

## AGRESSIVIDADE E DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR RAPD DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* COLETADOS EM LAVOURAS CAFEEIRAS DE MINAS GERAIS.

### AGRESSIVITY AND RAPD ANALYSIS TO *Colletotrichum gloeosporioides* FROM COFFEE PLANTS IN MINAS GERAIS STATE, BRAZIL

Fernando César JULIATTI<sup>1</sup>; Cláudia Cristina Neto SILVA<sup>2</sup>; Marcelo P. GIOVANINI<sup>3</sup>; Luiz Ricardo GOULART<sup>4</sup>; Fernanda Cristina JULIATTI<sup>5</sup>; Anely Castilho POLIZEL<sup>6</sup>

**RESUMO:** A antracnose do cafeeiro tem-se tornado uma importante doença no Brasil nos diversos cafés das diversas regiões. O objetivo deste trabalho foi analisar características sintomatológicas, patogênicas e genético-moleculares de isolados do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. A diversidade genética de 22 isolados do fungo *C. gloeosporioides* foi analisada com base em marcadores RAPD. O DNA genômico de cada isolado, coletado em frutos, hastes e folhas de cafeeiros cultivados em diferentes regiões de Minas Gerais foi extraído e amplificado utilizando-se sete oligonucleotídeos. Os produtos de amplificação obtidos com cada primer foram resolvidos em gel de agarose a 1%, fotodocumentados e utilizados para análises de diversidade genética. Foi realizada uma inoculação em plântulas de cafeeiro com um par de folhas e frutos verdes, utilizando-se uma suspensão de cada isolado na concentração de  $4 \times 10^6$  conídios/mL. O padrão molecular dos isolados foi relacionado com os dados de agressividade em plântulas e frutos verdes das variedades Mundo Novo e Catuaí. Com base em 33 marcadores RAPD polimórficos, gerados por cinco oligonucleotídeos, verificou-se que a maior distância genética entre os isolados foi de 23,6%. Os isolados foram separados em grupos distintos de similaridade genética. Resultados diferenciais da agressividade de oito isolados em plântulas, associados a análise molecular sugerem diferentes espécies e/ou patótipos (raças) de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos e apatogênicos em cafeeiros de Minas Gerais.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea arabica*. Doenças. Podridão de frutos. Patogenicidade. RAPD.

## INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) assume uma forte e expressiva importância na economia brasileira. O Brasil é o maior produtor mundial, com produção anual estimada em cerca de 35 milhões de sacas. No aspecto regional observa-se que Minas Gerais apresentou uma maior produção (16 milhões de sacas), seguido por Espírito Santo (8 milhões de sacas) e São Paulo (3 milhões de sacas). Na safra 2005/2006 existe a possibilidade de aumento da área no Estado de Minas Gerais, proporcional a 7,6% em relação a safra 2004/2005

(COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2005).

A lavoura cafeeira é prejudicada economicamente por uma série de doenças que limitam a produção. Dentre estas doenças, a antracnose (*Colletotrichum* sp.) constitui, em alguns países, um grave problema trazendo sérios prejuízos à cultura. Em algumas regiões ocorre uma enorme variação de intensidade dos danos por ela provocados (DORIZZOTO, 1993; JULIATTI; SILVA, 2001; TALAMINI et al. 2002). As características do gênero *Colletotrichum* e sua divisão em espécies são discutidas por Arx., citado por Carvajal (1987).

<sup>1</sup> Professor, Doutor, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>2</sup> Agrônoma, Mestre.

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>4</sup> Professor, Doutor, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>5</sup> Engenheira Agrônoma.

<sup>6</sup> Doutoranda, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia.

Received: 22/07/05

Accept: 21/01/06

De acordo com Feitosa et al. (1977), foi no Brasil que pela primeira vez, se constatou em cafeeiros, por Noack (1901), a ocorrência do fungo descrito na época como *Colletotrichum coffeanum*. A doença recebeu vários nomes: Antracnose do cafeeiro, Queima – castanha ('Brown blight'), 'Die – back', 'Elon die – back' e 'doença da queda do café'.

No continente Africano nenhuma outra doença apresentou gravidade comparável à de CBD "coffee berry disease", onde causou perdas alarmantes, levando os cafeicultores a erradicar ou abandonar suas lavouras (FEITOSA, 1977). O agente causal de CBD, é uma forma patogênica do fungo *Colletotrichum coffeanum* Noack (MCDONALD, 1926).

Associa-se o aparecimento de CDB no Quênia, com as pulverizações sucessivas com fungicidas cúpricos aplicados para o controle de *Hemileia vastatrix* Berk & Cook, que teriam causado alterações no equilíbrio biológico das populações de *Colletotrichum* (FEITOSA, 1977). Waller et al. (1993) classificaram isolados deste fungo como *C. kahawae* Waller e Bridge por serem distintos em patogenicidade, morfologia de colônia e características bioquímicas, de isolados de *C. gloeosporioides*

No Brasil relatou-se a presença de *Colletotrichum* sp. em frutos de cafeeiros, provocando podridões (BITANCOURT, 1958), porém a espécie *C. coffeanum* é considerada como inexistente no país, mas há a possibilidade do desenvolvimento da doença, semelhante ao ocorrido no Quênia, devido às pulverizações de fungicidas cúpricos nas lavouras cafeeiras.

Os marcadores moleculares surgiram como uma metodologia alternativa para identificação e manipulação de genes de interesse em biologia e genética de fitopatógenos. Com o desenvolvimento da técnica de reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987), a biologia molecular experimentou um revolucionário avanço em função da produção de um grande número de cópias de uma seqüência específica de DNA, o que levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares como polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Esta técnica tem sido utilizada eficientemente no estudo da diversidade de fungos fitopatogênicos.

Atualmente, vários sintomas semelhantes aos provocados pela CBD, vem sendo constatados nos cafezais de Minas Gerais, em folhas, frutos e ramos. A fim de verificar possível quadro sintomatológico e de patogenicidade do fungo, foram conduzidos estudos sobre as características genéticas (RAPD) e patogênicas de isolados de *Colletotrichum* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e Época de Estudo

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias, no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica e em Casa de Vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) durante os anos de 1997 e 1998.

### Isolados Utilizados e Técnicas de Isolamento

Nos experimentos foram utilizados 22 isolados de *Colletotrichum* provenientes de diversas regiões de Minas Gerais para análise molecular e nove para os testes de patogenicidade (Tabela 1).

Culturas puras de cada isolado foram obtidas em meio de cultura BDA, pela técnica usual de isolamento a partir de fragmentos do material vegetal coletado. Pequenos pedaços com 2-3 mm dos bordos das lesões, foram mergulhadas em solução de álcool 50%, por 1 minuto. Posteriormente foram lavados duas vezes em água destilada esterilizada, secos em papel germetest e, então, os fragmentos foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio de cultura BDA (20% de extrato de batata, 2% de ágar e 2% de dextrose em água). Previamente neste meio de cultura foi adicionado quimicetina (200 ppm).

As placas foram colocadas em Câmara de Incubação à temperatura de 22+ 2°C, com fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias, as colônias foram repicadas para novas placas contendo meio de aveia (1,8% de ágar e 3% de aveia em água), quimicetina (200 ppm) e suplevit, 0,5% (v/v) em meio de aveia. As culturas puras foram utilizadas para obtenção de isolados monospóricos, pela diluição de uma suspensão de 10.000 conídios por mL. Plaqueou-se as concentrações 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> até a obtenção de culturas individualizadas em meio de cultura BDA. As colônias individualizadas para cada isolado foram repicadas para o meio de aveia, e em seguida, preservadas pelo método de dessecação em sílica gel, à temperatura de -5°C.

Para a extração de DNA foi preparado meio de BD líquido (20% de extrato de batata, 2% de dextrose em água), onde foi colocado um disco de 5 mm de diâmetro, retirado da margem da colônia monospórica. Incubou-se o material sob agitação constante, à temperatura ambiente, durante cinco dias.

**Tabela 1.** Isolados de *Colletotrichum* sp., utilizados no presente trabalho, obtidos de plantas de cafeeiro em diferentes regiões de Minas Gerais.

Procedência dos Isolados	Parte da Planta Atacada ou Infectada
UFU 1(C1)-Carmo do Paranaíba <sup>1</sup>	Fruto
UFU 2(C2)-Araguari-a <sup>1,2</sup>	Fruto
UFU 3(C3)-Araguari-b <sup>1</sup>	Fruto
UFU 4(C4)-Araguari-c	Fruto
UFU 59(C5)-Araguari-d	Fruto
UFU 69(C6)-Araguari-e	Fruto
UFU 7(C7)-Uberlândia-a <sup>1,2</sup>	Fruto
UFU 8(C8)-Uberlândia-b	Folhas e Haste
UFU 9(C9)-Cajuri-a <sup>1,2</sup>	Fruto
UFU 10(C10)-Cajuri-b	Fruto
UFU 11(C11)-Canãa-a	Fruto
UFU 12(C12)-Canãa-b	Fruto
UFU 13(C13)-Canãa-c	Fruto
UFU 14(C14)-Teixeiras	Fruto
UFU 15(C15)-Patrocínio-a <sup>1,2</sup>	Fruto
UFU 16(C16)-Ibiá <sup>1,2</sup>	Fruto
UFU 17(C17)-Patrocínio-b	Fruto
UFU 18(C18)-Lavras	Haste e Fruto
UFU 19(C16)-Ibiá <sup>1,2</sup>	Fruto
UFU 20(C20)-Patrocínio-d <sup>1</sup>	Folhas e Haste
UFU 21(C21)-Lavras <sup>3</sup>	Frutos
UFU 22(C22)-Patrocínio <sup>3</sup>	Folhas e Haste

<sup>1</sup> Isolados utilizados nos testes de patogenicidade em plântulas.

<sup>2</sup> Isolados utilizados no teste de patogenicidade em frutos verdes.

<sup>3</sup> Isolados UFU 21 e 22 obtidos em *Solanum jilo* (*Colletotrichum gloeosporioides*) e *Cinnamomum zeylanicum* (*Colletotrichum* sp.), respectivamente.

### Extração do DNA Genômico.

A massa miceliana de cada isolado foi coletada por filtração do meio BD em filtro a vácuo, utilizando-se uma membrana de éster de celulose da Millipore com 0.45 µm de porosidade. O micélio filtrado (aproximadamente 2g) foi congelado em nitrogênio líquido e, imediatamente, macerados em grau de porcelana. Ao macerado adicionou-se 5 mL de solução tampão (NaCl 5M, Tris-HCl pH 8.0 1M, EDTA pH 8.0 0.5 M, SDS 10% e βME 1%). Em seguida, adicionou 5 mL de clorofórmio-octanol 24:1. A mistura foi colocada em tubo para a centrifugação a 8.000 g por 10 min, após a qual o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Posteriormente, adicionou-se ao sobrenadante igual

volume de etanol e incubou-se os tubos a -20 °C por 2 horas. Em seguida centrifugou-se a 1.500 g a 4°C por 15 min, descartando o sobrenadante. O “pellet” (precipitado) formado no fundo do tubo foi seco invertendo-se o tubo sobre papel toalha e, em seguida, ressuspenso em 200µL de água deionizada. Para eliminação do RNA, foi adicionado a cada amostra 4µL de RNase (concentração de RNase, incubando-as em banho maria a 37°C durante uma hora). Em seguida, 200µL de fenol-clorofórmio 1:1 foram acrescentados aos tubos, agitados a 300 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, onde adicionou-se igual volume de etanol gelado e inverteu-se os tubos lentamente, para em seguida centrifugá-los a 1.400 rpm durante 15 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e inverteu-se os tubos sobre

papel germotest para secar. O “pellet” seco foi ressuspensão em água ultrapura e alíquotados foram transferidos para microtubos eppendorfs de 200 µL.

### Quantificação do DNA Genômico

As amostras de DNA de cada isolado foram quantificadas com base na absorvância a 260 nm em espectrofotômetro. Em seguida, as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng/µ.

### Obtenção e análise dos marcadores RAPD

As reações de amplificação ao acaso do DNA genômico foram preparadas em 25µL de volume total,

contendo 30 ng de DNA, 2U de Taq DNA polimerase, Tris-HCl 10mM (pH 8,3), KCl 50mM, 10 pmoles de primer, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM e 150 µM de cada dNTP. Foram utilizados sete oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2). O programa utilizado no termociclador PTC-100 nas reações de PCR foi o seguinte: 3 ciclos de 94°C por 2 min, 35°C por 1 min e 72°C por 1 min. Em seguida realizou-se 10 ciclos de 94°C por 40 seg, 35°C por 40 seg, 72°C por 40 seg. e 25 ciclos 94°C por 40 seg; 40°C por 40 seg; 72°C por 40 seg. Os produtos de amplificação obtidos com cada primer foram resolvidos em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta. As imagens foram fotodocumentadas no Vídeo Documentation System Image Máster (Pharmacia).

**Tabela 2.** Sequências dos primers utilizados na análise genômica pelo método RAPD-PCR, dos isolados de *Colletotrichum* sp. coletados em lavouras cafeeiras de Minas Gerais.

PRIMER	SEQUÊNCIA – 5' –3'
GOU 04-1	5' - CTTTAATTCCATATGCCTAAGCGGG-3'
OPG 05	5'-CTGAGACGGA-3'
OPG 16	5'-AGCGTCCTCC-3'
OPG 18	5'-GGCTCATGTG-3'
OPO 02	5'-ACGTAGCGTC-3'
OPO 06	5'-CCACGGGAAG-3'
OPO 16	5' – TCGCCGGTTC-3'

Primer GOU 04-1 Desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular da UFU

Os marcadores RAPD obtidos foram codificados em uma matriz de dados binários de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas reproduzíveis e mais intensas. Esta matriz foi usada para calcular a distância genética por porcentagem de desacordo (PD).

$PD = N'_{AB}/N_T$  (PUTERKA et al., 1993); onde:

$N'_{AB}$  = número total de bandas polimórficas entre os dois genótipos comparados e  $N_T$  = número total de bandas.

O programa STATÍSTICA (versão 4,5) foi utilizado para calcular a porcentagem de desacordo entre todos os isolados. Com base na matriz de porcentagens de desacordo, foi realizada a análise de agrupamento, utilizando-se o método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) como critério.

### Agressividade em Plântulas

As plântulas, no estádio “orelha de onça” das

progênes Catuaí Vermelho MG-99 e Mundo Novo 379/19, foram obtidas sob condições ideais de desenvolvimento.

O inóculo foi preparado através da suspensão de esporos provenientes de oito isolados do Estado de Minas Gerais, em meio de aveia de 14 dias. Para a obtenção da suspensão de esporos, foi adicionado em torno de 10mL de água destilada esterilizada em placas contendo o meio de cultura de aveia (18% de agar e 3% de aveia em água) com colônias esporuladas, após 15 dias de incubação a 20-22 °C, com fotoperíodo de 12 horas. As colônias foram raspadas e após a obtenção da suspensão foram filtradas através de uma camada dupla de gaze para eliminar os resíduos. A concentração de esporos da suspensão de cada isolado foi determinada com o auxílio de câmara de Neubauer diluída para 4x10<sup>6</sup> conídios/ml. Com a finalidade de evitar que os esporos ficassem aglomerados, o espalhante Tween 20 foi adicionado à suspensão, na proporção de 0,1mL para 100ml de suspensão.

As mudas mantidas em câmara úmida (sacos plásticos umedecidos) por 24 horas à 20-22°C foram inoculadas utilizando-se um atomizador De Vilbiss nº 15, atomizando-as até o ponto de escorrimento. As testemunhas foram atomizadas com água destilada esterilizada. Após a inoculação, as plântulas inoculadas e as testemunhas permaneceram por mais 24 horas na câmara úmida e ausência de luz. Após este período as mudas foram acondicionadas na câmara de incubação,

na temperatura de 22+2°C, em um fotoperíodo de 12 horas, onde foram avaliadas por três vezes em um intervalo de dez dias.

Após 20 e 30 dias da data da inoculação, as mudas foram individualmente avaliadas pela observação dos sintomas no hipocótilo, segundo a escala de Van Den Vossen et al (1976 citado por DORIZOTTO, 1993), com modificações (Tabela 3).

**Tabela 3.** Critério de avaliação da severidade de sintomas à reação a *Colletotrichum* sp apresentado por plântulas de café.

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

Para o teste de patogenicidade em plântulas foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial 9 x 2, correspondente a isolados e cultivares, respectivamente, com cinco repetições. Foi avaliado o índice de doença (ID) conforme fórmula proposta por Cirulli & Alexander, segundo Dorizotto (1993).

$$ID = (F \times V) / (N \times X) \times 100$$

ID= Índice de doença, F= Número de plântulas com determinado grau de infecção, V= Grau de Infecção, N= Número total de plântulas inoculadas, X= Grau máximo de infecção

Para a obtenção da homogeneidade de variâncias, os dados ID foram transformados em  $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$ . Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa Sanest (GOMES, 1990).

### Agressividade em frutos verdes

Este ensaio foi conduzido em câmara de crescimento vegetal a temperatura de 20-22°C, utilizando frutos verdes das variedades Catuaí Vermelho MG 99 e Icatú Vermelho MG 2942. Os frutos foram desinfetados

em álcool a 50 % por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1 % por 1 minuto e lavados em água destilada esterilizada. Em seguida, foram colocados 25 frutos em caixas gerbox, previamente desinfetadas em álcool e hipoclorito de sódio. Os frutos foram inoculados com auxílio de um atomizador De Vilbs, sendo que o inóculo foi preparado conforme aquele utilizado na inoculação das plântulas. Após a inoculação, incubou-se os frutos em câmara climatizada à temperatura de 22 a 24°C. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial isolados x variedade (7 x 2) com quatro repetições. Foram realizadas avaliações aos 8 e 13 dias após a inoculação. Calculou-se a porcentagem de frutos infectados para os isolados avaliados, utilizando a seguinte expressão:

$$\%FI = FII - FIT/FTP \times 100, \text{ onde:}$$

FI = Porcentagem de frutos infectados, FII = Número de frutos inoculados e infectados, FIT = Número de frutos infectados na testemunha, FTP = Número total de frutos

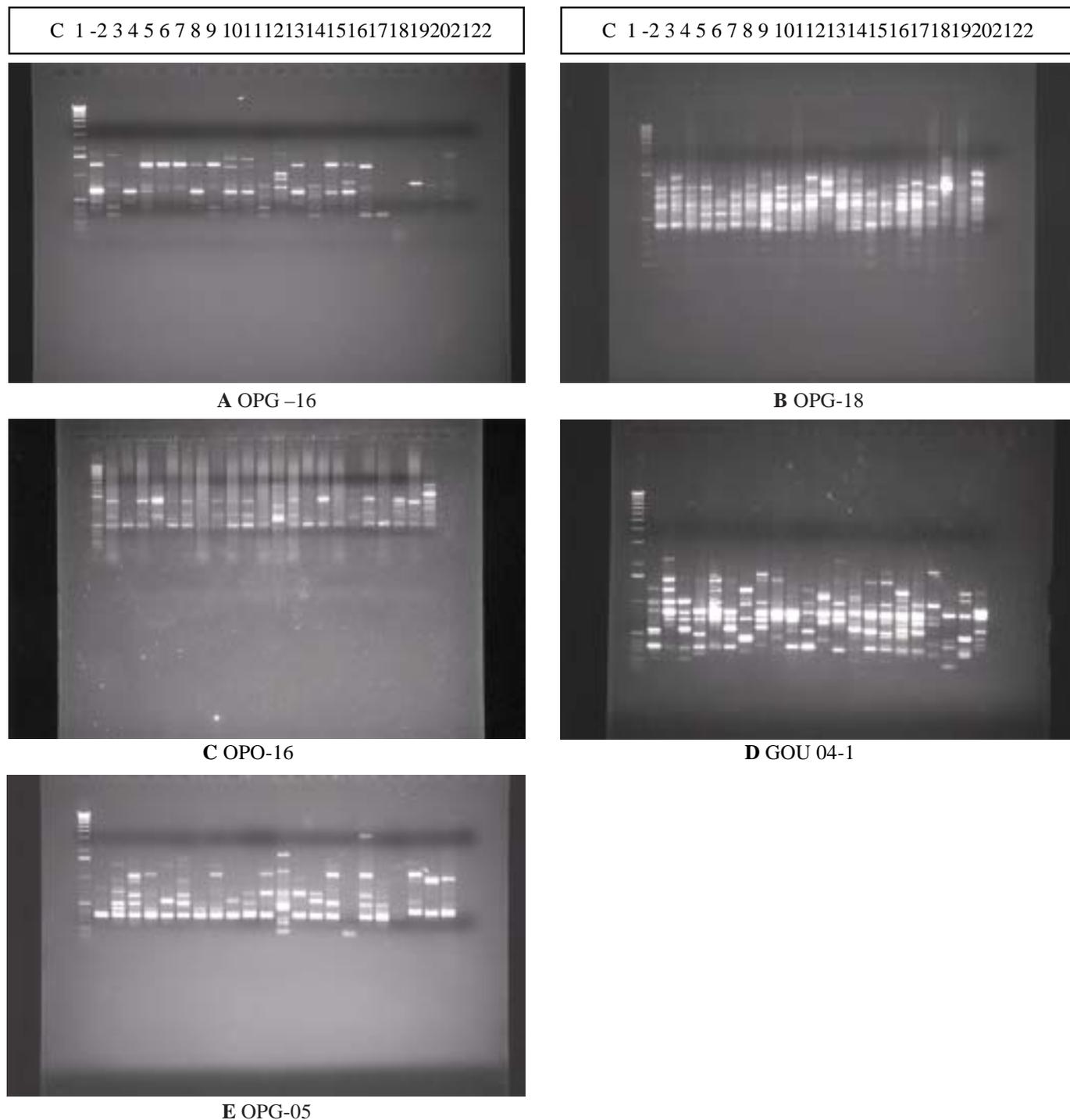
Para a obtenção da homogeneidade de variâncias, os dados ID foram transformados em  $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$ . Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa Sanest (GOMES, 1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise Genética

Dentre os 7 *primers* testados, OPG-18, OPO-16, OPG-05, GOU-04-1 e OPO-16 foram mais eficientes para discriminar o polimorfismo existente entre os isolados de

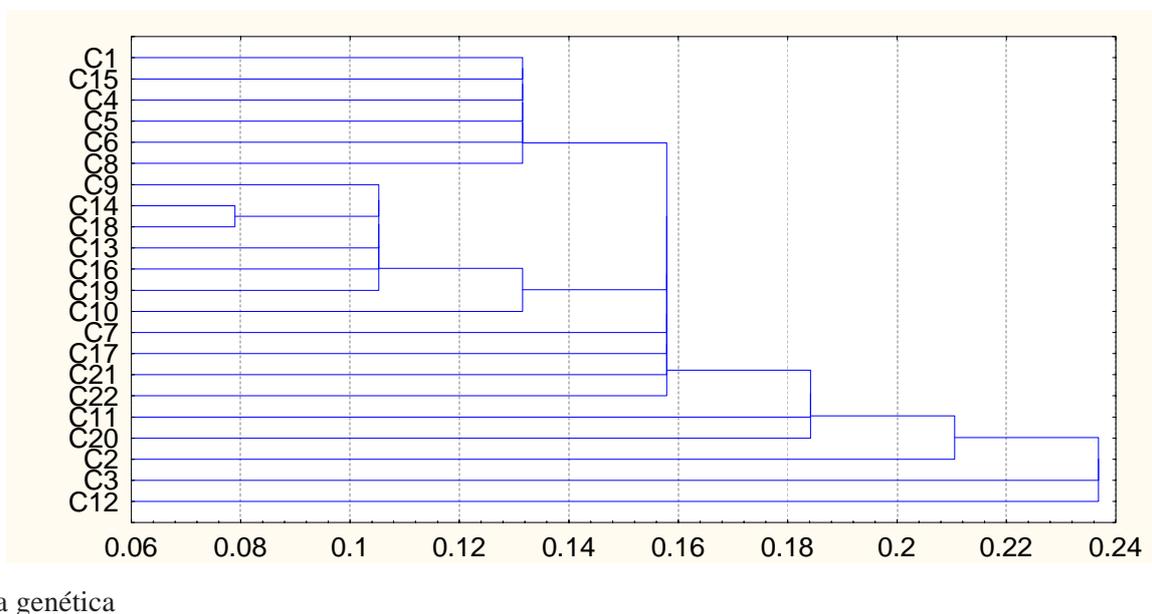
*Colletotrichum* sp. As reações de amplificação de DNA, utilizando-se os 5 “primers”, resultaram em 33 marcadores moleculares. A Figura 1 ilustra os produtos de amplificação das amostras de DNA dos 22 isolados de *Colletotrichum* sp com a utilização do primer GOU-04-1. Com base nos 33 marcadores moleculares, observou-se porcentagens de desacordo de 6 a 24% entre isolados analisados.



**Figura 1.** Produtos de amplificação de amostras de DNA de 22 isolados de *Colletotrichum* sp. com utilização de primers OPG 16,18, OPO 16, GOU-04-01 e OPO 05.

A análise de agrupamento permitiu a formação de grupos distintos, onde, claramente, observa-se a existência de uma gama de patótipos diferentes infectando lavouras cafeeiras no Estado de Minas Gerais. Dois grupos de similaridade ficaram bem evidentes, o primeiro formado pelos isolados 1, 15, 4, 5, 6 e 8 e o segundo

pelos isolados 9, 14, 18, 13, 16, 19 e 10. Os isolados 3 (Araguari -b) e 12 (Canãa) apresentaram uma maior distância genética em relação aos outros isolados, evidenciando a grande diversidade entre os isolados coletados em Minas Gerais (Figura 2).



Distância genética

**Figura 2.** Análise de agrupamento de 22 isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de diferentes municípios de Minas Gerais, com base na porcentagem de desacordo de 33 marcadores moleculares RAPD.

O diagnóstico molecular representado pelo dendrograma (Figura 1), agrupou os isolados obtidos em Canela (UFU 21) e Jiló (UFU 22), que pertencem a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, em um mesmo grupo de vários isolados de café, o que pode nos indicar que todos pertencem a mesma espécie. Pode-se citar como exemplo os isolados de Patrocínio-b (UFU 17) e Uberlândia-a (UFU 7), que apresentaram uma homologia de 100% aos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. O isolado UFU 18 proveniente de Lavras - MG, apresentou a mesma homologia genética que o isolado UFU 14 (Teixeiras, MG), podendo inferir que ambos pertencem a mesma espécie.

### Agressividade em Plântulas

Foi constatado pela análise de variância, efeito significativo dos isolados, das variedades e da interação entre os mesmos sobre o índice de doença (ID), observado 20 e 30 dias após a inoculação.

A Tabela 4 mostra as comparações das médias do ID causado por 8 isolados em duas variedades de café e duas épocas de avaliação. Foi observado aos 20 e 30

dias após a inoculação que os isolados de Araguari-b (UFU 3), Uberlândia-a (UFU 7), Patrocínio-d (UFU 20) e Ibiá (UFU 16) apresentaram um índice de doença superior aos demais. Os isolados de Carmo do Paranaíba (UFU 1) e testemunha (sem inoculo) não apresentaram sintomatologia típica da doença (ausência de sintomas).

As variedades Mundo Novo MG 379/19 e Catuaí Vermelho MG 99 mostraram-se susceptíveis a vários isolados, sendo que a segunda apresentou um maior índice de doença. Dorizzotto (1993), em experimento semelhante usando plântulas, afirmou que a cultivar Mundo Novo apresenta um índice de doença inferior ao observado nas linhagens UFV - 1075, UFV - 973, UFV - 1603, UFV - 3869 e UFV - 3894 (derivadas de 'Catimor' com genes de Caturra, ancestral comum ao Catuaí). Dorizzotto e Abreu (1993) também evidenciaram a suscetibilidade de progênies de cafeeiro, originárias do híbrido Timor, ao fungo *Colletotrichum* em condições de laboratório.

Após vinte dias da inoculação, os isolados de Araguari-b (UFU 3), Uberlândia-a (UFU 7), Patrocínio-a (UFU 15) e Ibiá (UFU 16), apresentaram um maior índice médio de doença em relação aos demais isolados

nas duas variedades inoculadas. Não foi verificado na avaliação aos 20 dias da inoculação, sintomas da doença no isolado de Carmo do Paranaíba (UFU-1), que apresentou valores de índice médio de doença igual à testemunha (Tabela 4).

A variedade Catuaí Vermelho MG 99 continuou

apresentando maior susceptibilidade em relação aos isolados patogênicos quando comparada com a variedade Mundo Novo 379/19

Avaliando 30 dias após a inoculação foi observado os mesmos resultados obtidos aos 20 dias após a inoculação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Índice médio de doença dos isolados em plântulas de cafeeiros das variedades Catuaí Vermelho e Mundo Novo aos 20 e 30 dias após a inoculação.

Isolados	ÍNDICE DE DOENÇA			
	20 DIAS		30 DIAS	
	Catuaí Vermelho	Mundo Novo	Catuaí Vermelho	Mundo Novo
UFU03(Araguari-b)	37,6 a	15,2 a	37,8 a	17,4 a
UFU07(Uberlândia-a)	83,8 a	11,3 a	37,8 a	15,4 a
UFU20(Patrocínio-d)	33,7 a	5,6 ab	36,7 a	5,7 ab
UFU16(Ibiá)	16,3 a	5,6 ab	24,7 ab	5,6 ab
UFU09(Cajuri-a)	5,6 bc	5,6 ab	13,7 bc	5,6 ab
UFU15(Patrocínio-a)	4,4 bc	4,4 b	13,7 bc	5,2 b
UFU01(Carmo do Paranaíba)	0,0 c	0,0 b	0,0 c	0,0 b
UFU02(Araguari -a)	4,8 bc	0,0 b	9,9 bc	0,0 b
Testemunha	0,0 c	0,0 b	0,0 c	0,0 b
Média	10,6 A	3,4 B	11,0 A	3,9 B

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (isolados) nas colunas e maiúsculas(variedades) não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey a 5%.

### Patogenicidade em frutos verdes

As porcentagens médias de frutos verdes infectados das variedades Catuaí Vermelho e Icatú Vermelho aos 08 e 13 dias após a inoculação com seis isolados encontram-se na Tabela 5. O isolado de Cajuri-a (UFU 9), Uberlândia-a (UFU 7), Ibiá (UFU 16) e Araguari-a(UFU 2) causaram uma maior porcentagem de frutos infectados. A cultivar Icatú Vermelho MG 2942

foi a mais suscetível aos isolados avaliados. É possível que o patógeno tenha maior afinidade em backgrounds genéticos que possuam genes de *Coffea canephora* L. Estes resultados demonstram que *Colletotrichum gloeosporioides* está especializando a diferentes cultivares de cafeeiro em Minas Gerais, infectando mudas em viveiro, ramos jovens e frutos durante a fase produtiva do cafeeiro.

**Tabela 5.** Porcentagem de frutos verdes infectados das variedades Catuaí Vermelho MG 99 e Icatú Vermelho MG 2942 por seis isolados de *Colletotrichum* sp., 8 e 13 dias após a inoculação.

Isolados	ÍNDICE DE DOENÇA			
	20 DIAS		30 DIAS	
	Catuaí Vermelho	Icatú Vermelho	Catuaí Vermelho	Icatú Vermelho
UFU09- Cajuri-a	16,4 a	61,7 a	27,5 a	71,8 a
UFU07- Uberlândia a	16,4 a	54,8 a	27,5 a	66,4 a
UFU16-Ibiá	12,1 a	48,9 a	26,5 a	63,4 a
UFU02- Araguari a	8,5 a	42,4 a	20,1 a	53,1 a
UFU20- Patrocínio d	11,8 a	0,6 b	12,0 a	3,8 b
UFU15- Patrocínio a	10,5 a	0,0 b	17,5 a	9,5 b
Testemunha <sup>1</sup>	5,4 a	0,0 b	13,9 a	5,8 b
Média	11,3 B	19,2 A	25,7 B	31,6 A

<sup>1</sup> Testemunha sem inóculo, após desinfestação superficial

Médias seguidas pela mesmas letras minúsculas (isolados) e maiúsculas (variedades) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

#### **Análise conjunta do polimorfismo genético (RAPD) e agressividade em plântulas de cafeeiro.**

Os isolados de Uberlândia (UFU 7) e Patrocínio-b (UFU 17), de acordo com a análise genética de agrupamento, estão no mesmo grupo dos isolados de canela (UFU 21) e jiló (UFU 22), ambos pertencentes a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, provavelmente podendo ser a mesma espécie. Esses mesmos isolados foram patogênicos às plântulas de cafeeiro.

O isolados de Araguari-b (UFU 3), nas duas variedades testadas, apresentaram um maior índice médio de doença, posicionando-se, de acordo com análise de agrupamento, em grupos distantes dos demais. O agrupamento genético colocou os isolados 1 e 15 que apresentaram menor agressividade em um mesmo grupo e separou o isolado 2 (não patogênico), ao nível de 21% de dissimilaridade.

Os isolados de Ibiá (UFU 16) e Cajuri (UFU 9) que causaram níveis intermediários de ID ficaram dispostos no mesmo grupo. Tais resultados indicam uma certa associação dos dados genéticos obtidos com marcadores moleculares e os dados de agressividade analisados com base no ID.

Os resultados da análise genética e da agressividade dos isolados sugerem novos variantes de *Colletotrichum gloeosporioides*. Estudos recentes realizados por (NECHET; ABREU, 2002; NECHET,

1999) demonstram esta especialização do fungo em cafeeiro, inclusive com a patogenicidade obtida em frutos verdes e plântulas.

Os marcadores moleculares analisados mostraram certa associação com o nível de agressividade apresentados pelos isolados quando inoculados em plântulas de café, podendo ser poderosas ferramentas no estudo da diversidade genética de isolados que estejam causando prejuízos em cafezais do estado de Minas Gerais.

Dentro dos 22 isolados analisados por marcadores moleculares e patogenicidade em plântulas, demonstra-se existir diferentes patótipos (raças) associados ao cafeeiro em Minas Gerais. Dorizzotto e Abreu (1993) constataram, em lavoura cafeeira do município de Cristais-MG, manchas em folhas, lesões deprimidas em frutos de aspecto oleoso (mancha manteigosa) e morte dos cafeeiros. Dorizzotto (1993) concluiu que o isolado era o agente causal da mancha manteigosa, com algumas características morfológicas iguais ao CBD (crescimento micelial lento e micélio verde oliva ou cinza escuro com setas raramente presentes). Espécies de *Colletotrichum* invadem todos os órgãos do cafeeiro, incluindo frutos em todos os estádios, folhas e hastes maduras: o grupo CBD pode ser encontrado em todos os órgãos do hospedeiro em diferentes proporções, sendo mais comum em frutos verdes e cereja. As espécies *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* colonizam

hastes e folhas e também frutos mumificados já infectados pela primeira espécie (HINDORF, 1975). Nechet (1999) estudou os padrões eletroforéticos de isolados de *Colletotrichum* patogênicos a plântulas e frutos verdes em relação a um isolado saprofito nos padrões de álcool desidrogenase (ADH), fosfatase ácida (ACP) e esterase (EST) e as diferenças entre os isolados patogênicos e saprófitas confirmaram a viabilidade da técnica na identificação de raças patogênicas dentro da população fúngica. Waler (1987) fizeram uma ampla revisão discutindo aspectos morfológicos, ecológicos e da patogenicidade do gênero *Colletotrichum*. ao cafeeiro. Estudos recentes apontam neste sentido, onde as técnicas de RAPD e SSR (microsatélites) podem ser úteis no estudo da diversidade biológica de isolados de

*Colletotrichum* do cafeeiro (JULIATTI et al. 2003 a, 2003 b; OROZCO-MIRANDA et al. 2003 a, 2003 b, 2003 c).

Embora esteja evidente a patogenicidade de alguns isolados provenientes de frutos do cafeeiro ou brotações jovens, urge investigar as relações entre isolados de *Colletotrichum* patogênicos e insetos sugadores, como *Pseudophilothrips*, e ácaros (*Brevipalpus phoenicis*) que ocorrem na cultura. Segundo Picanço et al. (2003) podem ocorrer lesões fúngicas causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Pestalotia* em frutos de goiaba, após a ocorrência de insetos sugadores. Onde, ocorrem aumento do número de lesões fúngicas nos frutos em função de maiores densidades do trips (*Pseudophilothrips* sp., Thysanoptera : Phlaeothripidae).

---

**ABSTRACT:** Coffee anthracnosis is the important disease in Brazil. This study was based on the molecular analyses of 22 different *Colletotrichum gloeosporioides*'s isolates by using RAPD and pathogenicity tests in coffee seedlings and fruits. Seven oligonucleotides were tested and amplification was observed through electrophoresis in 1% agarose gel. Coffee seedlings and fruits were inoculated at concentration of the  $4 \times 10^6$  conides /ml. After inoculation, seedlings were kept in growth chamber under high relative humidity (>95 %) for three days. It was determined the molecular standard related with pathogenicity in seedlings and cherry fruits of the Mundo Novo and Catuaí varieties. It was detected 33 polymorphic makers through five oligonucleotides. The largest genetic distance was 23.6 %. Results suggested that there are different kinds of the *Colletotrichum gloeosporioides* or different pathotypes this pathogen associated at coffee plants in Minas Gerais State; however none of the markers were associated to pathogenicity.

**KEYWORDS :** *Coffea Arabica*. Diseases. Bags rot. Pathogenicity. RAPD.

---

## REFERÊNCIAS

- BITANCOURT, A. A. Um inquérito sobre a seca dos ramos cafeeiros. **O Biológico**, São Paulo, v.24, p.19-22, 1958.
- COMPANHIA Brasileira de Abastecimento. **Previsão e acompanhamento da safra 2005/2006**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 05 de outubro de 2005.
- DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1993. 67f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agronomia de Lavras: ESAL, Lavras, 1993.
- FEITOSA, M. I. ; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V.;LEITE, Y.R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.44, n.1/2, p.33-54, 1977.
- HINDORF, H. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: a review. **Journal of Coffee Research**, Karnataka, v.5, n.3/3, p.43-56, 1975.
- JULIATTI, F. CRISTINA.; JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A. C. Avaliação da resposta de meios de cultura para crescimento micelial esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília,

v. 28, p. S212, 2003 a. Suplemento. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C.; SILVA, V. A. da. Reação de linhagens de cafeeiro (*Coffea arabica*) em relação a frutos necrosados em relação a diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados artificialmente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S272, 2003 b. Suplemento. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36.

JULIATTI, F. C.; SILVA, S. A. **Manejo integrado de doenças na cafeicultura do cerrado**. Uberlândia, UFU, 1. ed., 2001. 132 p.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro by polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v.55, p.335-50. 1987.

NECHET, K. L. Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.).1999. 73f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. Obtidos em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez., 2002.

NOACK, D. Die Krankheiten des Kaffeebaunes in Brasilien III, *Colletotrichum coffeanum* sp. **Pflanzenkr**, v.2, p. 202, 1901.

OROZCO-MIRANDA, E. F.; JULIATTI, F. C.; FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S. Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* spp. obtidos de cafeeiro no estado de Minas Gerais e sua comparação com *C. kahawae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.S221-2, 2003 a. Suplemento. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36.

OROZCO-MIRANDA, E. F. O.; RIBEIRO, A.; JULIATTI, F. C.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. E *Colletotrichum kahawae* obtidos de cafeeiro, por meio de marcadores RAPD e SSR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.S222, 2003 b. Suplemento. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36.

OROZCO-MIRANDA; E. F. O.; JULIATTI, F. C.; DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Determinação da resistência de cultivares café e evidencição de raças fisiológicas no patossistema café x *Colletotrichum* spp. no estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S222, 2003 c. Suplemento. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36.

PICANÇO, M. C.; CRESPO, A. L. B.; ECOLE, C. A. B.; COSTA, H.; COUTO, F.A.D. Dano, sistema de tomada de decisão, controle de *Pseudophilothrip* sp ( Thysanoptera : Phlaeothripidae) e sua relação com lesões fúngicas em goiaba. **Acta scientiarum : Agronomy**, v.25, n.1, p. 223-230, 2003.

PUTERKA, G. J.; BLACKIV, W. C.; STEINER, W. M.; BURTON, R. L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *DivrAPHIS moxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, Oxford, v.70, p.604-618. 1993.

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; SOUZA, P. E.; JÚNIOR, D. G.; CASTRO, H. A.; SOUZA, R.M.; ABREU, M.S. dez anos da clínica fitossanitária da UFLA – frequência da ocorrência de patógenos, sintomas e principais hospedeiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 173-177, jan./fev. 2002.

WALLER, J. M.; BRIDGE, P. D.; BLACK, R.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, n.8, p.989-994, Aug.1993.