

LEONARDO PARESQUI

**PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. AO CAFEEIRO  
(*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

LEONARDO PARESQUI

**PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. AO CAFEEIRO**  
**(*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 10 de março de 2003.

---

Dr. Antônio Alves Pereira  
(Conselheiro)

---

Prof. Geraldo Martins Chaves

---

Dr. Hécio Costa

---

Prof. Ulisses Gomes Batista

---

Prof. Laércio Zambolim  
(Orientador)

À minha esposa, Ariane.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste Programa.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao professor Laércio Zambolim, pela competente orientação, pelo apoio e incentivo, pelos ensinamentos e, sobretudo, pela amizade e confiança.

Ao pesquisador e amigo Hércio Costa, pelos ensinamentos e conselhos durante o trabalho.

Ao professor Geraldo Martins Chaves, pela oportunidade, pelo agradável convívio, pelas sugestões e pela confiança depositada em meu trabalho.

Aos professores conselheiros Antonio Alves Pereira e Francisco Xavier Ribeiro do Vale, pelas sugestões, que muito ajudaram neste trabalho.

Ao professor Ulisses Gomes Batista, pela atenção e pelas importantes contribuições dadas ao trabalho.

À Dra. Cássia C.H. Sakiama, pela paciência e pelos ensinamentos.

À Dra. Bivanilda Almeida Tapias, pelas oportunidades que me deu na graduação e pelos conselhos.

À Dra. Terezinha Texeira Cabral, pela grande amizade.

Aos colegas Aderlan, Brainer, Ivanete, Lílian, Léo, Toninho, Sthefania e Ricardo, pela amizade e pelo agradável convívio.

Ao grande amigo João Bosco Soares, pela ajuda na condução dos experimentos e principalmente pelos momentos de descontração.

Ao amigo José Cláudio Torres, pelos conselhos, pelo companheirismo e pelas fotos dos experimentos.

Aos colegas do DFP, José Carlos, Macabeu, José Orlando, Jesus, Camilo, Fizinho, e aos colegas de curso, que tornaram mais agradável e interessante esta fase da minha vida.

A todos os professores que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e humano.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Leonardo Paresqui nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, ES, no dia 16 de junho de 1978.

Em 1996, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em Agronomia em março de 2001.

No período de junho de 1998 a agosto de 2000, foi bolsista de iniciação científica, no Departamento de Fitopatologia da UFV.

Em 2001, ingressou no Mestrado no Departamento de Fitopatologia da UFV.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.1. Obtenção de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de café .....	12
3.2. Obtenção e manutenção de culturas monospóricas .....	13
3.3. Teste de patogenicidade dos isolados .....	13
3.3.1. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a frutos verdes ....	13
3.3.2. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a pontas de ramos .....	14
3.3.3. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a plântulas de cafeeiro .....	15
3.4. Processo de esterilização superficial de ramos e frutos verdes de café .....	16
3.5. Método químico para acelerar a infecção latente (assintomática) por <i>Colletotrichum</i> em cafeeiro .....	17
3.6. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a cafeeiros ( <i>Coffea arabica</i> ) oriundos de cultura de tecido .....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
4.1. Identificação de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. ....	19

	<b>Página</b>
4.2. Teste de patogenicidade dos isolados .....	20
4.2.1. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a frutos verdes ....	20
4.2.2. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a ramos jovens ...	21
4.2.3. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a plântulas de cafeeiro .....	22
4.3. Processo de esterilização superficial de ramos e frutos verdes de café .....	23
4.4. Método químico para acelerar a infecção latente (assintomática) por <i>Colletotrichum</i> em cafeeiro .....	24
4.5. Patogenicidade de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a cafeeiros ( <i>Coffea arabica</i> ) oriundos de cultura de tecido .....	25
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
APÊNDICE .....	36



## RESUMO

PARESQUI, Leonardo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2003.  
**Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. ao Cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** Orientador: Laércio Zambolim. Conselheiros: Antônio Alves Pereira e Francisco Xavier Ribeiro do Vale.

Neste trabalho foram conduzidos experimentos em laboratório, visando estabelecer a patogenicidade de *Colletotrichum* sp. ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Isolamentos de *Colletotrichum* sp. foram feitos a partir de material coletado em quatro estados: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. A partir dos isolamentos foram obtidas 180 culturas monospóricas, mantidas em sílica-gel, visando à preservação. Entre as 180 culturas inoculadas, em ramos com três rosetas de frutos verdes, houve diferença na incidência observada, tanto nos ramos com ferimento como naqueles sem ferimento, dez dias após a inoculação. A incidência máxima obtida foi de 69,5%, entretanto a testemunha, atomizada com água estéril, também manifestou sintomas e abundante esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, resultado novamente observado quando da repetição do experimento. Isso gerou dúvidas sobre a eficiência da sanitização dos ramos e frutos verdes coletados no campo. As amostras passaram por um processo de esterilização superficial, utilizado nas etapas para isolamento de organismos endofíticos. Pôde-se observar que, mesmo superficialmente estéreis, os tecidos apresentavam abundante esporulação de *C. gloeosporioides* após seis dias de incubação

em condições assépticas. Testes de patogenicidade foram então realizados, com e sem ferimento, utilizando-se três isolados, os quais foram inoculados em plantas oriundas de cultura de tecido, com três meses de idade, não sendo observados sintomas por mais de 20 dias após a inoculação. Porém, conseguiu-se recuperar o fungo das plantas inoculadas, mesmo depois de lavadas em água corrente, álcool 70% e cloro ativo 2%. Isso mostra que o organismo penetrou nos tecidos, entretanto sem manifestar sintomas. A partir desses resultados, concluiu-se que testes de patogenicidade de *C. gloeosporioides* devem ser conduzidos em plantas de cultura de tecido, a fim de se assegurar a sanidade do material a ser inoculado, visto que, mesmo após esterilização superficial do tecido, o organismo pode permanecer latente. Neste trabalho, obtiveram-se indícios de que *C. gloeosporioides* apresenta relação endofítica nos tecidos de cafeeiro (*Coffea arabica*).

## ABSTRACT

PARESQUI, Leonardo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2003.  
**Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. to Coffee (*Coffea arabica* L.).** Adviser: Laércio Zambolim. Committee members: Antônio Alves Pereira and Francisco Xavier Ribeiro do Vale.

This work had the objective to establish the pathogenicity of *Colletotrichum* sp to *Coffea arabica*. Isolations of *Colletotrichum* sp. were done from material collected in the field in four States: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo and Paraná. It was obtained 180 monoconidial cultures and maintained in silica-gel, for preservation. Among the 180 inoculated cultures, in branches with 3 rosettes of green fruits, there was difference in the incidence in the wounded and not wounded branches 10 days after the inoculation. The maximum incidence was of 69.5%, however check treatment atomized with sterile water, also manifested symptoms and abundant sporulation of *C. gloeosporioides*, the same results was observed again when the experiment was repeated. This generated doubts on the efficiency of the sanitization of the branches and green fruits collected in the field. The tissue samples went by a superficial sterilized process, used in the stages to isolate endofitic organisms. It was observed that even superficially sterile, the tissues presented abundant sporulation of *C. gloeosporioides* after six days of incubation in aseptic conditions. Pathogenicity tests were then

accomplished, with and without wound, using three isolates in three months old coffee seedlings of tissue culture. No symptoms observed for more than 20 days after the inoculation. However, the fungus was recovered of the inoculated plants, even after they had been washed in running water, alcohol 70% and active chlorine 2%. However, *C. gloeosporioides* was isolate from the inoculated tissue, although no symptoms were observed. From these results it was concluded that pathogenicity tests *C. gloeosporioides*, should be performed in plants from tissue culture, because, even after superficial sterilization of the tissue, the organism can be in the stage latent. In this work it was obtained, indications that *C. gloeosporioides* presents endofitic relationship in the tissues of *Coffea arabica*.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* engloba mais de 900 espécies de fungos mitospóricos, pertencentes à antiga ordem Melanconiales, classe Coelomycetes. Várias destas espécies já foram reconhecidas apresentando uma associação, como teleomorfos do gênero *Glomerella* (SUTTON, 1992). Fungos do gênero *Colletotrichum* estão presentes em toda parte e freqüentemente são polípagos, causando doenças com sintomas conhecidos comumente como antracnose em frutos, folhas e ramos, podendo as plantas ser infectadas em todas as fases de desenvolvimento (BAXTER et al., 1985).

Na cultura do cafeeiro, a doença conhecida como CBD, *Coffe Berry Disease*, tem como agente causal o patógeno *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, afetando frutos verdes em desenvolvimento. Essa doença é o principal fator limitante à produção de café na África, ocasionando perdas de 20 até 80% da produção, entretanto, não há relatos dessa espécie no continente americano (MASSABA & WALLER, 1992).

No cafeeiro, *Colletotrichum* sp. pode causar doenças conhecidas por: antracnose em frutos e ramos, *die-back* (seca-de-ramos), *elgon die-back*, mancha-manteigosa, *brown blight* e *coffee berry disease* (SUTTON, 1992). Porém, apenas CBD, amplamente disseminada no continente africano, é relatada causando prejuízos aos produtores.

No Brasil, diversos autores têm relatado a ocorrência de doenças associadas a *Colletotrichum* sp., como: antracnose, seca-de-ramos, queda-de-frutos, seca-de-

frutos, mancha-manteigosa (FIGUEIREDO & MARIOTTO, 1978; VAN DER GRAFF, 1979; AVILES et al., 1981; ALMEIDA et al., 1985; DORIZZOTO, 1992; BRAGANÇA et al., 1993; NECHET, 1999; FILHO & PARADELA, 2001). Até o momento, a identificação dos isolados tem apontado como espécie predominante no Brasil *C. gloesporioides* Penz.

A comprovação da patogenicidade de *Colletotrichum* sp. ao cafeeiro ainda é objeto de estudo, visto que os sintomas associados ao fungo são constantemente atribuídos a causas fisiológicas (GUTIERREZ, 1954; FIGUEIREDO & MARIOTTO, 1978; AVILES et al., 1981; ALMEIDA et al., 1985; BRAGANÇA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 1997); desnutrição da planta, em ramos de alta carga, visível nos momentos críticos do ciclo vegetativo (BITANCOURT, 1958a); e condições climáticas (VARGAS & GONZALEZ, 1972; MANSK & MATIELLO, 1977). Estudos têm relatado a freqüente interação de *Colletotrichum* spp. com diferentes hospedeiros, apresentando-se em estágio de latência ou, ainda, em associação endofítica (SINCLAIR & CERKAUSKA, 1996; RAJESWARI et al., 1997; SAIKKONEN et al., 1998; LATUNDE et al., 1999; ZAITLIN et al., 2000; FERNANDES, 2000; FREEMAN et al., 2001; FREIRE & BEZERRA, 2001; BUSSABAN et al., 2001; KLINGELFUSS & YORINORI, 2001; CANNON & SIMMONS, 2002).

Latência de *Colletotrichum* spp. já foi observada a partir dos apressórios formados na superfície do hospedeiro mesmo sem a penetração do fungo, o que explica como muitas destas espécies persistem sobre tecidos de plantas (BINYAMINI & SCHIFFMANN, 1972; VERHOEFF, 1974; BERGSTROM & NICHOLSON, 1999).

Microrganismos endofíticos têm sido encontrados em tecidos de numerosas espécies vegetais, colonizando-os de forma ativa, local ou sistêmica, ou, ainda, em estado latente. Esse tipo de interação parece ocorrer na maioria das espécies vegetais, senão em todas elas. O caráter endofítico é determinado segundo os isolamentos realizados a partir de tecidos vegetais superficialmente estéreis, ou seja, os processos de esterilização superficial delimitam o *habitat* endofítico (SAKIYAMA et al., 2001). Teoricamente, todo contaminante da superfície do material vegetal deve ser eliminado no processo de esterilização superficial sem afetar a microbiota endofítica. Os agentes sanificantes podem penetrar no tecido vegetal e, por isso, os

procedimentos devem assegurar a redução dessa penetração e garantir uma esterilização superficial eficaz (HALLMANN et al., 1997).

A eficiência do processo de esterilização superficial deve ser monitorada em cada amostra do material vegetal. Os controles da esterilização superficial podem ser: incubação do material vegetal em caldo nutriente (GAGNÉ et al., 1987), plaqueamento em meio nutriente de alíquotas da última água de lavagem (McINROY & KLOPPER, 1995) ou pressionamento do material superficialmente estéril na superfície de um meio nutriente (MUSSON et al., 1995).

A falta de estudos da caracterização de isolados de *Colletotrichum* sp. que incidem sobre o cafeeiro no Brasil e dos danos diretos que este fungo pode causar geram dúvidas a respeito de sua patogenicidade, visto que o patógeno é considerado um parasita secundário que está presente nos tecidos do hospedeiro devido a condições adversas. Entretanto, os relatos de ataques do fungo parecem ser constantes em condições de campo. Há falta de informações sobre em que condições *Colletotrichum* sp., notadamente *C. gloeosporioides*, pode se manifestar e causar prejuízos, além da falta de conhecimento sobre os sintomas que podem ser associados ao patógeno, o que muitas vezes leva a diagnósticos errados.

Diante da escassez de informações a respeito da patogenicidade de *Colletotrichum* sp. ao cafeeiro no Brasil, realizou-se o este trabalho com o objetivo de estudar a patogenicidade deste fungo ao cafeeiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro relato de ocorrência de *Colletotrichum* em cafeeiro foi feito por NOACK (1901), no Brasil, o qual denominou *C. coffeanum* Noack. O patógeno foi descrito com base em manchas existentes nas folhas, em associação ou não com cercóspora, em ramos de cafeeiros nos estados de São Paulo e do Rio de Janeiro. Acérvulos foram encontrados, em manchas salientes, nas pontas dos ramos secos e em ramos vegetativos. Em suas anotações, Noack declarou haver pronunciada semelhança com o fungo *Gloesporium coffeanum*, que havia sido descrito sobre folhas de cafeeiro, nas Ilhas Reunião, no Oceano Índico, em 1897, por Delacroix. Posteriormente, os gêneros *Gloesporium* e *Vermicularia* foram reclassificados e incorporados ao gênero *Colletotrichum* (VON ARX, 1957; SUTTON, 1980).

A uma grave doença observada afetando *Coffea arábica*, no Quênia, McDONALD, em 1922, denominou *Coffee Berry Disease* (CBD). A doença, causada pelo fungo *C. coffeanum* (McDONALD, 1926; McDONALD, 1929), posteriormente, se disseminou para: África do Sul, Angola, Congo, Camarões, Etiópia, Ilhas Maurício, Malawi, Moçambique, República da África Central, Ruanda, Tanzânia, Uganda, Zaire e Zâmbia (HOLLIDAY, 1980).

Fungos do gênero *Colletotrichum* ocorrem como saprófitas em todas as regiões do mundo onde se cultiva o cafeeiro, afetando principalmente as partes externas da casca dos ramos (NUTMAN, 1970). Além desse caráter saprofítico, o fungo foi constatado causando antracnose, seca de ramos e manchas em folhas e em frutos maduros (BERRY & ABREGO, 1953; BITANCOURT, 1956; VIEGAS,



1957; BITANCOURT, 1958; BITANCOURT, 1958a; BIANCHINI, 1960; SCHIEBER et al., 1970).

Segundo GUTIERREZ (1954), a condição conhecida como *die-back*, desfolhação e morte descendente de ramos, é um problema de menor importância, a não ser que o dano resulte da interação de fatores patológicos e fisiológicos. Os sintomas associados à *die-back* são manchas foliares escuras irregulares, que aparecem primeiro nas bordas foliares, causando queda das folhas, seguida pela seca dos ramos laterais e terminais e infecção de frutos.

A mancha-manteigosa foi descrita inicialmente em *C. arabica* (WELLMAN, 1957), na Costa Rica, como uma doença de natureza virótica, porém sem demonstração de transmissão. A mancha-manteigosa tem como sintomas manchas circulares típicas não-necróticas nas folhas, de coloração verde-pálida a amarela, medindo de 2 a 6 mm de diâmetro, com ligeira depressão no centro. Quando há muitas lesões por folha, ocorre encrespamento, flacidez e queda prematura das folhas jovens. Nos frutos, as lesões iniciais são menores e igualmente sem necrose, posteriormente surgem áreas necróticas, levando à queda deles ( SHAW, 1968). A presença de manchas nas folhas de cafeeiros com cerca de 2 a 3 mm de diâmetro e coloração verde-pálida, às vezes muito numerosas e em parte coalescentes, visíveis somente na face superior do limbo, foi relatada por BITANCOURT (1958). A doença havia sido descrita por WELLMAN, em 1957, na Costa Rica, porém BITANCOURT (1958) a observou pela primeira vez em 1938, em folhas de cafeeiro de uma fazenda da Alta Paulista, considerando a doença no Brasil como pouco importante.

A incidência de *Colletotrichum* sp. em frutos cereja foi relatada por HOCKING (1966), o qual denominou *brown blight* a doença causada, sendo inicialmente atribuída a *Colletotrichum coffeanum* Noack. O fungo foi isolado a partir de material oriundo de regiões onde não foi constatada a presença do agente causal da CBD, no Leste Africano. A sintomatologia consiste em lesões escuras deprimidas em frutos maduros ou em processo de maturação, não ocorrendo em frutos verdes.

Segundo HINDORF (1975), as doenças conhecidas como antracnose, *die-back*, *elgon die-back* e *brown blight* são causadas por *C. gloesporioides* Penz, visto que peritécios de *Glomerella cingulata* podem ser encontrados no tecido morto infectado pelo patógeno.

Estudos taxonômicos sobre o gênero *Colletotrichum*, reunindo os diversos tipos desse gênero como sinônimos, foram feitos por VON ARX (1957). Dos isolamentos provenientes da forma perfeita, *G. cingulata*, todos constituíram o tipo coletivo *C. gloesporioides* Penz. Entre eles está o tipo descrito originalmente por Noack como *C. coffeanum*.

Vários autores esforçaram-se para separar as estirpes patogênicas e não-patogênicas de *C. coffeanum* em cultura pura (McDONALD, 1926; RAYNER, 1948; RAYNER 1952; MASSABA & WALLER, 1992), descrevendo caracteres morfológicos diferenciadores das estirpes não-patogênicas, principalmente a formação de micélio aéreo de cor cinza e de conídios formados diretamente nas hifas. RAYNER (1952) designou a forma patogênica variante *virulans*, tendo como característica o lento crescimento em meio de cultura em relação às formas não-patogênicas. Segundo HOCKING et al. (1966), a variante *virulans* se distingue das outras pela capacidade de infectar frutos verdes de café.

Isolamentos em meio de cultura extrato de malte-ágar (MEA) 2%, a partir de frutos verdes e cerejas infectadas, bem como de ramos que apresentavam a casca necrosada, de diferentes regiões do Quênia, situadas acima de 1.800 m, foram feitos por GIBBS (1969), sendo obtidas culturas puras da variante *virulans* e também de outras estirpes não-patogênicas de *Colletotrichum*. Os isolamentos foram divididos em quatro grupos de distinção morfológica: *ccm* - de crescimento rápido, micélio aéreo claro, com conídios crescendo diretamente a partir das hifas; *cca* - de crescimento rápido, micélio aéreo claro, com conídios curtos e presença de acérvulos; *ccp* - de crescimento lento, micélio aéreo rosado, com conídios crescendo diretamente nas hifas; *CBD* ou variante *virulans* - de crescimento lento, micélio de coloração cinza-escura a verde-oliva, conídios formados diretamente em hifas, raras vezes com setas.

Posteriormente, HINDORF (1972, 1973) avaliou as características, em meio de cultura extrato de malte-ágar 2%, de isolados de *Colletotrichum* oriundos de cafeeiros do Quênia e propôs a seguinte reclassificação:

1. *C. coffeanum* Noack – corresponde à forma *virulans*, de RAYNER (1952), e à forma *CBD*, de GIBBS (1969). Características adicionais: a forma perfeita, *G. cingulata*, nunca foi observada em cultura pura; os fungos são patogênicos a frutos verdes de café e encontram-se presentes nos frutos em todos os estádios, nas flores, nos botões florais, nas folhas e nos ramos.

2. *C. acutatum* Simmonds – corresponde à forma *ccp* de GIBBS (1969). Características adicionais: conídios fusiformes, com base arredondada e extremidade afilada, produzidos em hifas e também em acérvulos pretos; distribuído por toda a parte aérea do cafeeiro.
3. *C. gloesporioides* Penz. – forma micélio branco e corresponde à forma *ccm*, de GIBBS (1969). Características adicionais: conídios cilíndricos com extremidades arredondadas, produzidos em hifas e em acérvulos; capacidade de produzir peritécios da forma perfeita, *G. cingulata*; e comum em ramos e folhas, ocasionalmente em frutos secos.
4. *C. gloesporioides* Penz. – forma micélio esverdeado e foi isolado pela primeira vez por VERMEULEN, em 1970. Características: micélio inicialmente branco, tornando-se cinza-esverdeado e, mais tarde, marrom; conídios cilíndricos arredondados nas duas extremidades, às vezes recurvados, e de tamanho maior que os das três formas precedentes; isolado de ascósporos de *G. cingulata*; e apresenta crescimento lento em cultura.
5. *C. gloesporioides* Penz. – corresponde à forma *cca* de GIBBS (1969). Características adicionais: micélio escuro, escasso; conídios de tamanho maior que os da forma precedente, truncados na base e de extremidades afiladas; comumente encontrados apenas nos ramos de cafeeiros.
6. *G. cingulata* (Stonem.) Spauld e Schrenk. – o micélio é ocasionalmente branco e estéril; forma peritécios em cultura, sendo restrito a ramos e folhas; tem crescimento rápido em cultura.

Dessa maneira, HINDORF (1973) separou a população de *Colletotrichum*, em café, em três espécies distintas: *C. coffeanum* Noack, cujas características diferenciais são a elevada especificidade quanto ao hospedeiro e a incapacidade de produzir a forma perfeita *in vitro*; *C. acutatum* Simmonds, que produz conídios de tamanho e forma bem diferenciados; e *C. gloesporioides* Penz., de enorme variabilidade.

A partir dessa detalhada descrição de HINDORF (1973), a literatura passou a relatar o agente causal da CBD como *C. coffeanum* Noack *sensu* Hindorf.

A ocorrência da estirpe patogênica de *C. coffeanum* é relativamente baixa em proporção ao complexo da população de *Colletotrichum* em ramos de cafeeiro (GIBBS, 1969; VERMEULEN, 1970; HINDORF, 1972; HINDORF, 1973).

Segundo HINDORF (1975), *C. gloesporioides*, está presente em todos os locais onde se cultiva o cafeeiro, causando *die-back*, antracnose e queima-de-frutos. A espécie original, *C. coffeanum* Noack, foi descrita como *C. gloesporioides*, que tem como forma perfeita *G. cingulata* (Stonem.) Spaud & Schrenk. Investigações recentes na microflora de *Coffea*, no Quênia, mostraram diferenças dentro da população de *Colletotrichum* no cafeeiro (MASSABA & WALER, 1992).

Diferenças significativas foram observadas na morfologia, na genética e também na epidemiologia. HINDORF (1975) propôs a nomenclatura *C. coffeanum* Noack para denominar somente os fungos que causam a CBD (*Coffee Berry Disease*). Esse patógeno não desenvolve o estágio perfeito *in vitro* e não apresenta hospedeiro alternativo. Segundo SUTTON (1992), é incorreta a identificação dessa espécie como um táxon específico para o gênero *Coffea*. Entretanto, *C. coffeanum*, empregado para designar vários isolados deste hospedeiro, é um sinônimo de *C. gloesporioides*. O isolado virulento causador da CBD é distinto e necessita ser descrito formalmente como uma espécie.

O fungo é encontrado atacando todos os estádios da cultura, desde a floração até frutos maduros, e ocasionalmente folhas, mas as maiores perdas ocorrem com a infecção de bagas verdes. Podem ser observados dois sintomas nas bagas: lesões ativas (NUTMAN, 1970) e lesões tipo “sarna”, ou inativas (MULLER, 1970).

*Coffee berry disease* não ocorre onde a pressão de seleção para o surgimento da doença é alta, como seria esperado se fosse esta doença causada por uma forma patogênica de *C. gloesporioides*. Não há relatos de ocorrência da CBD na América do Sul, onde *C. arabica* é extensivamente cultivado, e somente foi disseminada para o centro de diversidade de *C. arabica*, nas regiões montanhosas da Etiópia, por volta de 1970 (VAN DER GRAFF, 1981).

Baseado em caracteres de morfologia de colônia, patogenicidade e características bioquímicas, WALLER et al. (1993) propuseram a espécie *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge como o agente causal da CBD. Os autores afirmaram que a denominação *C. coffeanum* não deve ser usada, visto que representa uma sinonímia de *C. gloesporioides*, e *C. coffeanum* var. *virulans*, proposta por RAYNER (1952), não é aceita para publicação.

As seguintes características diferenciando as duas espécies foram propostas por WALLER et al. (1993):

*C. kahawae* Waller & Bridge

Crescimento lento em meio extrato de malte-ágar 2% (2-4 mm/dia a 25 °C), micélio abundante, de coloração cinza-escuro a verde-oliva, ausência de acérvulo, esporulação sobre as hifas e conídios retos, cilíndricos, asseptados, variando de 12,5 a 19 x 4 µm. Não utiliza citrato ou tartarato como única fonte de carbono. Patogênico a frutos verdes jovens e hipocótilo de cafeeiro (*Coffea arabica*), suscetível, causando lesão de antracnose deprimida.

*C. gloesporioides* Penz.

Rápido crescimento em meio extrato de malte-ágar 2% (3-6 mm/dia a 25 °C), micélio abundante, de coloração branca a cinza-pálida, esporulação em acérvulos ou diretamente sobre hifas. Pode utilizar citrato ou tartarato como única fonte de carbono. Não-patogênico a frutos verdes e hipocótilos.

Recentemente, análises moleculares, incluindo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), DNA ribossomal e mitocondrial, RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) e seqüenciamento de regiões conservadas, denominadas ITS, do rDNA (ITS 1 e ITS 2) têm sido utilizadas para elucidar a variação molecular de isolados de *C. gloesporioides* e outras espécies (SREENIVASAPRASAD et al., 1993; BEYNON et al. 1995; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; AGWANDA et al., 1997; FREEMAN, 2000; LOPEZ, 2001).

Paralelamente à descrição da nova espécie por WALLER et al. (1993), estudos envolvendo o seqüenciamento da região ITS-1 do rDNA, com o objetivo de elucidar a variação molecular de isolados de *Colletotrichum* que infectam cafeeiro, foram conduzidos por SREENIVASAPRASAD et al. (1993), confirmando a estreita relação genética, 98,8% de similaridade, de *C. kahawae* com espécies do grupo *C. gloesporioides*. Entretanto, os autores não sugeriram que essa similaridade genética estivesse diretamente ligada a patogenicidade.

Baseando-se nas seqüências ITS-1 e ITS-2 do rDNA, SREENIVASAPRASAD et al. (1996) classificaram 93 isolados de *Colletotrichum* em 18 espécies, estas pertencentes a seis grupos. Esses grupos não foram congruentes com as categorias de espécie baseadas na morfologia de esporos, e a evidência molecular sugere que a caracterização de algumas categorias deve ser revista, assim *C. kahawae* deveria ser incluído nos grupos de *C. gloesporioides*, em nível subespecífico.

As condições em que ocorrem a germinação e a infecção foram estudadas por diversos autores: RAYNER (1952), HOCKING (1965), HOCKING et al. (1967),

NUTMAN (1970), VERMEULEN (1970), MULINGE (1970), STEINER (1972), HINDORF (1973) e outros. Os conídios são liberados dos acérvulos, onde estão envolvidos por uma substância mucilaginosa, normalmente pela ação da água das chuvas.

O processo de infecção é ajudado pela presença de várias enzimas produzidas pelo fungo (cutinases e celulases, pectinases e poligalacturonases) (MENDGEN & DEISING, 1993; BERGSTROM & NICHOLSON, 1999). De acordo com estudos histopatológicos realizados por CHAU & ALVAREZ (1983), na interação *C. gloeosporioides* e frutos de mamão sem fermentos, a hifa penetrou a cutícula e a infecção originou-se a partir de um apressório observado três a quatro dias após a inoculação.

Após os eventos de pré-penetração, várias estratégias são utilizadas por *Colletotrichum* spp. na colonização dos tecidos, de acordo com os processos de infecção em cada hospedeiro.

A germinação de conídios de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro somente ocorre em presença de água. Forma-se um septo nos conídios, que normalmente são unicelulares, e cada uma das células emite um ou dois tubos germinativos. Na extremidade desses, sobre a cutícula dos frutos verdes, desenvolve-se um apressório, de parede espessa e coloração escura (NUTMAN, 1970).

A temperatura ótima para a germinação dos esporos está próxima de 22 °C, podendo variar de 17 a 28 °C, sendo a germinação completamente inibida abaixo de 14 °C e acima de 30 °C. A temperatura ótima para o crescimento micelial está em torno de 25 °C (NUTMAN & ROBERTS, 1960; MULLER, 1970; VERMEULEN, 1970; FEITOSA et al., 1977; PEREIRA & CHAVES, 1978).

A umidade afeta diretamente a germinação e a capacidade de causar infecção dos esporos. NUTMAN & ROBERTS (1960), em experimentos com frutos inoculados e incubados em câmaras com umidade controlada, obtiveram baixo percentual de germinação, com pequeno número de lesões em umidade abaixo de 100%. Segundo os autores, isso ocorreu porque os frutos perdiam a turgescência. A infecção pode se dar na ausência de água líquida se a atmosfera estiver saturada.

Inoculando-se frutos verdes de café com suspensão concentrada de conídios, a percentagem de germinação foi baixa, e o número de lesões resultantes também. O ótimo de germinação foi obtido com concentrações entre  $10^5$  e  $10^6$  conídios por mL. (NUTMAN & ROBERTS, 1970; FEITOSA et al., 1977). Isso pode ser atribuído a

um possível inibidor da germinação, como ocorre com uredospóros de *Hemileia vastatrix* (MUSUMECI et al., 1974).

A duração do período de incubação, até o aparecimento de lesões, está geralmente entre 5 e 30 dias, sendo comumente de oito dias. Sobre as flores, o período para a penetração do patógeno é de cerca de 2,5 horas, enquanto o dobro do tempo é necessário para o ingresso em frutos verdes (PEREIRA & CHAVES, 1978).

Avaliando o crescimento micelial e a capacidade de esporulação de oito isolados de *Colletotrichum* sp. em diferentes meios de cultura, NECHET (1999) observou que o meio batata-dextrose-ágar 2% proporcionou maior produção de micélio, seguido pelos meios extrato de malte-ágar 2%, descrito na literatura para caracterização *in vitro* de isolados de *Colletotrichum*, e *Glucose Yeast-Ágar* (GYA), que é recomendado para a produção de micélio visando à extração de DNA (SREENIVASAPRASAD et al., 1993; BEYNON et al., 1995).

Em testes de patogenicidade, os isolados de *Colletotrichum* obtidos por FERNANDES (2000) apenas causaram lesões nos frutos verdes injuriados mecanicamente, variando a incidência de 12,5 a 37,5%, não sendo verificadas lesões nos testes realizados com os frutos no estágio cereja. O isolamento de fungos em frutos verdes e cereja em três municípios de Minas Gerais apontaram as seguintes espécies como predominantemente associadas aos frutos: *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora coffeicola* e *Aspergillus* spp., sendo dos isolados de *Colletotrichum* as maiores médias de incidência, o que sugere ser este patógeno capaz de colonizar os frutos do cafeeiro nos primeiros estádios de desenvolvimento e vindo a manter-se viável no estágio cereja.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa, nos laboratórios de Proteção de Plantas, no Departamento de Fitopatologia, e de Biotecnologia do Cafeeiro, no BIOAGRO.

#### 3.1. Obtenção de isolados de *Colletotrichum* sp. de café

Os isolados de *Colletotrichum* sp. foram obtidos a partir de folhas, de ramos, bem como de frutos verdes, cereja e secos de café, com sintomas de escurecimento, provenientes de quatro estados: Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Espírito Santo (Tabela 1A).

O isolamento foi realizado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) 2% mais o antibiótico cloranfenicol, na concentração de 0,02%. A fim de determinar a presença de microrganismo, secções do tecido doente foram superficialmente lavadas em água corrente e detergente neutro e assepticamente desinfestadas com álcool 70%, por 30 segundos, e em seguida com hipoclorito de sódio 2%, por um minuto. Posteriormente, foram lavadas com água estéril, transferidas para o meio de cultura e incubadas, à temperatura de 25 °C. Após a constatação da presença de *Colletotrichum* sp., as colônias foram repicadas e purificadas, sendo então transferidas para tubo contendo meio batata-dextrose-ágar 2%.



### **3.2. Obtenção e manutenção de culturas monospóricas**

A partir de colônias puras de *Colletotrichum* cultivadas em meio de cultura BDA, foi preparada uma suspensão de esporos pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada em placas de Petri. Essa suspensão foi vertida em placa de Petri contendo meio ágar-água 2%.

Após 24 horas, sob microscópio estereoscópico, em capela de fluxo laminar, foram transferidos, individualmente, esporos germinados para tubos contendo meio BDA 2%. As placas foram incubadas à temperatura de 22 °C, por sete dias, no escuro.

Para a manutenção dos isolados de *Colletotrichum* sp., foi utilizada a técnica de armazenamento em sílica-gel, seguindo-se o método de PERKINS (1962), com adaptações. Em frascos de vidro transparente, com capacidade para 30 mL, foi colocado, na metade de seu volume, sílica-gel de diâmetro de 1 a 4 mm. Os frascos, então, foram tampados com papel-alumínio e esterilizados em estufas de ar seco a 140 °C, por três horas. Papel-filtro foi cortado na medida do diâmetro dos frascos e em fragmentos de 4 mm, sendo estocados separadamente em frascos de vidro com tampa de metal e posteriormente esterilizados em autoclave a 127 °C, por 20 minutos. Foi preparada e esterilizada uma solução de leite em pó desnatado a 10% .

Assepticamente, em câmara de fluxo laminar, nos frascos com a sílica, previamente esterilizados, foram acondicionados dois fragmentos do papel-filtro. A cada tubo dos isolados monospóricos foram adicionados 10 mL da solução de leite desnatado a 10%. Essa suspensão de esporos foi vertida em placa estéril e nela colocados os fragmentos de 4 mm de papel-filtro, que embeberam a suspensão. Esses fragmentos foram, então, transferidos para os frascos, sobre as duas camadas de papel-filtro, e fechados com o batoque e a tampa, previamente esterilizados em álcool, sendo armazenados em geladeira, a 4 °C.

### **3.3. Teste de patogenicidade dos isolados**

#### **3.3.1. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a frutos verdes**

Inicialmente, ramos contendo três rosetas de frutos verdes (3 - 4 mm) do cultivar Catuaí foram coletados no campo, levados para o laboratório, lavados em

água corrente e mantidos, por cinco minutos, em solução de hipoclorito de sódio (produto comercial água sanitária Globo<sup>®</sup>), na diluição 1/10, e novamente lavados em água corrente. Os ramos foram colocados em recipiente aberto e mantidos à temperatura ambiente (20-25 °C), por dois dias. Após esse período, os ramos que apresentaram lesões no pedúnculo foram descartados e aqueles aparentemente saudáveis, acondicionados em gerbox, contendo espuma, a fim de se manter a câmara úmida.

O experimento foi conduzido em câmara climatizada a 20±2 °C, com fotoperíodo de 12 horas, seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo 180 tratamentos com três repetições, havendo em cada repetição dois ramos com três rosetas de frutos.

Este experimento constou da inoculação dos isolados obtidos a partir das culturas monospóricas descritas no item 3.2, nos ramos com e sem ferimentos. Os ramos foram, então, repicados e colocados em placas contendo meio extrato de malte-ágar 2%. Os frutos foram inoculados com suspensão de conídios, adicionada de 0,01% de Tween-20, padronizada para 2x10<sup>6</sup> conídios/mL, empregando-se atomizador manual De Vilbiss n. 15. A testemunha foi atomizada com água destilada esterilizada. Avaliou-se a incidência (percentagem de frutos com sintomas de necrose) a partir do terceiro dia após a inoculação.

### **3.3.2. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a ponta de ramos**

O experimento relatado no item 3.3.1 foi repetido em épocas diferentes, porém com algumas modificações na metodologia, a fim de se obter maior controle sobre a testemunha. Dos 180 isolados monospóricos, 30 foram escolhidos (Tabela 2A), levando-se em conta critérios de distribuição geográfica e valores de incidência obtida no item anterior.

Neste ensaio, utilizou-se somente a parte apical dos ramos em franco desenvolvimento. Os ramos foram lavados, conforme o item 3.3.1, porém mantidos por cinco dias em condição ambiente. Após esse período, aqueles que apresentaram lesões no pedúnculo foram descartados. A parte do ramo que sofreu o corte foi superficialmente submersa em pasta de cobre (20% de cobre), a fim de se evitar necrose no ponto de corte. Os ramos que apresentaram lesões no pedúnculo foram

descartados e aqueles aparentemente saudáveis, acondicionados em gerbox, contendo espuma, para se manter a câmara úmida.

O experimento foi conduzido em câmara climatizada a  $20\pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 horas, seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo 30 tratamentos com três repetições e em cada uma delas dois ramos com três rosetas de frutos cada um.

Este experimento constou da inoculação dos isolados, obtidos a partir das culturas monospóricas citadas no item 3.2, nos ramos com e sem ferimentos, os quais foram repicados e colocados em placas contendo meio extrato de malte-ágar 2%. Os frutos foram inoculados com suspensão de conídios, adicionada de 0,01% de Tween-20, padronizada para  $2 \times 10^6$  conídios/mL, empregando-se atomizador manual De Vilbiss n. 15. A testemunha foi atomizada com água destilada esterilizada. Foi avaliada a incidência (percentagem de frutos com sintomas de necrose) a partir do terceiro dia após a inoculação.

### **3.3.3. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a plântulas de cafeeiro**

Neste ensaio, adotou-se a metodologia utilizada por WALLER et al. (1993), que consiste na inoculação de hipocótilos no estágio “palito de fósforo”, previamente formados pela germinação das sementes de café do cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, semeadas em areia esterilizada (brometo de metila 80 cc/m<sup>3</sup>), em bandejas plásticas.

Os hipocótilos foram, então, inoculados por meio de uma suspensão de conídios na concentração  $10^4$  esporos/mL, obtidos de culturas de *Colletotrichum* sp. Os testes foram realizados em plantas sem ferimentos e com ferimentos, utilizando-se para provocar esses ferimentos escova com cerdas de latão. Para a inoculação, foi preparada uma suspensão de conídios adicionada de 0,01% de Tween-20, empregando-se atomizador De Vilbiss n. 15.

Foram utilizados os trinta isolados escolhidos para o experimento do item 3.3.2. Para cada tratamento (isolado do fungo), utilizaram-se três repetições, sendo cada uma delas constituída de duas plantas úteis. O tratamento-testemunha foi pulverizado com água estéril. A avaliação foi realizada trinta dias após a inoculação, sendo anotada a incidência da doença.

### 3.4. Processo de esterilização superficial de ramos e frutos verdes de café

Foram coletados no campo ramos em desenvolvimento e frutos do cultivar Catuaí Vermelho. De cada planta foram retiradas dez amostras. A esterilização superficial dos ramos foi feita de acordo com o método descrito por SAKIYAMA et al. (2001), com algumas modificações.

As amostras individuais foram pré-lavadas, com desinfetante comercial Sampic<sup>®</sup> 5%, e enxaguadas. Todos os passos seguintes foram realizados em condições assépticas. Às amostras então acondicionadas em Erlemyers foram adicionados 300 mL de água estéril, sendo colocadas em shaker rotatório por 15 minutos, a 150 rpm. Posteriormente, da mesma forma, foram lavadas em solução-tampão fosfato (0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0). As amostras foram esterilizadas superficialmente por meio de imersão em álcool 70%, por um minuto, e em seguida, por cinco minutos, em shaker rotatório, em solução de cloro ativo 5% (produto comercial Genclor<sup>®</sup>, pH 5,0-6,0), contendo 0,01% de Tween 80. Imediatamente após as amostras foram novamente imersas, por 15 minutos, com o tampão fosfato 0,05 mol.L<sup>-1</sup>. As etapas de imersão em álcool, hipoclorito e tampão foram repetidas mais uma vez, porém, na segunda etapa do cloro ativo 5%, o tempo foi reduzido para três minutos. Por fim, as amostras foram enxaguadas em água destilada estéril. Para aferir a esterilização superficial das amostras, foram incubadas alíquotas de 200 µL da água da última lavagem em placas contendo meio batata-dextrose-ágar 2%.

Após o processo de esterilização superficial, ramos e frutos foram, um a um, levemente pressionados em placas contendo meio batata-dextrose-ágar 2% e, então, incubadas por 72 horas. A fim de se verificar a eficiência do processo de esterilização superficial, após esse período, foi avaliado o crescimento de microrganismos. Os ramos e frutos foram incubados individualmente por dez dias, até a avaliação, em placa estéril contendo papel-filtro embebido em água igualmente estéril, e mantidos em fotoperíodo de 12 horas, a 20±2 °C.

### **3.5. Método químico para acelerar a infecção latente (assintomática) por *Colletotrichum* em cafeeiro**

Foram coletados no campo ramos em desenvolvimento e frutos de plantas do cultivar Catuaí Vermelho. As amostras foram esterilizadas conforme item 3.4. Após a esterilização superficial, elas foram submersas em concentrações crescentes do herbicida Paraquat (1-1'-dimetil 4-4' - bipyridílio dicloreto). Após um minuto, as amostras foram transferidas para placas estéreis, contendo papel-filtro embebido em água igualmente estéril, e mantidas em fotoperíodo de 12 horas, a  $20 \pm 2$  °C. Cada tratamento constou de três repetições, com dez amostras cada uma. Foram realizados três controles. As avaliações da incidência foram realizadas diariamente, até o 15º dia. Os tratamentos aplicados foram os seguintes: T1 - amostras do campo incubadas sem esterilização; T2 - amostras esterilizadas superficialmente; T3 - amostras do campo tratadas com Paraquat 1.000 ppm; T4 - amostras esterilizadas superficialmente e tratadas com Paraquat 250 ppm; T5 - amostras esterilizadas superficialmente e tratadas com Paraquat 500 ppm; T6 - amostras esterilizadas superficialmente e tratadas com Paraquat 1.000 ppm; T7 - amostras esterilizadas superficialmente e tratadas com Paraquat 1.500 ppm; e T8 - amostras esterilizadas superficialmente e tratadas com Paraquat 2.000 ppm.

### **3.6. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a cafeeiros (*Coffea arabica*) oriundos de cultura de tecido**

Trinta e duas plantas de cultura de tecido de *Coffea arabica*, desenvolvidas de embriões somáticos oriundos de calos embriogênicos induzidos em explantes foliares de cafeeiro, foram transferidas assepticamente para placas de Petri estéreis, contendo papel-filtro embebido em água igualmente estéril. Por cima do calo de cada planta foi adicionado algodão umedecido em água estéril, a fim de manter as plantas vivas. Foram utilizados três isolados, sendo cada tratamento constituído de quatro repetições. Os tratamentos com ferimento foram feitos com o auxílio de um dispositivo de 60 agulhas entomológicas. Para a inoculação, foi preparada uma suspensão de esporos adicionada de 0,01% de tween-20, a partir de culturas puras, obtidas conforme descrito no item 3.2, ajustada para a concentração de  $2,0 \times 10^6$  conídios/mL, e então inoculadas com o auxílio de De Vilbiss n. 15. A testemunha foi

atomizada com água estéril. Após a inoculação, as placas foram incubadas, em fotoperíodo de 12 horas, a  $20\pm 2$  °C. Foram feitas avaliações diariamente até 15 dias após inoculação.

Foram aplicados os seguintes tratamentos: T<sub>1</sub>- Testemunha sem ferimento; T<sub>2</sub> - Isolado Venda Nova do Imigrante, ES (168), sem ferimento; T<sub>3</sub> - Isolado Londrina, PR (96), sem ferimento; T<sub>4</sub> - Isolado Viçosa, MG (173), sem ferimento; T<sub>5</sub> - Testemunha com ferimento; T<sub>6</sub> - Isolado Venda Nova do Imigrante, ES (168), com ferimento; T<sub>7</sub> - Isolado Londrina, PR (96), com ferimento; T<sub>8</sub> - Isolado Viçosa, MG (173), com ferimento.

Após as avaliações, uma planta de cada tratamento foi escolhida e procedeu-se ao reisolamento do fungo. As plantas foram lavadas com desinfetante, produto comercial Sampic<sup>®</sup> 5%, levadas para câmara de fluxo laminar e lavadas em álcool 70% por um minuto, seguido da solução de cloro ativo 2%, por dois minutos, e plaqueamento em meio batata-dextrose-ágar 2%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Identificação de isolados de *Colletotrichum* sp.

Observando-se as características dos 180 isolados em meio de cultura extrato de malte-ágar (MEA) 2%, concluiu-se que todos pertencem à espécie *C. gloeosporioides* Penz. (SUTTON, 1992; WALLER et al., 1993). Os isolados apresentam como características morfológicas: micélio variando de coloração branca a cinza-pálida, crescimento rápido (5,1 mm 24h<sup>-1</sup>), presença de setas, conídios cilíndricos com extremidades arredondadas. A verificação de caracteres morfológicos em meio extrato de malte-ágar 2% é utilizada por vários autores (McDONALD, 1926; RAYNER, 1948; RAYNER, 1952; GIBBS, 1969; HINDORF, 1973; MASSABA & WALLER, 1992; WALLER et al., 1993) para separar as espécies de *Colletotrichum* que incidem em *C. arabica*. WALLER et al. (1993) distinguiram *C. gloeosporioides* da estirpe patogênica por esta apresentar rápido crescimento em meio extrato de malte-ágar 2% (3-6 mm 24h<sup>-1</sup> a 25 °C), micélio abundante de coloração branca a cinza-pálida, esporulação em acérvulos ou diretamente sobre hifas e da não-patogenicidade em frutos verdes e hipocótilos.

## 4.2. Teste de patogenicidade dos isolados

### 4.2.1. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a frutos verdes

Entre as 180 culturas inoculadas, houve diferença na incidência observada tanto nos ramos com ferimento como naqueles sem ferimento dez dias após a inoculação. Foi anotada incidência máxima de 69,5%, para o isolado 164, oriundo de Três Pontas, MG, do cultivar Catuaí Vermelho. Entretanto, a testemunha, atomizada com água estéril, também manifestou sintomas semelhantes tanto nos ramos sem ferimentos, com três rosetas de frutos, como naqueles com ferimentos (Figura 1).

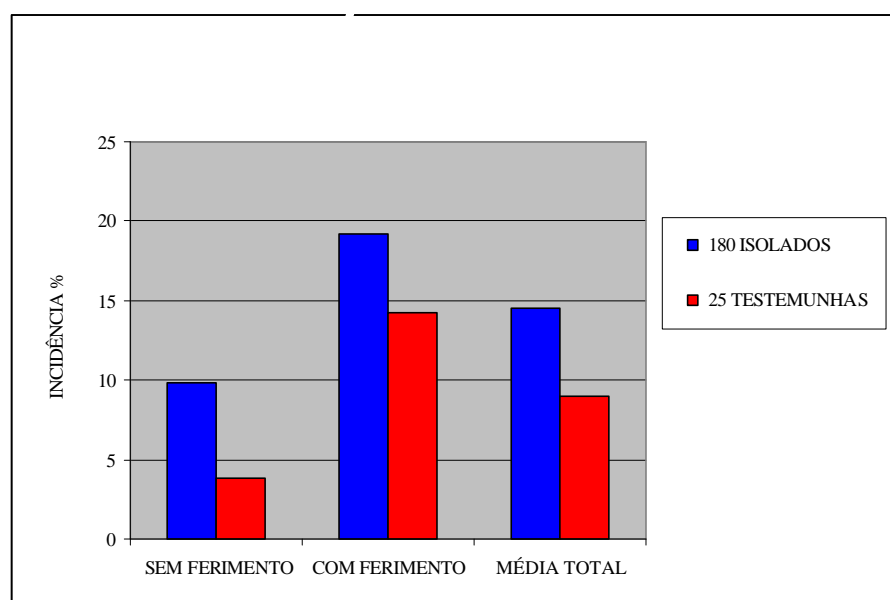


Figura 1 - Comparação entre os valores médios de incidência de *C. gloeosporioides* em cafeeiro, dez dias após inoculação dos 180 isolados e das testemunhas.

O aparecimento de sintomas e abundante esporulação de *C. gloeosporioides* na testemunha sugerem que a esterilização superficial dos tecidos não foi eficiente para eliminação deste fungo. Não foram encontrados relatos, em testes de patogenicidade no Brasil, de controles apresentando sintomatologia e esporulação do fungo; entretanto, em recente trabalho, NECHET (1999) afirmou serem necessários contínuos testes em frutos verdes e mudas, haja vista a grande variabilidade dos



resultados obtidos. Segundo VERMEULEN (1979), os frutos verdes e as zonas dos ramos onde se tenha formado a primeira felogene são infectados apenas pela espécie *C. kahawae* Waller & Bridge, apesar de as formas saprofíticas de *Colletotrichum* poderem colonizar esses órgãos do cafeeiro. Pode-se inferir, portanto, que a esporulação observada no controle corresponde à forma saprofítica de *C. gloeosporioides*, uma vez que não há relatos de *C. kahawae* no continente americano.

#### **4.2.2. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a ramos jovens**

Os tratamentos apresentaram sintomas de escurecimento dos tecidos e esporulação abundante de *C. gloeosporioides* oito dias após a inoculação. Quinze dias após a incubação em câmara úmida, todos os tratamentos, inclusive a testemunha (Figura 2), apresentaram 100% de incidência. Um fator que parece ter sido determinante para este resultado é a condição climática observada nos dez dias que antecederam a coleta do material no campo: precipitação acumulada de 234 mm, umidade relativa média de 90% e temperatura média de 22 °C, condição ideal para o desenvolvimento de doenças.

A utilização de ramos nos estádios iniciais de crescimento, a permanência dos ramos em temperatura ambiente por cinco dias e a utilização da pasta de cobre sobre a extremidade que foi cortada não teve nenhum efeito sobre os tratamentos, como era esperado. A metodologia adotada não foi eficaz, embora tenha sido adaptada a partir de ensaios de patogenicidade realizados no Brasil (FEITOSA, 1977; DORIZZOTTO, 1992; NECHET, 1999; FERNANDES, 2000), o que sugere que os ramos e frutos aqui utilizados, apesar de aparentemente saudáveis, já estavam associados de alguma forma ao *Colletotrichum*.

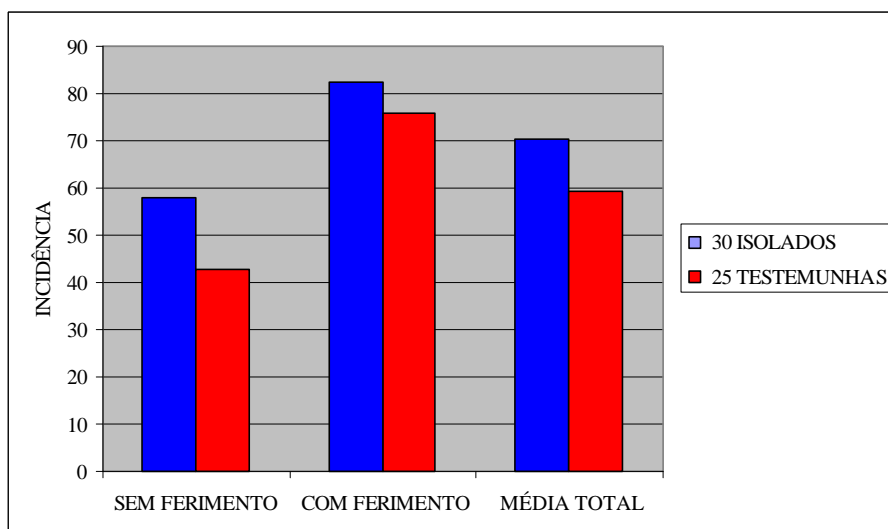


Figura 2 - Comparação entre os valores médios de incidência de *C. gloeosporioides* em cafeeiro, dez dias após a inoculação dos 30 isolados e das testemunhas.

#### 4.2.3. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a plântulas de cafeeiro

Não foi observado nos hipocótilos de cafeeiro, 25 dias após a incubação deles em câmara úmida, qualquer tipo de sintoma causado pelos 30 isolados utilizados. A testemunha também não apresentou qualquer tipo de reação. Isso sugere que o fungo, além de não apresentar patogenicidade aos hipocótilos, não é capaz de colonizar o endosperma de sementes de *Coffea arabica*.

RODRIGUES et al. (1991) afirmaram que as primeiras lesões sobre o hipocótilo podem aparecer ao fim de cinco a sete dias, logo após o período de inoculação, variando o período latente entre duas e três semanas, dependendo do grau de patogenicidade do isolado. GIELINK & VERMEULEN (1983) avaliaram a patogenicidade de isolados do Brasil em frutos verdes e hipocótilos, observando a incapacidade deles em reproduzir sintomas em ambos os casos. Estudos de WALLER et al. (1993) e BEYNON et al. (1995) mostraram que *C. kahawae* é capaz de causar lesão deprimida em hipocótilos sadios, sendo esta uma característica que distingue *C. gloeosporioides* de *C. acutatum*. Portanto, não há indícios da presença de *C. kahawae* no Brasil, haja vista a heterogeneidade das amostras que foram coletadas em diferentes áreas produtoras de café. Devido à sintomatologia característica da estirpe patogênica, testes de patogenicidade em hipocótilos foram

utilizados por VAN DER VOSSSEN et al. (1976) como método de seleção para melhoramento visando resistência a CBD.

### **4.3. Processo de esterilização superficial de ramos e frutos verdes de café**

Os ramos e frutos do cultivar Catuaí Vermelho apresentaram sintomas e abundante esporulação de *Colletotrichum* sp. seis dias após a incubação em câmara úmida. Os controles utilizados – plaqueamento da água de última lavagem e contato entre o ramo, após a esterilização, e o meio de cultura BDA 2% – não apresentaram qualquer crescimento fúngico, sendo somente observado em algumas placas o crescimento de bactérias. Há indícios de que *Colletotrichum* pode permanecer em estado latente nos tecidos de cafeeiro, ou ainda em associação endofítica com este, podendo assim colonizar os tecidos sem que sejam manifestados sintomas. Torna-se, então, inviável a utilização de plantas do campo como material para a realização de teste de patogenicidade, uma vez que o organismo já estava presente na maioria dos tecidos, mesmo sem apresentar sintomas.

Nos testes dos itens 4.2.1 e 4.2.2, a solução de hipoclorito utilizada foi diluída a partir de produto comercial água sanitária Globo<sup>®</sup>, não se levando em conta o teor de cloro ativo. O cloro, por ser um composto volátil, é mantido em produtos comerciais com pH em torno de 12, com a finalidade de se disponibilizar mais lentamente o cloro, para maior durabilidade do produto. Visando à sanitização do material vegetal, é necessária a redução do pH para a faixa de 5 a 6, tornando o cloro prontamente disponível, conforme observado por SAKIYAMA et al. (2001).

Há evidências de que *C. gloeosporioides* coloniza epifiticamente os ramos e frutos, uma vez que foi observado crescimento no meio batata-dextrose-ágar 2%, pressionado com as superfícies dos ramos e frutos. As placas inoculadas com alíquotas da água estéril, utilizada na pré-lavagem dos ramos e frutos, também apresentaram crescimento. ALMEIDA et al. (2002) relataram *C. gloeosporioides* colonizando endofiticamente folhas e hastes de *C. arabica*, a partir da desinfecção dos tecidos e incubação em meio extrato de malte-ágar 2% + cloranfenicol, entretanto não há descrição da metodologia utilizada para a desinfecção dos tecidos.

As superfícies das partes aéreas das plantas são normalmente colonizadas por grande número de microrganismos (MERCIER & LINDOW, 2000), sendo também observada a colonização epifítica de frutos de cafeeiro (FERNANDES, 2000; SILVA

et al., 2000; SAKIYAMA et al., 2001; PAULA et al., 2001). A colonização epifítica e endofítica por bactérias do gênero *Paenibacillus* e *Methylobacterium* em explantes de *C. arábica*, cultivar Catuaí Vermelho, foi demonstrada por SAKIYAMA (2001), utilizando técnicas de microscopia e imunológicas.

#### **4.4. Método químico para acelerar a infecção latente (assintomática) por *Colletotrichum* em cafeeiro**

Em todos os tratamentos em que as plantas foram submetidas à esterilização superficial, bem como a diferentes concentrações de paraquat, verificaram-se sintomas e abundante esporulação de *C. gloeosporioides*, seis dias após a incubação, sendo ineficientes na redução do período latente. A manifestação de sintomas e a redução do período latente foram observadas por RAJESWARI et al. (1997) em frutos de banana com infecção latente assintomática por *Colletotrichum musae*. Utilizando esterilização superficial e em seguida 500 ppm de paraquat, o autor verificou 73,38% de infecção latente por *C. musae*, cinco dias após o tratamento. Os controles, frutos sem herbicida em câmara úmida e frutos em condição ambiente, apresentaram, respectivamente, 6,71% e 0,05% de infecção latente, com período de incubação de 9 e 11 dias, na mesma ordem.

O tratamento que consistiu apenas na coleta de ramos no campo e incubação a temperatura ambiente não apresentou qualquer tipo de sintoma, permanecendo os ramos aparentemente saudáveis até 15 dias após a inoculação.

Há evidências de que *C. gloeosporioides* é um microrganismo oportunista que se manifesta externamente nos tecidos quando estes sofrem algum tipo de estresse. GUTIERREZ (1954) associou a condição conhecida como *die-back*, desfolhação e morte descendente de ramos, a um problema de menor importância, a menos que o dano resulte da interação de fatores patológicos e fisiológicos. A seca de ponteiros foi relacionada, por ZAMBOLIM et al. (1997), a condições climáticas anormais, estresse hídrico, alta carga e fatores bióticos, entre eles a ocorrência de *Colletotrichum* sp. Alguns autores (SMALL, 1921; BITANCOURT, 1956; BIANCHINI, 1960) consideraram que a causa da morte descendente é a falta de carboidratos após grandes colheitas e deficiências de alguns elementos específicos, como o nitrogênio. O aumento da incidência da seca de ramos no começo da granação, afetando principalmente os ramos com alta carga, foi associado ao

estresse, devido à desnutrição do cafeeiro, que se torna visível nos momentos críticos do ciclo vegetativo (BITANCOURT, 1958a).

#### **4.5. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a cafeeiros (*Coffea arabica*) oriundos de cultura de tecido**

As plantas oriundas de cultura de tecido conduzidas com e sem ferimentos não apresentaram qualquer manifestação de sintomas por um período superior a 15 dias após a inoculação. Pode-se inferir que estes isolados não têm relação de patogenicidade com cafeeiro; embora o fungo tenha sido recuperado a partir dos tecidos das plantas de cultura de tecido, com e sem ferimento, mesmo sem a manifestação de sintomas. As culturas reisoladas apresentaram as características típicas de cada isolado. Não houve crescimento a partir das folhas e dos caules picados do explante-controle. O reisolamento do fungo vem corroborar a hipótese de que *C. gloeosporioides*, em cafeeiro, é um oportunista que pode permanecer em estágio de latência nos tecidos ou, ainda, em associação endofítica, sem manifestar sintomas.

Alguns autores (BINYAMINI & SCHIFFMANN, 1972; VERHOEFF, 1974; BERGSTROM & NICHOLSON, 1999) relataram latência de *Colletotrichum* spp. observada a partir dos apressórios formados na superfície do hospedeiro, mesmo sem penetração do fungo, o que explica como muitas destas espécies persistem sobre tecidos de plantas. De acordo com os mesmos autores, a penetração pode ocorrer imediatamente a partir do apressório e o fungo permanecer em forma latente na epiderme das folhas. A permanência de fungos do gênero *Colletotrichum* em estado latente tem sido relatada em: soja (KLINGELFUSS & YORINORI, 2001), feijão (LATUNDE et al., 1999), banana (RAJESWARI et al., 1997), pêssego (ZAITLIN et al., 2000), morango (KING et al., 1997), abacate (PRUSKY et al., 1991), entre outras culturas.

Fungos do gênero *Colletotrichum* têm sido associados endofiticamente em diferentes culturas, como: *C. gloeosporioides* em soja (FREIRE & BEZERRA, 2001), *C. gloeosporioides* em castanheira (WANG et al., 2000), *C. acutataum* em morango (FREEMAN et al., 2001), *Colletotrichum* spp. em árvores da floresta tropical (GAMBOA & BAYMAN, 2001), *C. gloeosporioides* em citrus (ARAUJO et al., 2001) e *C. gloeosporioides* em tomate (LARRAM et al., 2001).

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Foi estudada a patogenicidade de *Colletotrichum* sp. ao cafeeiro em experimentos conduzidos em laboratório. Avaliou-se, inicialmente, a patogenicidade de 180 isolados monospóricos em ramos contendo três rosetas de frutos verdes com e sem ferimentos. Repetiu-se o ensaio, porém utilizando ramos em estádios iniciais de desenvolvimento e hipocótilos no estágio “palito de fósforo”. Posteriormente, procedeu-se à esterilização superficial dos ramos coletados no campo; ao uso de dessecante, visando à detecção de infecção latente; e ao teste de patogenicidade em sistemas caulinares oriundos de cultura de tecido. Todos os isolados coletados pertenciam à espécie *C. gloeosporioides* Penz.

Os testes em ramos com rosetas de frutos e em ramos nos estádios iniciais de desenvolvimento, com e sem ferimentos, apresentaram sintomas e abundante esporulação de *C. gloeosporioides* oito e dez dias após a inoculação, respectivamente, sendo o mesmo observado com a testemunha atomizada com água estéril. Nos testes em hipocótilos, não foram observados sintomas 25 dias após a inoculação.

O uso do paraquat promoveu a senescência dos tecidos, porém esporulação de *Colletotrichum* foi observada seis dias após a esterilização e incubação, não reduzindo, portanto, o período latente em comparação ao tratamento em que os ramos foram somente esterilizados. Os ramos que foram coletados no campo e diretamente incubados, sem nenhum tratamento, permaneceram verdes e aparentemente sadios até 15 dias após a incubação.

Os testes em plantas de cultura de tecido de cafeeiro (*C. arabica*) não manifestaram sintomas, com os três isolados atomizados com e sem ferimentos, 15 dias após a inoculação. Após esse período, as plantas foram desinfestadas superficialmente e o fungo reisolado, em meio batata-dextrose-ágar 2%, apresentando as características típicas de *C. gloeosporioides*. Não houve crescimento a partir das folhas e dos caules picados do explante-controle.

Esses resultados sugerem que testes de patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* devem ser conduzidos em plantas de cultura de tecido, a fim de se assegurar a sanidade do material a ser inoculado, visto que, mesmo após esterilização superficial do tecido, o organismo pode permanecer latente. Há evidências de que *C. gloeosporioides* é um fungo oportunista que se manifesta externamente nos tecidos quando estes sofrem algum tipo de estresse. Neste trabalho, obtiveram-se indícios de que *C. gloeosporioides* apresenta relação endofítica nos tecidos de cafeeiros (*C. arabica*).

A partir dos resultados obtidos, sugere-se que em trabalhos futuros sejam conduzidos experimentos visando a:

- avaliação de diferentes temperaturas sobre a viabilidade de inóculo de *C. gloeosporioides* colonizando tecidos do cafeeiro coletados no campo;
- continuidade dos testes de patogenicidade em plantas de cultura de tecido e em ramos de café oriundos de mudas com 30 a 45 dias de idade;
- obtenção de isolados de *C. gloeosporioides* marcados geneticamente para comprovar a latência em ramos e frutos no campo e em condições de laboratório; e
- realização de estudos histopatológicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGWANDA, C.O.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M.C.; CHARRIER, A. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in *Coffea arabica*. **Euphytica**, v.97, n.2, p.241-248, 1997.
- ALMEIDA, A.R.; SALGADO, M.; PFENNING, L.H.; LIMA, C.S. Fungos endofíticos de folhas e hastes de café (*Coffea arabica*). **Fitopatologia Brasileira**, v.27, agosto, p.230, 2002.
- ALMEIDA, S.R.; MATIELO, J.B.; MULLER, R.R.A. Observações preliminares sobre queda de frutos sob suspeita de ataque de *Colletotrichum* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, p.323-326, 1985.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.JR.; AGUILAR, C.I.V.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.3, p.229-236, 2001.
- AVILES, D.P.; MATIELLO, B.J.; PINHEIRO, M.R.; MANSK, Z. Diversos graus de resistência de café conilon à mancha manteigosa em condições de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, p. 317, 1981.
- BAXTER, A.P.; VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A.; EICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. **Phytopathology**, v.17, p.15-188, 1985.
- BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v.83, n.7, p.596-608, 1999.



- BERRY, P.A; ABREGO, L. Insects and disease affecting some crops in El Salvador. **FAO Plant Prot. Bull**, v.1, p.151-153, 1953.
- BEYNON, S.M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, W.G.; VARZEA, V. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. Physiological and Molecular. **Plant Pathology**, v.46, p.457-470, 1995.
- BIANCHINI, C. Informe resumido sobre la mancha mantecosa, chasparia y ojo de gallo del café em Costa Rira. **Café**, v.2, p.29-34, 1960.
- BINYAMINI, N.; SCHFFMANN, N.M. Latent infection in avocado fruit due *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, v.62, n.6, p.592-594, 1972.
- BITANCOURT, A.A. As fermentações e podridões da cereja de café. **O Biológico**, v.22, p.205-213, 1956.
- BITANCOURT, A.A. As manchas da folha do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n.10, p.191-201, 1958.
- BITANCOURT, A.A. Um inquérito sobre a seca dos ramos do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, n.1, p.19-22, 1958a.
- BRAGANÇA, S.M.; CARVALHO, C.H.S.; FONSECA, A.F.A.; FERRAO, R.G.; SILVEIRA, L.S.M. Emcapa 8111, Emcapa 8121, Emcapa 8131: primeiras variedades clonais de café conilon lançadas no Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira - Comunicado Técnico**, v.68, n.6, p.1-2, 1993.
- BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.10, p.943-948, 2001.
- CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama forest reserve, Guyana. **Mycology**, v.94, n.2, p.210-220, 2002.
- CHAU, K.F.; ALVAREZ, A. M. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. **Phytopathology**, v.73, n.8, p.1113-1116, 1983.
- DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1992. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.
- FEITOSA, M.I.; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; RODDETTI, V.; LEITE, Y.R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. No Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.44, n.1-2, p.33-54, 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 – MG.
- FIGUEIREDO, M. B.; MARIOTTO, P.R. *Colletotrichum gloesporioides* Penz. atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **O Biológico**, v.24, n.1, p.25-26, 1978.
- FILHO, O.P.; PARADELA, A.L. O complexo *Colletotrichum* – Cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade.** Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2001. p.269-280.
- FREEMAN, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds.). *Colletotrichum* – host specificity, pathology and host-pathogen interection. **American Phytopathological Society**, 2000. p.131-145.
- FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology**, v.91, n.10, p.986-992, 2001.
- FREIRE, F.C.O.; BEZERRA, J.L. Foliar endophytic fungi of Ceara State (Brazil): a preliminary study. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.3, p.304-308, 2001.
- GAGNÉ. S.; RICHARD, C.; ROUSSEAU, H.; ANTOUN, H. Xylem-residing Bacteria in alfafa roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p.996-1000, 1987.
- GAMBOA, M.A.; BAYMAN, P.. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree. **Biotropica**, v.33, n.2, p.352-360, 2001.
- GIBBS, J.N. Inoculum sources for coffee berry disease. **Annual. Applied. Biologic**, v.64, p.515-522, 1969.
- GIELINK, A.J.; VERMEULEN, H. The ability of american and african *Colletotrichum* isolates to cause coffee berry disease symptoms and the association of some isolates with *Glomerella cingulata*. **Plant Pathology**, v.89, p.188-190, 1983.
- GUTIERREZ, L.H. Muerte descendente causada por *Colletotrichum* em lãs plantas de café em el almacigo y su combate por médio de aspersiones em Turrialba, Costa Rica. **Turrialba**, San Jose, v.4, n.3, p.65, 1954.
- HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Application of the Scholander Pressure Bomb to Studies on Endophytic Bacteria of Plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.411-416, 1997
- HINDORF, H. *Colletotrichum* Occurring on *Coffea arabica* a Review. **Journal of Coffea Research**, Karnataka, v.5, n.3/3, p. 43-56, 1975.

- HINDORF, H. *Colletotrichum* Population auf *Coffea arabica* in Kenya. **Phytopathology**, v.77, p.97-116, 1973.
- HINDORF, H. *Colletotrichum* spp. isolated from *Coffea arabica* in Kenya. **Kenya Coffea**, v.77, p.328-331, 1972.
- HOCKING, D. Brown Blight (*Colletotrichum coffeanum* Noak) of *Coffea arabica* in East Africa. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.58, p.409-421, 1966.
- HOCKING, D. Fungicides for Arabica coffee. V. Observation and experiments with *Colletotrichum coffeanum* Noack. **Phytopathology**, v.1:4, p.400-407, 1965.
- HOCKING, D.; JOHANNIS, J.C.; VERMEULEN, H. Ascospore Production, Discharge and Infection by *Glomerella cingulata* Causing Coffee Berry Disease. **Nature**, London, v.214, p.1144-1145, 1967.
- HOLLIDAY, P. Fungus Diseases of Tropical Crops. **Annals of Applied Biology**. England., p.607 (Abst) 1980.
- KING, W.T.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A.; WILSON, L.L. Effects of temperature on sporulation and latent period of *Colletotrichum* spp. infecting strawberry fruit. **Plant Disease**, v.81, n.1, p.77-84, 1997.
- KLINGELFUSS, L.H.; YORINORI, J.T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.158-164, 2001.
- LARRAN S.; MONACO, C; ALIPPI, H.E. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, n.2, p.181-184, 2001.
- LATUNDE, A.O.; O'CONNELL, R.J.; NASH, C.; LUCAS, J.A. Stomatal penetration of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves by a *Colletotrichum* species causing latent anthracnose. **Plant-Pathology**, v.48, n.6, p.777-785, 1999.
- 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.
- MANSK, Z.; MATIELLO, J.B. Ocorrência de mancha manteigosa em café 'conilon' (*Coffea canephora* Pierre), no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, p.172-173, 1977.
- MASSABA, D.; WALLER, J.M. Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England, **CAB International**, p.237-249, 1992.
- McDONALD, J. A preliminary account of a disease of green coffee berries in Kenya colony. **Mycological Society**, v.11, p.145-154, 1926.

- McDONALD, J. Notes on disease of coffee in Kenya. **Kenya Coffea**, v.7, p.1-3, 1929.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant Soil**, v.173, p.337-342, 1995.
- MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, v.124, n.2, p.60, 1993.
- MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.369-374, 2000.
- MULINGE, S.K. Development of coffee berry disease in relation to the stage of berry growth. **Annual. Applied. Biological**, v.65, p.269-276, 1970.
- MULLER, R.A. L. Evolution de anthracnose des bies du cafeier (*Coffea arabica*) due à une forme du *Colletotrichum coffeanum* Noack du Cameroun. **Café Cacao Thé**, Paris, v.14, n.2, p.56, 1970.
- MUSSON, G.; McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, p.407-416, 1995.
- MUSUMECI, M.R.; MORAES, B.C. W.; STAPLES, R.C. A self inhibitor in uredospores of the coffee rust fungus. **Phytopathology**, v.63, p.71-73, 1974.
- NECHET, K.L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.
- NOACK, F. J. As manchas das folhas dos cafeeiros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, n.1, p.5, 1901.
- NUTMAN, F.J. Coffee berry disease. **Annual Pathology Society**, v.16, p.277-286, 1970.
- NUTMAN, F.J.; ROBERTS. F.M. A note on a possible natural inhibitor of germination in *Colletotrichum coffeanum* Noack. **Mycological Society** (Abst.), v.35, p.229-230, 1970.
- 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. ii. some factors affecting germination and infection, and their relation to disease distribution. transactions of the British. **Mycological Society**, v.43, p.489-505, 1960.

- PAULA, E.M. **Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.
- PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Antracnose do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, v.4, n.44, p.82-90, 1978.
- PERKINS, D.D. Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica-gel. **Canadian Journal Microbiology**, v.8, p.591, 1962.
- PRUSKY, D.; KOBILER, I.; FISHMAN, Y.; SIMS, J.J.; MIDLAND, S.L.; KEEN, N.T. Identification of an antifungal compound in unripe avocado fruits and its possible involvement in the quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology**, v.132, n.4, p.319-327, 1991.
- RAJESWARI, S.; PALANISWAMI, A.; RAJAPPAN, K. A chemodiagnostic method for the early detection of symptomless latent infection of *Colletotrichum musae* in banana fruits. **Plant Disease Research**, v.12, n.1, p.52-55, 1997.
- RAYNER, R.W. Coffee berry disease – a survey of investigations carried out up to 1950. **Kenya Coffea**, v.17, p.130-158, 1952.
- RAYNER, R.W. Latent infection in *Coffea arabica*. **Nature**, v.161, p.245-246, 1948.
- RODRIGUES JR., C.J.; VÁRZEA, V.M.P.; HINDORF, H.; MEDEIROS, E.F. Strain of *Colletotrichum coffeanum* Noack em republique centrafricaine. **Café Cacao Thé**, v.13, n.3, p.221-230, 1991.
- ROSSETTI, V.; FEICHTBERGER, E.; FEITOSA, M.I. A doença dos frutos do cafeeiro denominada “coffee berry disease” (CBD). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.42, p.265-284, 1975.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual. Review. Ecological. System**, v.29, p.319-343, 1998.
- SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p.1-5, 2001.
- SAKIYAMA, C.C.H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. 2001. 72 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.
- SCHIEBER, E.; ZENTMYER, G.A.; MITCHEEL, D.J.; ROHEIM, J. Coffee berry necrosis in Guatemala and Costa Rica. (Abst), **Phytopathology**, v.60, p.1542-1545, 1970.
- SHAW, E.D. Leaf and fruit spot of *Coffea arabica* in New Guinea. **Agricultural Journal**, v.19, n.4, p.152-166, 1968.

- SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.251-260, 2000.
- SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKA, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. systematics, ecology and evolution. **Annual Pathology Society**, v. 3, n.29, p.216, 1996.
- SMALL, W. Annual report of the government botanist. (Abs.) Uganda. **Annual Report**, p.42-44, 1921.
- SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P.R.; BROWN, A.E. Genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloesporioides*. **Micological Research**, v.97, p.995-1000, 1993.
- 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** (Abst.), v.39, p.499-512, 1996.
- STEINER, K.G. The influence of surface was obtained from green berries of six selections of *Coffea arabica* on germination of conidia of *Colletotrichum coffeanum*. **Kenya Coffee** (Abst), v.37, p.179, 1972.
- SUTTON, B.C. The coelomycetes: Fungi imperfecti with perithecia, acervuli and stromata., **Commonwealth Mycological Institute**. p.523-525, 1980.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. England, **CAB International**, p.1-26, 1992.
- VAN DER GRAFF, N. A. On the possible occurrence of the coffee berry disease in Brazil. **FAO**, Rome, v.27, p.118, 1979.
- VAN DER GRAFF, N.A. Selection of *Coffea arabica* types resistant to coffee berry disease in Ethiopia, **Euphytica**, v.21, p.81-91, 1981.
- VAN DER VOSSSEN, H.A.M.; COOK, R.T.A.; MURAKURU, G.N.W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noack (*sensu* Hindorf) in *Coffea arabica* L. In: *Methods of Preselection for Resistance*. **Euphytica**, v.25, p.733-745, 1976.
- VARGAS, E.G.; GONZALEZ, U.L.C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San Jose, v. 22, n.2, p.51, 1972.
- VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.99-110, 1974.
- VERMEULEN, H. Coffee berry disease in Kenya. **Plant Pathology**, v.76, p.277-284, 1970.

- VERMEULEN, H. Coffee berry disease in Kenya. **Plant Pathology**, v.75, p.250-265, 1979.
- VIEGAS, A. P. Moléstias do cafeeiro. **Café**, São Paulo, v.32, p.33-34, 1957.
- VON ARX, J.A. Die arten der gattung *Colletotrichum*. **Phytopathology**, v.29, p.413-468, 1957.
- WALLER, J.M.; BRIDGE, P.D.; BLACK, R.; HAKIZA, G. Characterization of the COFFEE BERRY DISEASE PATHOGEN, *Colletotrichum kahawae* sp. Nov. **Mycological Reserch**, Cambridge, v.97, n.8, p.989-994, 1993.
- WANG, W.F.; XIAO, J.H.; LI, G.H.; HE, M.G.; YANG, Z.M.. On the infection of *Colletotrichum gloeosporioides* to chinese chestnut in jiangxi. **Acta Agriculturae**. (Abst), v.22, n.4, p.512-515, 2000.
- WELLMAN, F.L. Blister spot of arabica from virus in Costa Rica. **Turrialba**, San Jose, v.7, p.13-15, 1957.
- ZAITLIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A. Latent infection of peach caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, n.3, p.224-228, 2000.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Café. Controle de Doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas. Grandes culturas**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 1997.v.1., p,554.

## **APÉNDICE**



Tabela 1A - Procedência dos 180 isolamentos de *Colletotrichum gloeosporioides* associados ao cafeeiro

<b>Isolados</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Estado</b>	<b>Parte isolada</b>	<b>Cultivar</b>
1	Alto Caparaó	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
2	Alto Caparaó	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
3	Alto Caparaó	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
4	Alto Caparaó	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
5	Alto Jequitibá	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
6	Alto Jequitibá	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
7	Alto Jequitibá	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
8	Alto Jequitibá	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
9	Alto Jequitibá	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
10	Alto Jequitibá	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
11	Alto Jequitibá	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
12	Araponga	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
13	Araponga	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
14	Araponga	MG	Ramo	Catimor
15	Araponga	MG	Ramo	Catimor
16	Araponga	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
17	Araxá	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
18	Araxá	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
19	Araxá	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
20	Boa Esperança	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
21	Boa Esperança	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
22	Bocaina	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
23	Bocaina	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
24	Bom Jesus da Madeira	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
25	Bom Jesus do Galho	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
26	Botelhos	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
27	Cachoeirinha	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
28	Cachoeirinha	MG	Ramo	Mundo Novo
29	Cambuquira	MG	Ramo	Mundo Novo
30	Cambuquira	MG	Ramo	Mundo Novo
31	Cambuquira	MG	Fruto	Mundo Novo
32	Cambuquira	MG	Ramo	Mundo Novo
33	Cambuquira	MG	Ramo	Mundo Novo
34	Cambuquira	MG	Fruto	Mundo Novo
35	Cambuquira	MG	Ramo	Rubi
36	Cambuquira	MG	Fruto	Rubi
37	Cambuquira	MG	Fruto	Rubi
38	Cambuquira	MG	Ramo	Rubi
39	Cambuquira	MG	Ramo	Mundo Novo
40	Cambuquira	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
41	Cambuquira	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
42	Cambuquira	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
43	Cambuquira	MG	Ramo	Catuaí Amarelo

Tabela 1A, Cont.

<b>Isolados</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Estado</b>	<b>Parte isolada</b>	<b>Cultivar</b>
44	Cambuquira	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
45	Campinas	SP	Ramo	Mundo Novo
46	Campinas	SP	Fruto	Mundo Novo
47	Campinas	SP	Ramo	Catiáfa
48	Carangola	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
49	Carangola	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
50	Caratinga	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
51	Chalé	MG	Fruto	Conilon
52	Coimbra	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
53	Coimbra	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
	Conceição de	MG	Ramo	Conilon
54	Ipanema			
55	Cristais Paulistas	SP	Fruto	Catuaí Vermelho
56	Ervália	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
57	Fervedouro	MG	Fruto	Mundo Novo
58	Fervedouro	MG	Ramo	Mundo Novo
59	Fervedouro	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
60	Fervedouro	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
61	Guaxupé	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
62	Ibatiba	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
63	Ibatiba	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
64	Ibiraci	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
65	Ibiraci	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
66	Ibiraci	MG	Ramo	Mundo Novo
67	Ibiraci	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
68	Ibiraci	MG	Ramo	Mundo Novo
69	Irupi	ES	Fruto	Catuaí Vermelho
70	Itamogi	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
71	Itamogi	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
72	Itirapuã	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
73	Iuna	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
74	Iuna	ES	Fruto	Catuaí Vermelho
75	Jeriquara	SP	Fruto	Mundo Novo
76	Laginha	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
77	Laginha	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
78	Lajinha	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
79	Lajinha	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
80	Lajinha	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
81	Lajinha	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
82	Lajinha	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
83	Lambari	MG	Fruto	Mundo Novo
84	Lambari	MG	Ramo	Mundo Novo
85	Lambari	MG	Fruto	Mundo Novo
86	Lambari	MG	Fruto	Rubi
87	Lambari	MG	Ramo	Rubi
88	Lambari	MG	Ramo	Rubi

Tabela 1A, Cont.

<b>Isolados</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Estado</b>	<b>Parte isolada</b>	<b>Cultivar</b>
89	Lambari	MG	Ramo	Rubi
90	Lambari	MG	Ramo	Mundo Novo
91	Lambari	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
92	Lambari	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
93	Lambari	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
94	Lambari	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
95	Lambari	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
96	Londrina	PR	Ramo	Catuaí Vermelho
97	Londrina	PR	Fruto	Catuaí Vermelho
98	Manhuaçu	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
99	Manhuaçu	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
100	Manhuaçu	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
101	Manhuaçu	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
102	Manhuaçu	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
103	Manhuaçu	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
104	Manhuaçu	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
105	Manhuaçu	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
106	Martins Soares	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
107	Martins Soares	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
108	Martins Soares	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
109	Martins Soares	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
110	Nepomuceno	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
111	Nepomuceno	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
112	Oratório	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
113	Patrocínio	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
114	Patrocínio	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
115	Patrocínio	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
116	Patrocínio	MG	Ramo	Catimor
117	Patrocínio	MG	Ramo	Catimor
118	Patrocínio	MG	Ramo	Rubi
119	Patrocínio	MG	Ramo	Rubi
120	Patrocínio	MG	Fruto	Rubi
121	Patrocínio	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
122	Patrocínio	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
123	Patrocínio	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
124	Patrocínio	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
125	Patrocínio Paulista	SP	Ramo	Catuaí Vermelho
126	Patrocínio Paulista	SP	Ramo	Catuaí Vermelho
127	Pedregulho	SP	Folha	Catuaí Vermelho
128	Pedregulho	SP	Ramo	Catuaí Amarelo
129	Pedregulho	SP	Ramo	Catuaí Amarelo
130	Pedregulho	SP	Fruto	Catimor
131	Pedregulho	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
132	Perdizes	SP	Ramo	Catuaí Vermelho
133	Perdizes	SP	Ramo	Mundo Novo
134	Perdizes	SP	Ramo	Mundo Novo

Tabela 1A, Cont.

<b>Isolados</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Estado</b>	<b>Parte isolada</b>	<b>Cultivar</b>
135	Perdizes	SP	Fruto	Catuaí Vermelho
136	Perdizes	SP	Fruto	Catuaí Vermelho
137	Realeza	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
138	Realeza	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
139	Reduto	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
140	Sacramento	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
141	Sacramento	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
142	Sacramento	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
143	Santa Filomena	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
144	Santa Rita de Minas	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
145	Santa Rita de Minas	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
146	Santa Rita de Minas	MG	Fruto	Conilon
147	Santana da Vargem	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
148	Santana da Vargem	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
	São José do	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
149	Manhuaçu			
	São José do	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
150	Mantimento			
151	São Miguel do Anta	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
152	São Miguel do Anta	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
	São Sebastião do	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
153	Paraíso			
154	São Tomás de Aquino	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
155	São Tomás de Aquino	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
156	Serra do Brigadeiro	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
157	Serra do Brigadeiro	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
158	Simonésia	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
159	Simonésia	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
160	Simonésia	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
161	Simonésia	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
162	Teixeiras	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
163	Teixeiras	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
164	Três Pontas	MG	Fruto	Catuaí
165	Três Pontas	MG	Ramo	Catuaí
166	Varginha	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
167	Varginha	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
	Venda Nova do	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
168	Imigrante			
	Venda Nova do	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
169	Imigrante			
	Venda Nova do	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
170	Imigrante			
	Venda Nova do	ES	Folha	Catuaí Vermelho
171	Imigrante			
172	Viçosa	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
173	Viçosa	MG	Fruto	Catuaí Vermelho

Tabela 1A, Cont.

<b>Isolados</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Estado</b>	<b>Parte isolada</b>	<b>Cultivar</b>
174	Viçosa	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
175	Viçosa	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
176	Viçosa	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
177	Viçosa	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
178	Viçosa	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
179	Viçosa	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
180	Viçosa	MG	Fruto	Catuaí Vermelho

Tabela 2A - Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* escolhidos para testes de patogenicidade em ramos e hipocótilos

<b>Isolados</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Estado</b>	<b>Parte isolada</b>	<b>Cultivar</b>
1	Alto Caparão	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
5	Alto Jequitibá	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
7	Alto jequitibá	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
14	Araponga	MG	Ramo	Catimor
30	Cambuquira	MG	Ramo	Mundo Novo
48	Carangola	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
50	Carangola	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
57	Fervedouro	MG	Fruto	Mundo Novo
64	Ibiraci	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
72	Itirapuã	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
78	Lajinha	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
94	Lambari	MG	Fruto	Catuaí Amarelo
96	Londrina	PR	Ramo	Catuaí Vermelho
100	Manhuaçu	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
106	Martins Soares	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
107	Martins Soares	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
125	Patrocínio Paulista	SP	Ramo	Catuaí Vermelho
129	Pedregulho	SP	Ramo	Catuaí Amarelo
131	Pedregulho	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
135	Perdizes	SP	Fruto	Catuaí Vermelho
137	Realeza	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
139	Reduto	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
145	Santa Rita de Minas	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
146	Santa Rita de Minas	MG	Fruto	Conilon
151	São Miguel do Anta	MG	Ramo	Catuaí Amarelo
155	São Tomás de Aquino	MG	Ramo	Catuaí Vermelho
168	Venda Nova do Imigrante	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
169	Venda Nova do Imigrante	ES	Ramo	Catuaí Vermelho
173	Viçosa	MG	Fruto	Catuaí Vermelho
180	Viçosa	MG	Fruto	Catuaí Vermelho



Figura 1A - Testemunha, atomizada com água estéril, apresentando sintoma e esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* dez dias após incubação a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas.



Figura 2A - Testemunha, atomizada com água estéril, apresentando sintoma e esporulação de *C. gloeosporioides* oito dias após incubação a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas.

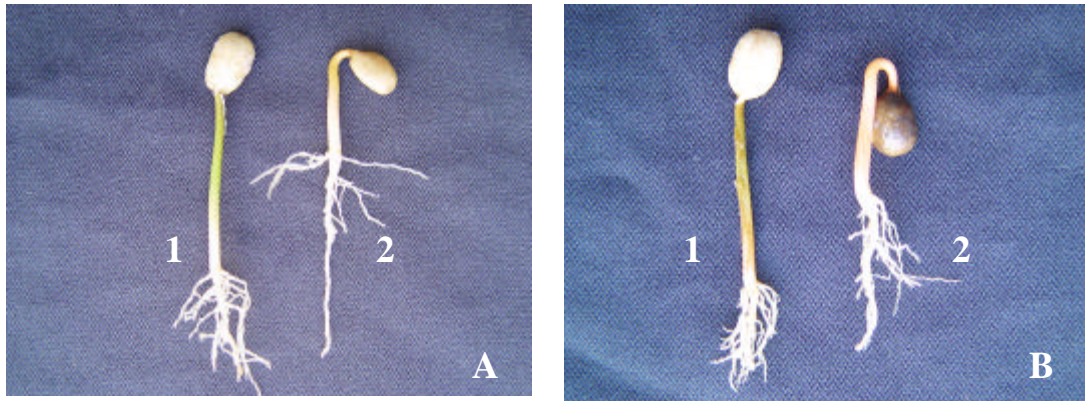


Figura 3A - Hipocótilos no estágio "palito de fósforo" sem fermento (A) e com fermento (B), sem manifestação de sintomas, 25 dias após inoculação. 1-testemunha, 2-isolado 168 (Venda Nova do Imigrante – ES).



Figura 4A - Ramos e frutos apresentando sintomas e esporulação de *C. gloeosporioides* após processo de esterilização superficial seis dias após incubação a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas.

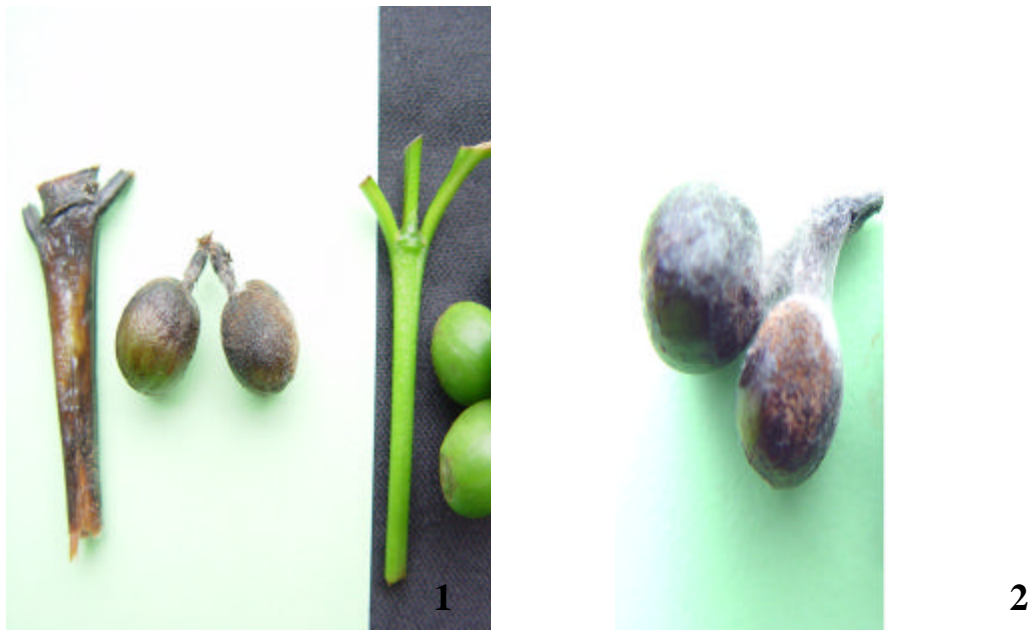


Figura 5A - Avaliação de método químico para detecção de infecção latente por *C. gloeosporioides*. 1-Amostras após esterilização superficial seguida de imersão em 500 ppm de paraquat por um minuto, apresentando esporulação de *C. gloeosporioides*; 2-Amostras apresentando sintoma e esporulação de *C. gloeosporioides* após processo de esterilização superficial.



Figura 6A - Teste de patogenicidade em plantas de *C. arabica* oriundas de cultura de tecido, avaliadas 15 dias após a inoculação. A – Testemunha sem ferimento, B – Testemunha com ferimento, C – Isolado 168 (Venda Nova do Imigrante – ES), sem ferimento e D – Isolado 168, com ferimento.