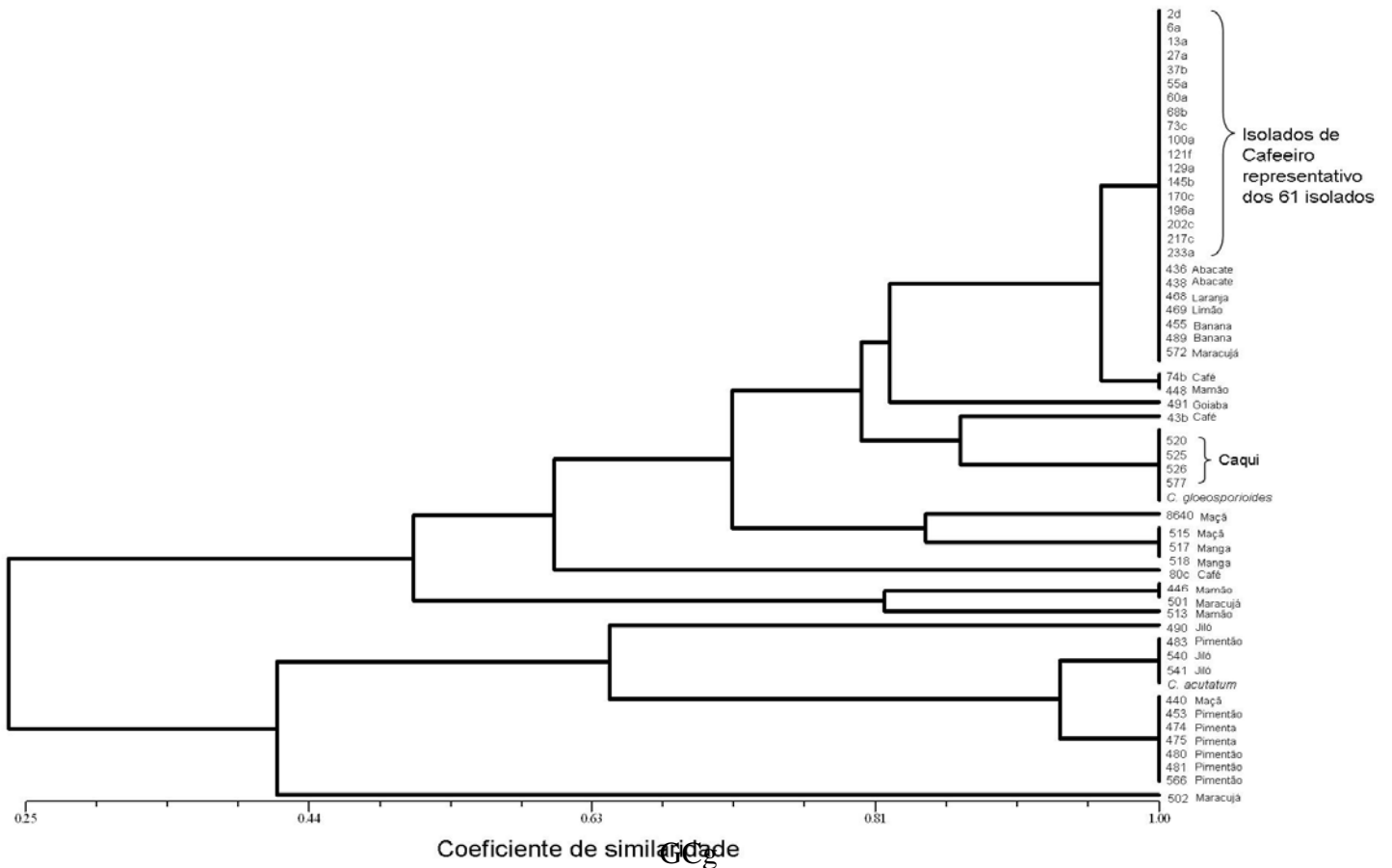


**Figura 4.3** – Perfil representativo de isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes culturas utilizados na análise de ARDRA após clivagem com enzimas de restrição. M, marcador molecular *ladder 1kb plus* (Invitrogen Life Technologies; A, *Hinf*I; B, *Mse*I; C, *Rsa*I; D, *Cfo*I e E, *Taq*I);

A utilização da técnica permitiu observar polimorfismo entre os padrões genéticos obtidos por isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiro e os de outras culturas, distinguindo, inclusive, as espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Foi possível observar ainda um agrupamento entre isolados da mesma cultura para as duas espécies. Com relação aos isolados obtidos de cafeeiro, não foram observados padrões distintos entre eles (Figura 4.4).

Vinnere et al. (2002) compararam espécies de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. dematium* e *G. cingulata* utilizando a mesma técnica, porém com outras enzimas e observaram diferenças entre as espécies. Detectaram ainda a existência de um grupo distinto de *C. gloeosporioides*, evidenciando a variação genética intraespecífica. Munaut et al. (2002) ao analisar o rDNA de *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. fuscum* e *C. fragariae*, constataram a presença de fragmentos polimórficos entre as linhagens e a separação das mesmas em cinco grupos, sem apresentar correlação com o hospedeiro de origem ou região geográfica.

Nem sempre é possível identificar variabilidade genética intraespecífica por meio da análise da região ITS. Andrade et al. (2007) analisaram a diversidade genética de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de mamoeiro por meio de PCR-RFLP e não verificaram variabilidade genética entre os isolados, entretanto foi possível diferenciar os isolados de acordo com as espécies tipo de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a um determinado hospedeiro, bem como a determinação de sua variabilidade, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença.

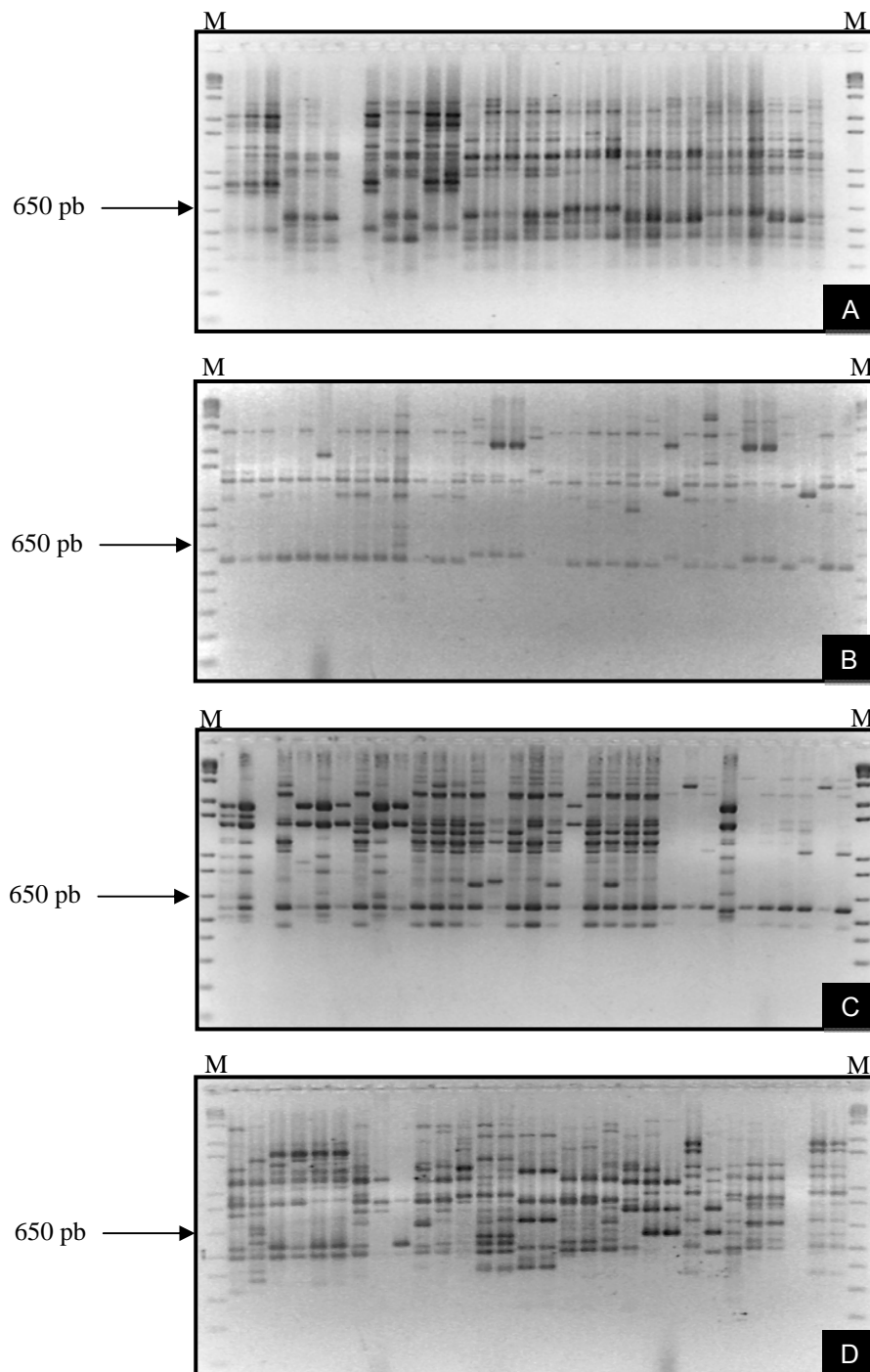


**Figura 4.4** – Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard mostrando as relações genéticas entre isolados de *Colletotrichum* spp. com base em padrões de ARDRA. A descrição dos isolados está na Tabela 4.1 e 4.2. GCg, agrupamento de isolados de *C. gloeosporioides*; GCa, Agrupamento de isolados de *C. acutatum*.

#### 4.3.2 Variabilidade Genética por Marcadores ISSR

A técnica de ISSR gerou diferentes fragmentos, com tamanho variando de 300 a 2000 pb aproximadamente (Figura 4.5). Com base nestes resultados, foi possível observar que ao contrário da análise obtida por ARDRA, a amplificação com os quatro *primers*, foi capaz de evidenciar polimorfismos entre os isolados. Para melhor obtenção das respostas a respeito da diversidade destes isolados, duas análises polifásicas foram geradas com os perfis eletroforéticos obtidos. A primeira buscou avaliar somente isolados obtidos de cafeeiro e um grupo externo previamente identificado como *C. acutatum* utilizado para o enraizamento da árvore (Figura 4.6). A segunda análise buscou comparar, isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e, sobretudo, compará-los a isolados obtidos de diferentes hospedeiros (Figura 4.7). Os perfis de amplificação gerados por cada *primer* foram analisados individualmente e em conjunto pelo *software* *Bionumerics*.

Todos os *primers* testados mostraram-se eficientes para evidenciar o polimorfismo entre isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro (dados não mostrados). No entanto, o melhor agrupamento foi obtido pelo *primer* AP4 (GACA)<sub>4</sub> que gerou agrupamento semelhante ao mostrado pela análise polifásica (Figura 4.6 e 4.7).

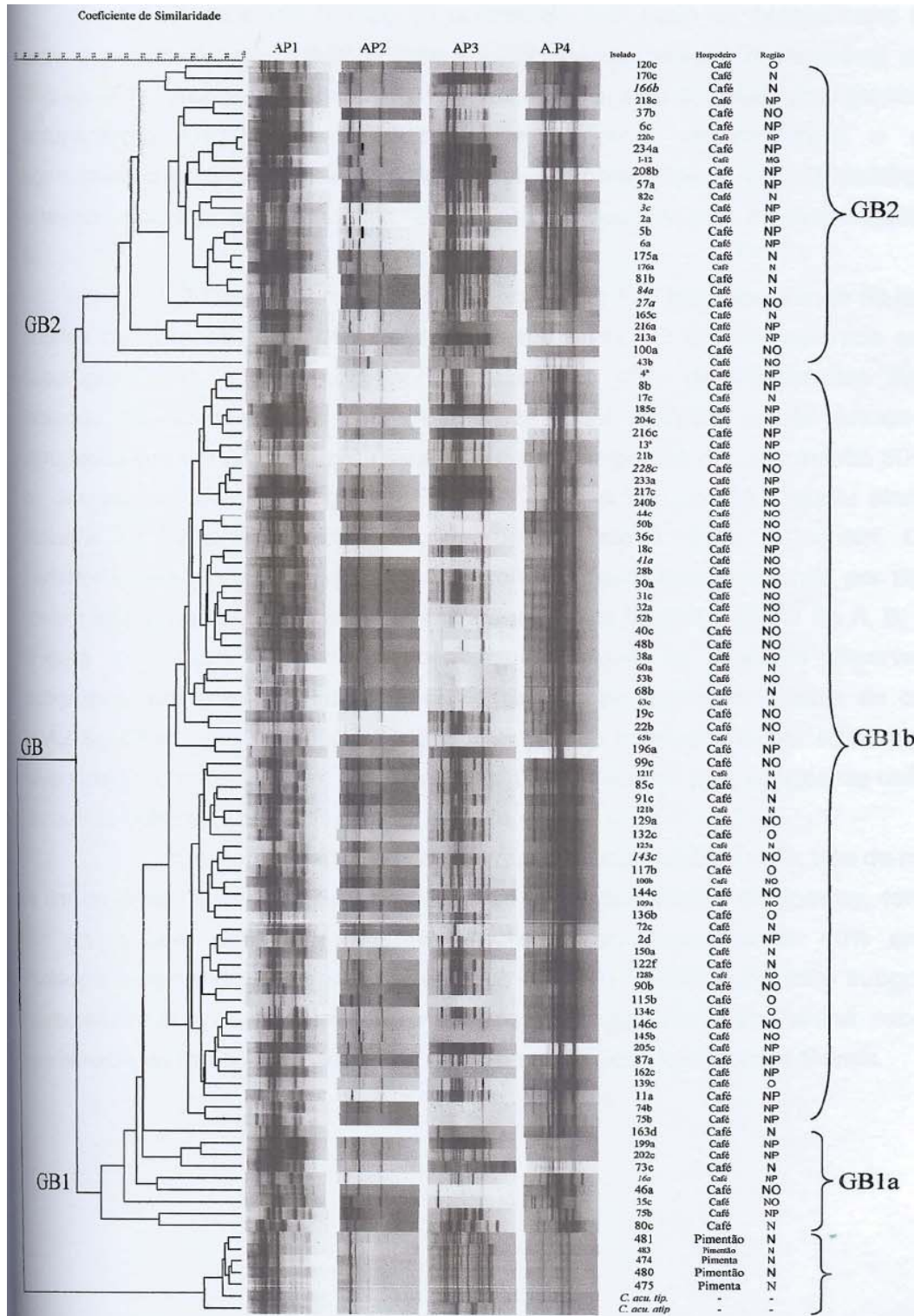


**Figura 4.5** – Perfil representativo da amplificação com os *primers* arbitrários (AP) que amplificam as sequências repetitivas (ISSR) de isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes culturas. A, AP1; B, AP2; C, AP3; D, AP4; M, marcador de peso molecular *Ladder 1kb-plus* (Invitrogen).

Na comparação entre a população de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e *C. acutatum* foi possível observar similaridade de aproximadamente 30%. Um grupo contendo a espécie *C. gloeosporioides* (GB) foi dividido em dois subgrupos com similaridade de aproximadamente 50%, sendo GB1 com 75 isolados e GB2 com 25 isolados (Figura 4.6). O grupo GB1 foi subdividido em outros subgrupos apresentando similaridade em torno de 85%. Dentro deste grupo foram encontrados isolados de diferentes regiões, não mostrando correlação geográfica entre os mesmos. O grupo GB2 composto por 25 isolados também se dividiu em subgrupos, apresentando diversidade maior que a encontrada no grupo GB1. A análise da origem dos isolados do grupo GB2 apresenta uma clara prevalência de isolados provenientes da região Norte do Estado do Paraná (Figura 4.6).

A diversidade genética intraespecífica entre *Colletotrichum* spp. foi avaliada por Freeman (1993), utilizando três dos *primers* utilizados no presente trabalho (AP4, AP3 e AP2). Segundo os autores não foi possível correlacionar os isolados com o hospedeiro ou origem geográfica. Os mesmos resultados foram obtidos por Souza (2004), estudando populações de isolados de *C. gloeosporioides* quando verificou alta diversidade genética utilizando o *primer* AP4. Neste trabalho, este *primer* evidenciou um grupo semelhante ao descrito pela análise polifásica, mostrando prevalência de isolados obtidos de cafeeiro da região Norte do Paraná. Freeman et al. (2001) utilizando a técnica de ISSR para uma população de *C. acutatum* observaram correlação entre isolados com o hospedeiro de origem. No entanto, não foi possível estabelecer qualquer correlação com características morfológicas, culturais e de patogenicidade dos isolados analisados.

As adaptações de isolados com determinados ambientes podem estar relacionados com as condições edafoclimáticas (BAILEY et al., 1992). Estas condições poderiam explicar a prevalência de isolados de *Colletotrichum* spp. da região Norte em um dos subgrupos (Figura 4.7). Neste contexto, outros marcadores poderão ser utilizados no intuito de obter um estudo detalhado de genética de populações para melhor avaliar esta separação.

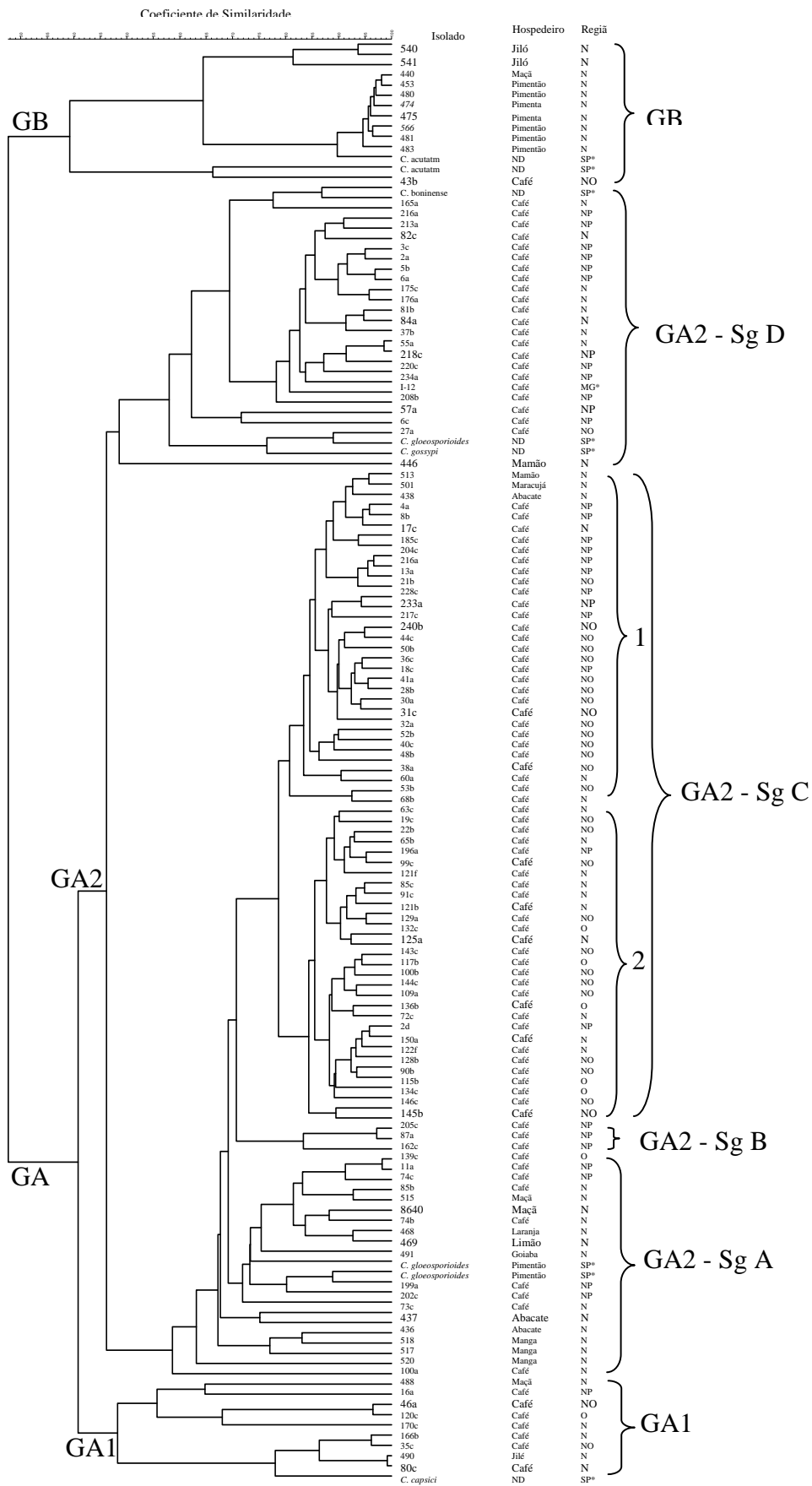


**Figura 4.6** – Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Pearson com base na análise dos fragmentos obtidos com os primers AP1, AP2, AP3 e AP4 de população de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de cafeeiro e *Colletotrichum acutatum*. N: Norte; NP: Norte Pioneiro; NO: Noroeste; O: Oeste.

A segunda análise foi construída com base no polimorfismo gerado entre a população de *Colletotrichum* spp. obtida de cafeeiro e de outras culturas (Figura 4.7). Assim como na análise anterior, a análise polifásica gerada pelo agrupamento UPGMA e coeficiente de Pearson, determinaram o melhor agrupamento com base nas correlações posteriores (Figura 4.7). O dendrograma evidenciou dois grupos principais: GA e GB com apenas 28% de similaridade entre si.

O Grupo A caracterizou-se por reunir 127 isolados, sendo 98 isolados obtidos de cafeeiro e os demais de outras culturas. O GA foi separado em dois subgrupos: GA1 e GA2 com aproximadamente 40% de similaridade entre si. Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de caqui incluídos nesse estudo foram agrupados em um único ramo, mantendo uma divergência de pelo menos 50% com os demais isolados deste grupo (Figura 4.7). O subgrupo GA1 reuniu ainda dois isolados de banana, um de café, um de abacate e ainda *C. capsici*. O GA2 caracterizou-se por reunir 117 dos 140 isolados deste estudo e ainda por distribuí-los em inúmeras subdivisões com similaridade entre 58 e 95% (GA2 Sg A, B, C e D) (Figura 4.7). Com base no hospedeiro de origem foi possível observar dois subgrupos, um bem definido, composto apenas por isolados obtidos de cafeeiro (GA2 Sg C) e outro subgrupo (GA2 Sg C) que se caracterizou por apresentar alta diversidade, contendo 11 e 15 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e de outras culturas, respectivamente (Figura 4.7).

Um total de 29 isolados correspondendo a 25 de café, três de mamão, e um de abacate e duas espécies tipo, *C. gloeosporioides* e *C. gossipy*, formaram um grupo bem definido, com divergência de aproximadamente 40% entre os isolados, originando outro subgrupo (GA2 – Sg D) (Figura 4.7). Este subgrupo se caracterizou por reunir isolados provenientes da região Norte do Paraná, exceto por um isolado da região Noroeste do Estado e um do Estado de Minas Gerais.



**Figura 4.7** – Dendrograma mostrando a relação entre 142 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e de outros hospedeiros. As distâncias genéticas foram obtidas por UPGMA com base na amplificação com quatro *primers*. N: Norte; NP: Norte Pioneiro; NO: Noroeste; O: Oeste

Este grupo corresponde em sua maioria ao grupo GB, apresentado na análise anterior onde a diversidade genética foi avaliada apenas para a população de *Colletotrichum* spp. obtida de café (Figuras 4.2 e 4.7). O grupo GB reuniu as espécies tipo *C. acutatum* e *C. boninense*, além dos isolados de café, jiló, pimentão e maçã. A espécie tipo *C. boninense* e o isolado 43b formaram um grupo com similaridade entre si de 65% e divergiram em 60% com a espécie tipo *C. acutatum* e os demais isolados (Figura 4.7). No Brasil existem poucos estudos referentes à caracterização de *Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estes, em geral, envolvem um número reduzido de isolados (NECHET; ABREU, 2002; JULIATTI et al., 2006). Neste estudo, foi possível detectar diversidade intraespecífica entre os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro com marcadores do tipo ISSR. No entanto, não foi possível correlacionar essa diversidade com a patogenicidade ou as regiões de origem dos isolados.

Alguns subgrupos apresentaram uma tendência a reunirem isolados com origem de uma mesma região, como no caso do grupo GB da primeira análise polifásica (Figura 4.6) e o subgrupo D do Grupo GA2 da segunda análise polifásica (Figura 4.7). Uma grande concentração de isolados da região Norte do Estado do Paraná foi observada nestes subgrupos. O mesmo pôde ser observado com 17 isolados da região Noroeste, isto é, 53% dos isolados desta região, que foram agrupados na divisão 1 do subgrupo C do GA2. Estes isolados representam 51% dos isolados desta divisão que reuniu também 15 isolados da região Norte (Figura 4.7).

Outra característica que chamou atenção nesta divisão foi à correlação com o perfil de agressividade. Assim, 78% dos isolados desta divisão foram capazes de induzir lesões em frutos verdes de cafeeiro apresentando incidência acima de 36% já no quinto dia após a inoculação (dados não mostrados). Nem sempre marcadores como ISSR, RAPD, ARDRA ou PCR-RFLP da região ITS do rDNA e AFLP apresentam associação com característica de virulência de patogenicidade (ANSARI et al., 2004). Neste contexto, técnicas adicionais como sequenciamento das regiões dos genes da  $\beta$ -tubulina e compatibilidade sexual (*MAT1-2*) e PCR-RFLP da região IGS poderão ser utilizadas. A eficiência destas técnicas na obtenção da diversidade intraespecífica já foi comprovada em estudos com esta espécie em outros hospedeiros ou outras espécies fúngicas (BRIDGE et al., 2008; LLORENS et al., 2006; DU et al., 2005; FREEMAN et al., 1998; APPEL;

GORDON, 1996). A diversidade obtida por ISSR sugere que a população de *Colletotrichum* associada ao cafeeiro nas principais regiões produtoras do Estado do Paraná é heterogênea e deve ser melhor caracterizada genotipicamente por meio de outras técnicas moleculares

#### 4.4 Conclusões

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

Com a metodologia de ARDRA é possível concluir que:

- Existe baixa variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiro;
- Existe variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro comparado a isolados obtidos de outros hospedeiros;
- As enzimas testadas são eficientes para obtenção de diversidade intra e interespecífica.

A análise polifásica com *primers* que amplificam regiões repetitivas permite concluir que:

- Existe variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro;
- Duas subpopulações entre os isolados de *Colletotrichum* spp. do Estado do Paraná são estabelecidas, sendo uma composta em sua maioria por isolados apenas das regiões Norte e Norte Pioneiro do Estado do Paraná;
- Não é possível estabelecer correlação entre a variabilidade genética obtida e características de patogenicidade;
- A metodologia é apropriada para determinar a diversidade inter e intraespecífica.

## REFERÊNCIAS

ABD-ELSALAM, K. A. et al. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 82-85, 2003.

AFANADOR-KAFURI, L. et al. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, p. 579-587, 2003.

AGRIOS, G. N. Genetics of plant disease. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005. p. 489-498.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 3.ed. New York: Academic Press, 1988. p. 803.

AGWANDA, C. O. et al. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae* in *Coffea arabica*. **Euphytica**, v. 97, p. 241-248, 1997.

ALAHAKOON P. W.; BROWN A. E.; SREENIVASAPRASAD, S. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, p. 93-103, 1994.

ALKAN, N. et al. Role of Ammonia Secretion and pH Modulation on Pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on Tomato Fruit. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 21, p. 1058–1066, 2008.

ALLCOCK, A. L. et al. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD V. H.; WATSON R. T. **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 57-88.

ALMEIDA, S. R. et al. Observações preliminares sobre queda de frutos sob suspeita de ataque por *Colletotrichum* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979. **Anais...** Araxá: IBC/GERCA, 1979. p. 323-326.

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

ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 021-031, 2007.

ANSARI, K. I. et al. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. **Plant Pathology**, v. 53, p. 635-642, 2004.

APPEL, D. J.; GORDON, T. R. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 9, p. 125-138, 1996.

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

AZEVEDO, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, C. M. L. Transgênicos e evolução dirigida. **História, Ciência e Saúde**, v. 7, p. 451-464, 2000.

BAILEY, J. A.; JEGUER, M. J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Londres: CAB International, 1992. 388 p.

BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Londres: CAB International, 1992. p. 88-120.

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

**BRASIL**. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 29 nov. 2008.

**BRASIL**, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 23 jan. 2009

BECHINGER, C. et al. Optical measurements of invasive forces exerted by appresoria of a plant pathogenic fungus. **Science**, v. 285, p. 1896-1899, 1999.

BÉLANGER, R. R.; MENZIES, J. G. Use of silicon to control diseases in vegetable crops. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, S42-S45. 2003. (Resumo)

BERNSTEIN, B. et al. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, v. 79, p. 478-482, 1995.

BEYNON, S. M. et al. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 457-470, 1995.

BRIDGE, P. D. et al. **Applications of PCR in Micology**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 375.

BRIDGE, P. D. et al. Variability of *Colletotrichum kahawae* in Relation to Other *Colletotrichum* Species from Tropical Perennial Crops and the Development of Diagnostic Techniques. **Journal Phytopathology**, v. 156, p. 274-280, 2008.

BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, W. L. Molecular characterization of slow-orange key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v. 86, p. 523-527, 1996.

BRYSON, R. J. et al. A sexuality and genetics of *Colletotrichum* In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Londres: CAB International, 1992

BUDDIE, A. G. et al. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry, **Mycological Research**, v. 103, p. 385-394, 1999.

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

CANNELL, M. G. R. Physiology of the coffee crop. In: CLIFFORD, M.D. WILSON, K. C. **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Connecticut: AVI Publishing Company, 1985, p. 251-283.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v. 94, p. 210-220, 2002.

CANTERI, M. G. et al. SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 18-24, 2001.

CARBONE, L.; KOHN, L. Ribosomal DNA sequence divergence within transcribed spacer 1 of sclerotiniaceae. **Mycological**, v. 85, p. 415-427, 1997.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C. Natural Cross pollinization in *Coffea arabica*. **International Horticultural Society**, v. 4, p. 447-449, 1962.

CARVALHO, F. M. S. **Caracterização cultural, morfológica e genética de espécies de *Colletotrichum* associadas a doenças em macieira**. 1997. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.

CARVALHO, V. L. et al. Influencia do Zinco na incidência de doenças do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 804-808, 2008.

CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro**: importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 96 p.

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

CHEN, N.; HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during the infection of tobacco. **Journal Microbiology Methods**, v. 53, p. 113-122, 2003.

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

CONAGIN, C. H. T. M.; MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora*. **Bragantia**, Campinas, v. 20, p. 787-804, 1961.

COOKE, D. E. L.; DUNCAN, J. M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. **Mycological Research**, v. 101, p. 667-677, 1997.

COSTA, M. J. N., ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Efeito de níveis de desbaste de frutos do cafeeiro na incidência da ferrugem, no teor de nutrientes, carboidratos e açúcares redutores. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 564-571, 2006.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 465-512, 2006.

DENOYES, B.; BAUDRY, A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. **Phytopathology**, v. 85, p. 53-57, 1995.

DERSO, E., WALLER, J. M., Variation among *Colletotrichum* isolates from diseased coffee berries in Ethiopia. **Crop Protection**, v. 22, p. 561-565, 2003.

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

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

DRORI, N. et al. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3258-3262, 2003.

DU, M. et al. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia**, v. 97, p. 641-658, 2005.

EIRA, M. T. S. et al. Bancos de germoplasma de café no Brasil: base do melhoramento para produtividade e qualidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007. **Anais...** Águas de Lindóia; EMBRAPA, 2007. CD-ROM.

FAWE, A. et al. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, v. 88, p. 396-401, 1998.

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

FERNANDES, N. T. **Incidência e controle de populações fúngicas associados à qualidade de bebida de café (*Coffea arabica* L.) na região da Zona da Mata de Minas Gerais**. 2000. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, R. L. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 325-330, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 880-885, 2005.

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

FIGUEIREDO, M. B. MARIOTTO, P. R. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **O Biológico**, v. 24, p. 25-26, 1978.

FIRMAN, I. D.; WALLER, J. M. Coffee berry disease and other *Colletotrichum* disease of coffee. **Phytopathological Papers**, v. 20, p. 1-53, 1977.

FREEMAN, S.; KATAN, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopatology**, v. 87, p. 516-521, 1997.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. **Micological Research**, v. 99, p. 501-504, 1995.

FREEMAN, S.; PHAM, M.; RODRIGUEZ, R. J. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A + T-Rich DNA, and nuclear DNA analysis. **Experimental Mycology**, v. 17, p. 309-322, 1993

FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 395-404, 1996.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, p. 596-605, 1998.

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Anemone (*Anemone coronaria* L.). **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5267-5272, 2000.

FREEMAN, D. S. et al. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**, v. 91, p. 586-592, 2001.

FREITAS, V. M.; MENDES, M. A. S. **Fungos exóticos potenciais e atuais para o cafeeiro**. Brasília:Embrapa, 2005. (Comunicado Técnico).

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 12-16, 2000.

FURTADO, E. L. et al. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 222-227, 1999.

GARRIDO, C. ET AL. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. **Plant Pathology**, v. 58, p. 43-51, 2008.

GASPARI-PEZZOPANE, C. **Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante a frutificação do cafeeiro**. 2007. 105 f. Tese (Doutorado). – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

GICHURU, E. K. Resistance mechanisms in Arabica coffee to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae* Sp. Nov.); a review. **Kenya Coffee**, v. 62, p. 2441-2444, 1997.

GONZÁLEZ, A. F. R. **Caracterización Molecular de Poblaciones de *Colletotrichum* spp. Asociadas a *Coffea arabica* em Colombia y su Aplicación en el Diagnóstico del CBD.** 2007. 108 f. Tese (Doutorado em Microbiología Industrial) Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007.

GUNNEL, P.; GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, v. 84, p. 157-16, 1992.

GUPTA, M.; FILNER, P. Microsatellites amplify highly polymorphic DNA bands in SPAR of plant DNA. **Plant Molecular Biology**, Abstr. 1705 In: Proceedings International Society Plant Molecular Biology, 1991.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical Applied Genetics**. v. 89, p. 998-1006. 1994.

HINDORF, H. *Colletotrichum* Occurring on *Coffea arabica* a Review. **Journal of Coffea Research**, v. 5, p. 43-56, 1975.

HO, W. C.; KO, W. H. A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 38, p. 41-44, 1997.

HOCKING, D. Brown Blight (*Colletotrichum coffeanum* Noak) of *Coffea arabica* in East Africa. **Annals of Applied Biology**, v. 58, p. 409-421, 1966.

HODSON, A.; MILLS, P. R.; BROWN, A. E. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Micological Research**, v. 97, p. 329-335, 1993.

HOLLIDAY, P. Fungus Diseases of Tropical Crops. **Annals of Applied Biology**. England., p. 607, 1980.

HUBER, D. M.; WATSON, R. D. Nitrogen form and plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 139-165, 1974.

JAYASINGHE, C. K.; FERNANDO, T. Fungicide sensitivity of two *Colletotrichum* species pathogenic to rubber. **International Journal of Tropical Plant Diseases**, v. 18, p. 77-85, 2000.

JEFFRIES, P. et al. The biology and Control of *Colletotrichum* species on tropical fruits crops. **Plant Pathology**, v. 39, p. 343-366, 1990.

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annual Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 1238-1247, 1989.

JULIATTI, F. C.; SILVA, C. C. N.; GOULART, L. R. Estudos das características fisiológicas e genéticas de isolados de *Colletotrichum* spp. coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica*) de Minas Gerais. Testes de patogenicidade e análise molecular. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFES DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: EMBRAPA, 2000. p. 215-218.

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

KOGEL, K. H, FRANKEN, P, HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite: what decides? **Current Opinion Plant Biology**, v. 9, p. 358-63, 2006.

KRAMER-HAIMOVICH, H. et al. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1034-1039, 2006.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das Solanáceas. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 665-675.

LARDNER, R. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Micological Research**, v. 103, p. 275-285, 1999.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 259-266, 1999.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 620-625, 2003.

LINS, S. R. O. Incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* nos estádios de formação e nos tecidos do fruto de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 29(S), p. 135, 2004.

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

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 205-208, 2001.

LLORENS, A. et al. Variability and characterization of mycotoxin-producing *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rDNA region. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 465-478, 2006.

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

LYANAGE, H. D.; McMILLAN JR., R. T.; KISTLER, H. C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phitopatology**, v. 82, p. 1371-1376, 1992.

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

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V. et al. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primers for their identification. **Journal Phytopathology**, v. 151, p. 135-143, 2003.

MASSABA, D.; WALLER, J. M. Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J. A.; JEGUER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England: CAB International, 1992. p. 237-249.

MATIOLI, S. R.; PASSOS–BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. São Paulo: Holos. 2001. p. 153-161.

MACKENZIE, S. J. et al. Selection for Pathogenicity to Strawberry in Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from Native Plants. **Phytopathology**, v. 97, p. 1130-1140, 2007.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995.

MENEZES, M; HALIN, R. T. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from northeast Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 27, p. 228-236, 1996.

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens: a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, v. 124, p. 60-70, 1993.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MARCADORES moleculares em plantas. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruit. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England: CAB International. 1992. p. 269-288.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98, p. 137–144, 1992.

MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 307-320, 2002.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARIOTTE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. **Micological research**, v. 106, p. 479-593, 2002.

MUNIZ, M. F. S.; SANTOS, R. C. R.; BARBOSA, G. V. de S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 177-179, 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 28 set. 2007.

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

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Investigations on a disease of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* Noack. I. Some factors affecting infection by the pathogen. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 43, p. 489-505, 1960.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F.M. Coffee berry disease and coffee leaf rust in Kenya. **Outlook on Agriculture**, v. 4, p. 72-79, 1964.

NUTMAN, F. J. Coffee berry disease. **Annual Pathology Society**, v. 16, p. 277-286, 1970.

O' NEIL, N. R. et al. Application of amplified Restriction fragment Length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. **Phytopatology**, v. 87, p. 745-750, 1997.

OLIVER, R. P; SOLOMON, P. S. Recent Fungal Diseases of Crop Plants: Is Lateral Gene Transfer a Common Theme? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 287-293, 2008.

OMONDI, C. O. et al. Reaction of some *Coffea arabica* genotypes to strains of *Colletotrichum kahawae*, the cause of coffee berry disease. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 61-63, 1999.

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

OTERO, L.; DUCASSE, D.; MILLER, R. N. G. Variability in Ribosomal DNA Genic and Spacer Regions in *Verticillium dahliae* Isolates from Different Hosts. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 441-446, 2004.

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

PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. A antracnose do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, v. 4, p. 82-90, 1978.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

PERES, N. A. R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 150, p. 128-134, 2002.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. **Fungal Genetic Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999.

PEZZOPONE, J. R. M. et al. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro Arábica. **Bragantia**, v. 62, p. 499-505, 2003.

POZZA, A. A. et al. A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 53-60, 2001.

POZZA, A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 185-188, 2004.

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

PRUSKY, D., PLUMBIEY, R. A. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruit. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. England: CAB International, 1992. p. 337-357.

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

RAYNER, R.W. Latent infection in *Coffea arabica*. **Nature**, v. 161, p. 245-246, 1948.

RAYNER, R.W. Coffee berry disease: a survey of investigations carried out up to 1950. **Kenya Coffea**, v. 17, p. 130-158, 1952.

RESENDE, A. M.; ROSADO, P. L. A informação no Mercado do Café. In: ZAMBOLIM, L. **Produção integrada do café**. Viçosa: UFV, 2003.

RODRIGUES, F. et al. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. **Plant Disease**, v. 85, p. 827-832, 2001.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. **Diversity of Tropical Microfungi**. Hong Kong: University Press, Hong Kong Press. 1997. p. 57-69

RODRIGUES, R. J.; YODER, O. C. A family of conserved repetitive DNA elements from the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Experimental Mycology**, v. 15, p. 232-242, 1991.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal Experiment Botanical**, v. 59, p. 1109-1114, 2008.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Software, 2000. 83p.

RUSSO, V. M.; RUSSO, B. M., CARTWRIGHT, B. Culture Conditions Affect Colonization of Watermelon by *Colletotrichum Orbiculare*. **Biologia Plantarum**, v. 44, p. 305-307, 2001.

SAHA, T. et al. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Micological Research**, v. 106, p. 215-221, 2002.

SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. The Impact of Molecular Characters on Systematics of Filamentous Ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 37-67, 1995.

SANDERS, G.; KORSTEN, L.; WEHNER, F. C. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 745-752, 2000.

SCHULZ, B; BOYLE, C. The endophytic continuum **Mycology Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SENTELHAS, P. C.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; FELÍCIO, J. C. Efeitos de diferentes condições de irrigação e densidade de semeadura no microclima e na ocorrência de Helminthosporiose e de Oídio em trigo. **Bragantia**, v. 52, p. 45-52, 1993.

SERA, G. H. et al. Correlação entre a ocorrência de *Colletotrichum* spp. e outras características agrônômicas em cafeeiros, **Bragantia**, v. 64, p. 435-440, 2005.

SERA, G. H. et al. Partial Resistance to fruit necrosis associated to *Colletotrichum* spp. among Arabic coffee genotypes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 395-402, 2007.

SERA, G. H. et al. Correlação entre a necrose de frutos associada ao *Colletotrichum* spp. com as características frutos por nó e produtividade entre genótipos de café arábica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 48-54, 2008.

SHAW, E. D. Leaf and fruit spot of *Coffee arabica* in New Guinea. **Agricultural Journal**, v. 19, p. 152-166, 1968.

SHERRIFF, C. et al. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, v. 18, p. 121-138, 1994.

SILVA, M. R. L. et al. Caracterização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2005. **Anais...** Londrina: EMBRAPA, 2005. CD-ROM.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, p. 119-147, 2006.

SLOUBOE, P. et al. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. **Mycological Research**, v. 103, p. 873-881, 1999.

SOANES, D. M. et al. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. **Phytopathogenic Fungi Genomics**, v. 3, e2300, 2008.

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 265-272, 2008.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da Conservação In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. São Paulo. Editora Holos. 2001, p. 172–192.

SOUZA, S. M.; CARVALHO, V. L. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida de café. **Informe Agropecuário**, v. 18, p. 21-26, 1997.

SOUZA, A. C. B. **Análise da Diversidade Genética através de Marcadores Moleculares e Características Citomorfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides***. 2004. 85 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. São Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. DNA sequence and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 41, p. 265-281, 1992.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P. R.; BROWN, A. E. Genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Micological Research**, v. 97, p. 995-1000, 1993.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *c. acutatum*. **Mycology Research**, v. 98, p. 186-188, 1994.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P. R.; MEEHAN, B. M.; BROWN, A. E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, v. 39, p. 499-512, 1996.

SUTTON, B. C. Fungi imperfecti with perithecia, acervuli and stromata. In: SUTTON, B. C. **The coelomycetes**. Surrey: CMI Kew, 1980. p. 523-525.

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

TALHINHAS, P. et al. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, v. 92. p. 986-996, 2002.

TALHINHAS, P. et al. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71. p. 2987-2998, 2005.

TALHINHAS, P. et al. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2987-2998, 2007.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

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

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

VERMEULEN, H. Coffee berry disease in Kenya. **Plant Pathology**, v. 76, p. 277-284, 1970.

VILLA, N. O. et al. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ -tubulin gene sequences. **Micologia**, v. 98, p. 410-422, 2006.

VINNERE, O. et al. The causal agent of antracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. **Micological Research**. v. 106, p. 60-69, 2002.

VON ARX, J. A. Die arten der gattung *Colletotrichum*. **Phytopathology**, v. 29, p. 413-468, 1957.

WALLER, J. M. et al. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. **Mycological Research**, v.97, p. 989-994, 1993.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops p. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J.; **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England: CAB International, 1992. p. 166-185.

WALLER, J. M., BRIDGE, P. D. Recent advances in understanding *Colletotrichum* diseases of some tropical perennial crops. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 2000. p. 337-345.

WALTERS, D. R.; BINGHAM, I. J. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease plant control. **Annals of Applied Biology**, v. 151, p. 307-324, 2007.

WEISING, K. et al. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. **Nucleic Acid Research**, v. 17, p. 110-128, 1989.

WELLMAN, F. L. Blister spot of arabica coffee from virus in Costa Rica. **Turrialba**, v. 7, p. 13-15, 1957.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M.; O'CONNELL, R. J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v. 91, p. 149-158, 2001.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. J. J; SHINSKY, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: White, Academic Press, 1990. p. 315-322.

WHITELAW-WECKERT, M. A. et al. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. **Plant Pathology**, v. 56, p. 448-463, 2007.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YAKOBY, N. et al. *Colletotrichum gloeosporioides peB*, is an important factor in avocado fruit infection. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 14, p. 988-995, 2001.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral de plantas. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: UPF, 1993. p. 275-309.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Produção integrada do cafeeiro: manejo de doenças. In: ZAMBOLIM, L. **Produção integrada do café**. Viçosa: UFV, 2003.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do Cafeeiro (*Coffea arabica* e *C.canephora*). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, 665 p.

## **ANEXOS**

**ANEXO A – PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM* SPP.  
OBTIDOS DE CAFEIROS E OUTRAS CULTURAS UTILIZADOS NESTE  
ESTUDO.**

Isolado	Hospedeiro/Cultivar	Órgão de isolamento	Procedência	Ano de obtenção	Isolado	Hospedeiro/Cultivar	Órgão de isolamento	Procedência
2a	Café-lapar 59	Ramo	Abatiá	2005	41a	Café - Sachimor	Ramo	Diamante do Norte
2b	Café-lapar 59	Ramo	Abatiá	2005	43b	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Diamante do Norte
2d	Café-lapar 59	Ramo	Abatiá	2005	44c	Café - Sachimor	Ramo	Diamante do Norte
3c	Café-lapar 59	Ramo	Abatiá	2005	46a	Café - Icatu Vermelho	Ramo	Japurá
4a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Abatiá	2005	48b	Café - Icatu Vermelho	Ramo	Japurá
5b	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Abatiá	2005	50b	Café - Sachimor	Ramo	Itaúna do Sul
6a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Abatiá	2005	51b	Café - Sachimor	Ramo	Itaúna do Sul
6c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Abatiá	2005	52b	Café - Icatu Vermelho	Ramo	Paraná
8b	Café-lapar 59	Ramo	Bandeirantes	2005	53b	Café - Icatu Vermelho	Ramo	Paraná
11a	Café-lapar 59	Ramo	Assaí	2005	55a	Café - Iapar 59	Ramo	Sertãozinho
13a	Café-lapar 59	Ramo	Ribeirão do Pinhal	2005	57a	Café-lapar 59	Ramo	Sertãozinho
16a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Ribeirão do Pinhal	2005	60a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Florestópolis
17c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Ribeirão do Pinhal	2005	61d	Café - Catuai Vermelho	Flor	Bela Vista do Paraíso
18c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Ribeirão do Pinhal	2005	63c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Bela Vista do Paraíso
19c	Café - Mundo Novo	Ramo	Marilena	2005	65b	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Alvorada do Sul
21b	Café - Mundo Novo	Ramo	Marilena	2005	68b	Café - Iapar 59	Ramo	Jaguapitã
22b	Café - Tupi	Ramo	Maringá	2005	72c	Café - Iapar 59	Ramo	Munhoz de Melo
27a	Café - Tupi	Ramo	Maringá	2005	73c	Café - Mundo Novo	Ramo	Mundo Novo
28b	Café - Sumatra	Ramo	Maringá	2005	74b	Café - Mundo Novo	Ramo	Cambé
30a	Café - Sumatra	Ramo	Maringá	2005	75b	Café - Mundo Novo	Ramo	Cambé
31c	Café-lapar 59	Ramo	São Tomé	2005	80c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Cambé
32a	Café - Mundo Novo	Ramo	São Tomé	2005	81b	Café - Catuai Vermelho	Flor	Cambé
35c	Café-lapar 59	Ramo	São Tomé	2005	82c	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Londrina
36c	Café-lapar 59	Ramo	São Tomé	2005	84a	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Londrina
37b	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Ciano rte	2005	85c	Café - Iapar 59	Ramo	Londrina
38a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Ciano rte	2005	85c	Café - Iapar 59	Ramo	Londrina
40c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Diamante do Norte	2005	87a	Café - Iapar 60	Ramo	Londrina

Continua

## Continuação do Anexo A

Isolado	Hospedeiro/ Cultivar	Órgão de isolamento	Procedência	Ano de obtenção	Isolado	Hospedeiro/Cultivar	Órgão de isolamento	Procedência	Ano de obtenção
90b	Café - Mundo Novo	Ramo	Rolândia	2005	162c	Café - Mundo Novo	Ramo	Londrina	2005
91c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Rolândia	2005	163d	Café - Mundo Novo	Ramo	Londrina	2005
97a	Café - Iapar 59	Fruto	Moreira Sales	2005	165a	Café - Catuai	Ramo	Londrina	2005
99c	Café - Iapar 59	Fruto	Moreira Sales	2005	165c	Café - Catuai	Ramo	Londrina	2005
100a	Café - Acaiá	Flor	Patrocinio	2005	166b	Café - Catuai	Ramo	Londrina	2005
100b	Café - Acaiá	Ramo	Patrocinio	2005	166c	Café - Catuai	Ramo	Londrina	2005
109a	Café - Iapar 59	Ramo	Jariópolis	2005	170c	Café - Mundo Novo	Ramo	Londrina	2005
115b	Café - Sumatra	Ramo	Formosa do Oeste	2005	171c	Café - Iapar 59	Ramo	Londrina	2005
117b	Café - Icatu	Ramo	Formosa do Oeste	2005	175a	Café - Iapar 59	Ramo	Londrina	2005
120c	Café - Iapar 59	Ramo	Formosa do Oeste	2005	176a	Café - Iapar 59	Ramo	Londrina	2005
121b	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Arapongas	2005	185c	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Ibaiti	2005
121f	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Arapongas	2005	186b	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Ibaiti	2005
122f	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Arapongas	2005	196a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Ribeirão Claro	2005
125a	Café - Sumatra	Ramo	Arapongas	2005	198a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Ribeirão Claro	2005
128b	Café - Obatã	Flor	Umuarama	2005	199a	Café - Iapar 59	Ramo	Ribeirão Claro	2005
129a	Café - Tupi	Flor	Umuarama	2005	201a	Café - Iapar 59	Ramo	Ribeirão Claro	2005
132c	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Jesuítas	2005	202c	Café - Obatã	Ramo	Nova Fátima	2005
134c	Café - Icatu	Ramo	Jesuítas	2005	204c	Café - Obatã	Ramo	Nova Fátima	2005
136b	Café - Iapar 59	Ramo	Jesuítas	2005	205c	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Siqueira Campos	2005
139c	Café - Tupi	Ramo	Jesuítas	2005	208b	Café - Catuai	Ramo	Carlópolis	2005
141a	Café - Tupi	Ramo	Jesuítas	2005	213a	Café - Catuai Vermelho	Ramo	Carlópolis	2005
142a	Café - Jacutinga	Ramo	Umuarama	2005	216a	Café - Catuai	Ramo	Comélio Procópio	2005
143c	Café - Jacutinga	Ramo	Umuarama	2005	216c	Café - Catuai	Ramo	Comélio Procópio	2005
144c	Café - Tupi	Ramo	Umuarama	2005	217c	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Pinhalão	2005
145b	Café - Iapar 59	Ramo	Umuarama	2005	218c	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Pinhalão	2005
146c	Café - Icatu	Ramo	Umuarama	2005	220c	Café - Iapar 59	Ramo	Jacarezinho	2005
150a	Café - Iapar 59	Ramo	Londrina	2005	228c	Café - Catuai Amarelo	Ramo	Torrinha	2005

Continua

Continua

## Continua anexo A

Isolado	Hospedeiro / Cultivar	Órgão de isolamento	Procedência	Ano de obtenção	Isolado	Hospedeiro/Cultivar	Órgão de isolamento	Procedência
233a	Café - Obatã	Ramo	Santa Mariana	2005	468	Laranja	Fruto	CEASA/Londrina
234a	Café - Iapar 59	Ramo	Santa Mariana	2005	469	Limão	Fruto	CEASA/Londrina
240b	Café - Iapar 59	Ramo	Quinta do Sol	2005	470	Mexerica	Fruto	CEASA/Londrina
372	Café	Ramo	UF LA/Lavras	2002	474	Pimenta	Fruto	CEASA/Londrina
424	Café - Rubi	Fruto	IAPAR/ Londrina	2007	475	Pimenta	Fruto	CEASA/Londrina
436	Abacate	Fruto	CEASA/Londrina	2006	476	Pimenta	Fruto	CEASA/Londrina
437	Abacate	Fruto	CEASA/Londrina	2006	477	Pimenta	Fruto	CEASA/Londrina
438	Abacate	Fruto	CEASA/Londrina	2006	478	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina
440	Maçã	Fruto	CEASA/Londrina	2006	479	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina
441	Maçã	Fruto	CEASA/Londrina	2006	480	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina
442	Maçã	Fruto	CEASA/Londrina	2006	481	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina
443	Maçã	Fruto	CEASA/Londrina	2006	482	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina
445	Mamão	Fruto	CEASA/Londrina	2006	483	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina
446	Mamão	Fruto	CEASA/Londrina	2006	484	Mamão	Fruto	CEASA/Londrina
447	Mamão	Fruto	CEASA/Londrina	2006	485	Mamão	Fruto	CEASA/Londrina
448	Mamão	Fruto	CEASA/Londrina	2006	486	Mamão	Fruto	CEASA/Londrina
453	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina	2006	487	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina
454	Pimentão	Fruto	CEASA/Londrina	2006	488	Maçã	Fruto	CEASA/Londrina
455	Banana	Fruto	CEASA/Londrina	2006	489	Banana	Fruto	CEASA/Londrina
460	Uva	Ramo	CEASA/Londrina	2006	490	Jiló	Fruto	CEASA/Londrina
461	Uva	Ramo	CEASA/Londrina	2006	491	Goiabá	Fruto	CEASA/Londrina
462	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina	2006	498	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina
463	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina	2006	499	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina
464	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina	2006	500	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina
465	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina	2006	501	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina
466	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina	2006	502	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina
467	Caqui	Fruto	CEASA/Londrina	2006	503	Maracujá	Fruto	CEASA/Londrina

CEASA - Central de Abastecimentos S.A do Município de Londrina

Continua

UF LA - Universidade Federal de Lavras - Minas Gerais

IAPAR - Instituto Agronômico do Paraná

**ANEXO B – COMPARAÇÃO ENTRE A SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO ITS1, ITS2 E 5,8 S DO RDNA AMPLIFICADA DO ISOLADO 17C (CAFEIRO) E SEQÜÊNCIA DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES* DEPOSITADA EM BANCO DE DADOS.**

```
>gb|AY791887.1| Colletotrichum gloeosporioides strain TXMG001 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S
ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete
sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=591

Score = 867 bits (469), Expect = 0.0
Identities = 477/480 (99%), Gaps = 3/480 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAGAATTGGGGG-TTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGGAGACGTAAG-TAC 58
      |||
Sbjct 535 GAGAATTGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGGAGACGTAAGTTAC 476

Query 59 TACG-AAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAG 117
      |||
Sbjct 475 TACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAG 416

Query 118 GGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCA 177
      |||
Sbjct 415 GGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCA 356

Query 178 GAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTC 237
      |||
Sbjct 355 GAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTC 296

Query 238 ACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT 297
      |||
Sbjct 295 ACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT 236

Query 298 TAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTAACACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGG 357
      |||
Sbjct 235 TAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTAACACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGG 176

Query 358 TTATCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCCGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACC 417
      |||
Sbjct 175 TTATCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCCGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACC 116

Query 418 CTACCCGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAG 477
      |||
Sbjct 115 CTACCCGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAG 56
```

**ANEXO C - COMPARAÇÃO ENTRE A SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO ITS1, ITS2 E 5,8 S DO RDNA AMPLIFICADA DO ISOLADO OBTIDO DE PIMENTÃO E SEQÜÊNCIA DE *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* (*GLOMERELLA ACUTATA*) DA MESMA CULTURA DEPOSITADA NO BANCO DE DADOS.**

> [gb|FJ810513.1](#) Glomerella acutata strain ATCC MYA-4518 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=578

Score = 881 bits (477), Expect = 0.0  
Identities = 482/484 (99%), Gaps = 2/484 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 3   TTGGGGGTTTTACGGCAAGAGT-CCTCCGGAT-CCAGTGGGAGACGTTAGTTACTACGCA 60
          |||
Sbjct 521  TTGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGGGAGACGTTAGTTACTACGCA 462

Query 61  AAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCCACGTGTGCCGTGGGGCCCC 120
          |||
Sbjct 461  AAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCCACGTGTGCCGTGGGGCCCC 402

Query 121 AAAACCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCTCGCCAGAATGC 180
          |||
Sbjct 401  AAAACCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCTCGCCAGAATGC 342

Query 181 TGGCGAGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA 240
          |||
Sbjct 341  TGGCGAGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA 282

Query 241 CTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAG 300
          |||
Sbjct 281  CTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAG 222

Query 301 TTTTAATTATTTGCTTTGTGCCACTCAGAAGAGACGTCGTGTAATAGAGTTTGTTTCCT 360
          |||
Sbjct 221  TTTTAATTATTTGCTTTGTGCCACTCAGAAGAGACGTCGTGTAATAGAGTTTGTTTCCT 162

Query 361 CCGGCGGGCGCCCCGTCCTCCCGTGGTGGGGGCCGGCGCGGGAGGGGAGGCCCGCGAGAGG 420
          |||
Sbjct 161  CCGGCGGGCGCCCCGTCCTCCCGTGGTGGGGGCCGGCGCGGGAGGGGAGGCCCGCGAGAGG 102

Query 421 CTTCCCTGCCCGCCGAAGCAACGGTTAGGTATGTTACAAAAGGGTTATAGAGCGGTAAC 480
          |||
Sbjct 101  CTTCCCTGCCCGCCGAAGCAACGGTTAGGTATGTTACAAAAGGGTTATAGAGCGGTAAC 42

Query 481 TCAG 484
          ||||
Sbjct 41  TCAG 38

```

**ANEXO D – COMPARAÇÃO ENTRE A SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO ITS1, ITS2 E 5,8 S DO RDNA AMPLIFICADA DO ISOLADO 436 (ABACATE) E SEQUENCIA DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* DA MESMA CULTURA DEPOSITADA EM BANCO DE DADOS.**

```
>gb|EU552111.1| Colletotrichum gloeosporioides culture-collection CBS:122687
18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed
spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed
spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1539

Score = 859 bits (465), Expect = 0.0
Identities = 472/475 (99%), Gaps = 2/475 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 2 TGGGGGG-TTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCAGACGTAAA-TTACTACGC 59
      |||
Sbjct 618 TGGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCAGACGTAAAGTTACTACGC 559

Query 60 AAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCC 119
      |||
Sbjct 558 AAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCC 499

Query 120 CAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATG 179
      |||
Sbjct 498 CAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATG 439

Query 180 CTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATT 239
      |||
Sbjct 438 CTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATT 379

Query 240 ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTAAAA 299
      |||
Sbjct 378 ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTAAAA 319

Query 300 GTTTTGATTATTTGCTTGTACCCTCAGAAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATC 359
      |||
Sbjct 318 GTTTTGATTATTTGCTTGTACCCTCAGAAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATC 259

Query 360 CTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCCTACC 419
      |||
Sbjct 258 CTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCCTACC 199

Query 420 CGACGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTCAAAAAGGGTTATAGAGCGTAAACTCAG 474
      ||
Sbjct 198 CGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTCAAAAAGGGTTATAGAGCGTAAACTCAG 144
```

**ANEXO E – COMPARAÇÃO ENTRE A SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO ITS1, ITS2 E 5,8 S DO RDNA AMPLIFICADA DO ISOLADO 526 (CAQUI) E SEQUENCIA DE COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES DA MESMA CULTURA DEPOSITADA EM BANCO DE DADOS.**

> [gb|AY791894.1|](#) Colletotrichum gloeosporioides strain TSG003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=601

Score = 861 bits (466), Expect = 0.0  
Identities = 474/477 (99%), Gaps = 3/477 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      AATTGGGGG-TTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTA--TACTAC 57
            |||
Sbjct 528    AATTGGGGGTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTAAGTTACTAC 469

Query 58     GCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCGGCTGTAGGGC 117
            |||
Sbjct 468     GCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCGGCTGTAGGGC 409

Query 118    CCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 177
            |||
Sbjct 408    CCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 349

Query 178    TGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA 237
            |||
Sbjct 348    TGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA 289

Query 238    TTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAA 297
            |||
Sbjct 288    TTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAA 229

Query 298    AAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCCTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTA 357
            |||
Sbjct 228    AAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCCTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTA 169

Query 358    TCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCCTG 417
            |||
Sbjct 168    TCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACGGAGACCCTG 109

Query 418    CCCGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAG 474
            |||
Sbjct 108    CCCGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAG 52

```