

**ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS DA MANCHA
MANTEIGOSA EM CAFEIRO (*Coffea arabica* L.) E
COMPORTAMENTO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*
spp. EM PLANTAS OBTIDAS POR CULTURA DE
EMBRIÃO**

SEVERINA RODRIGUES DE OLIVEIRA LINS

2006

SEVERINA RODRIGUES DE OLIVEIRA LINS

**ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS DA MANCHA MANTEIGOSA EM
CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.) E COMPORTAMENTO DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum* spp. EM PLANTAS OBTIDAS POR DE CULTURA DE
EMBRIÃO**

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

Orientador

Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2006**

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

Lins, Severina Rodrigues de Oliveira

Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião / Severina Rodrigues de Oliveira Lins. -- Lavras : UFLA, 2006.

104 p. : il.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Mancha manteigosa. 2. *Colletotrichum* spp. 3. *Xylella fastidiosa*. 4. *Coffea arabica* L. 5. Histopatologia. 6. Doença do cafeeiro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7393

SEVERINA RODRIGUES DE OLIVEIRA LINS

**ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS DA MANCHA MANTEIGOSA EM
CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.) E COMPORTAMENTO DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum* spp. EM PLANTAS OBTIDAS POR DE CULTURA DE
EMBRIÃO**

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

APROVADA em 16 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA

Prof^ª. Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

EPAMIG-CTMS

Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL

A DEUS, pela grandeza das bênçãos recebidas em toda a minha vida.

Aos meus pais, João e Severina, pelo amor, confiança, companheirismo, apoio e dedicação.

Aos meus irmãos, Batista e Aldo, pelo apoio, companheirismo e amizade verdadeira. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos, Aldinho e Adrian e sobrinhas, Adrielly e Adriane, pela felicidade do sorriso ao me verem, assim revelando o amor que têm por mim.

À minha tia Joana, pela admiração e apoio.

Ao meu primo Josias, pelo incentivo inicial.

A Carlinhos Warumby, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao meu eterno orientador e mentor, Rildo Sartori, pela confiança, amizade e contínua orientação.

A todos os meus amigos, tanto aos que conhecem o que penso quanto aos que só conhecem o que faço; aos que passam muito tempo comigo e aos que estão todo tempo em mim.

Este trabalho é a soma de todos vocês e, se não saiu melhor, foi pelas circunstâncias do tempo ou dos microrganismos, mas não pela falta do amor de vocês.

OFEREÇO.

Deus, em sua eterna sabedoria, deu-me o mais valioso dos tesouros,
Giselly.

Amiga verdadeira, companheira em todos os momentos, compreensiva em todos
os tempos.

Gigi, perdão pela ausência em muitos momentos de sua formação, quando tive
que me ausentar para trabalhar e estudar. Obrigada por seu amor incondicional
em compreender que isto se faz necessário e pela felicidade da certeza de sua
existência. Te amo, filha.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela conclusão de mais esta etapa da minha vida

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado, bem como ao Departamento de Agricultura pela disponibilização das técnicas, material e pessoal para os estudos de cultura de embrião, especialmente a Evaldo e Vantuil, técnicos dos laboratórios.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Curso de Fitopatologia, Edson Pozza, Mario Lúcio, Vicente, Ricardo, Antônia, Paulo Estevão, José da Cruz Machado, por contribuírem para a minha formação profissional.

Ao professor Mario Sobral de Abreu, pela orientação, atenção e confiança.

Ao professor Eduardo Alves, pelos ensinamentos e orientação em todos os meus trabalhos

Ao professor Ludwig, pela amizade e incentivo.

Ao amigo Josimar, pelo companheirismo durante o desenvolvimento dos trabalhos.

As graduandas Katiúcia e Karla, pela ajuda no Laboratório de Diagnose

A Juliana Barbosa, pelo apoio nos estudos de *Xylella*.

Aos amigos do Laboratório de Micologia

A todos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e ajuda, especialmente a Eliane, Eloisa, Rute e Edson.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Fitopatologia-NEFIT, pelo companheirismo durante a gestão do ano de 2005.

Aos que se tornaram familiares, aos que nasceram familiares e aos que conheci no trajeto até aqui.

À família Pereira Muller, nas pessoas de Olinda, Rogério, Adriano e Marcio e à família Salgado, nas pessoas de Mirian, Jânio, Paulinha e Pedro, por me acolherem com tanto carinho.

Aos amigos da academia Top Fitness e aos que cultivei em outros lugares da cidade, aqueles que certamente serão para sempre amigos.

Aos meus AMIGOS da turma: Amanda, Helena, Jean, Dagma, Fernanda, Elida, Edson, Juliana, Luciana, Marcela e Flavinho, pelo companheirismo e amizade verdadeira em todos os momentos.

À cidade de Lavras, minha de coração, que me proporcionou viver tão bem.

A todos que, de alguma, forma contribuíram para a conclusão deste trabalho e a elaboração da dissertação, em especial, aos amigos Jadir e Dejânia.

SUMARIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução geral.....	02
2 Referencial teórico	04
2.1 A mancha manteigosa	04
2.1.1 Sintomas e sinais da mancha manteigosa	07
2.1.2 Importância da doença.....	08
2.2 <i>Colletotrichum</i> spp. na cultura do cafeeiro.....	09
2.3 Taxonomia de <i>Colletotrichum</i> associado ao cafeeiro	11
2.4 Transmissão de <i>C. gloeosporioides</i> agente da mancha manteigosa	12
2.5 <i>Xylella fastidiosa</i>	13
2.6 Atrofia dos ramos do cafeeiro e adesão da bactéria	15
2.7 Métodos para detecção de <i>Xylella</i>	16
2.8 Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	17
2.9 Técnicas de microscopia para estudos de microrganismos	18
2.10 Obtenção de plantas pela técnica de cultura de embrião	19
3 Referências Bibliográficas	21
Capítulo 2: Estudos histopatológicos do comportamento de <i>Colletotrichum</i> spp. em plantas de cafeeiro obtidas por cultura de embrião.....	31
1 Resumo	32
2 Abstract	33
3 Introdução	34
4 Material e métodos	36
4.1 Obtenção das mudas pelo método de cultura de embrião.....	36
4.2 Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. e ajuste da suspensão de esporos.....	37
4.3 Inoculação	38

4.4 Coleta de amostras	38
4.5 Preparo das amostras para MEV	39
4.5.1 Preparo das folhas	39
4.5.2 Preparo dos hipocótilos para corte em nitrogênio líquido	40
4.6 Avaliação dos processos de pré e pós penetração dos isolados	40
5 Resultados e Discussão	41
5.5.1 Aderência e germinação de conídios	41
5.5.2 Formação de apressório	46
5.5.3 Conidiogênese e formação de acérvulo	49
5.5.4 Colonização dos tecidos internos	53
6 Conclusões	57
7 Referências bibliográficas	58
CAPÍTULO 3 Estudos ultraestruturais em hipocótilos de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.), cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo, oriundos de semente de plantas com e sem sintomas de mancha manteigosa	63
1 Resumo	64
2 Abstract	65
3 Introdução	66
4 Material e métodos	68
4.1 Obtenção e seleção das sementes	68
4.2 Preparo e plantio das sementes	68
4.3 Germinação das sementes e produção de plântulas	69
4.4 Coleta das amostras	69
4.5 Preparo das amostras para MEV	70
4.6 Identificação do fungo	71
4.7 Análise em MEV	71
5 Resultados e discussão	72
5.1 Germinação e produção de plântulas	72
5.2 Plaqueamento em meio de cultura	72
5.3 Análise de hipocótilo de plântulas em MEV	74
6 Conclusões	77

7 Referências bibliográficas	78
CAPÍTULO 4 Constatação de <i>Xylella fastidiosa</i> em pecíolos de folhas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa através da microscopia eletrônica e análise de PCR.....	81
1 Resumo.....	82
2 Abstract	83
3 Introdução	84
4 Material e métodos	87
4.1 Estudos ultraestruturais	87
4.2 Triagem e fixação das amostras	87
4.3 Preparo dos pecíolos para corte em nitrogênio líquido	87
4.4 Detecção da bactéria nas folhas com mancha manteigosa por PCR.....	88
4.4.1 Extração do DNA genômico de <i>X. fastidiosa</i>	89
4.4.2 Amplificação do DNA – PCR	90
5 Resultados e discussão	91
5.1 Análises ultraestruturais	91
5.2 Reação da polimerase em cadeia.....	92
5.3 Comparação dos dois estudos.....	93
6 Conclusões	97
7 Referências bibliográficas	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103

RESUMO

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião.** 2006. 104 p. Dissertação (Mestrado em fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

A mancha manteigosa é uma doença que ocorre em cafeeiro e que necessita de maiores esclarecimentos no tocante à reprodutibilidade dos sintomas. Dentre as lacunas que existem para melhor entendimento da mancha manteigosa enfatiza-se a falta de análises internas dos tecidos sintomáticos, vias de transmissão e o modo de colonização pelo patógeno. A microscopia eletrônica de varredura é uma importante ferramenta para estudos histopatológicos. Objetivou-se, neste trabalho, estudar os eventos de pré e pós-penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* (agente causal da mancha manteigosa) e outras espécies de *Colletotrichum* em plantas de cafeeiro obtidas por culturas de embrião, verificar a transmissibilidade pela semente e realizar estudos histopatológicos em pecíolos de plantas doentes. Os explantes embrionários para a produção das plantas foram obtidos no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG). Os experimentos foram realizados no Departamento de Fitopatologia da mesma universidade no período de junho de 2004 a dezembro de 2005. Utilizando-se a MEV, comprovou-se que *C. gloeosporioides*, isolados de folha e ramos de plantas com sintomas da mancha manteigosa, assim como aquele isolado de fruto de manga, colonizam plantas de cafeeiro fato também comprovado para *C. demathium* isolado de cafeeiro sadio e *C. acutatum* (CML-UFLA). Pelos estudos com plântulas obtidas de sementes com e sem o sintoma da doença, verificou-se *C. gloeosporioides* e *Xylella fastidiosa* nos tecidos internos de hipocótilos em avaliações realizadas por amostragens destrutivas, iniciando-se no estágio palito de fósforo e após, quando atingiram o primeiro e o segundo pares de folhas. Constatou-se *Xylella fastidiosa* em pecíolos de plantas adultas de cafeeiro, com sintoma da mancha manteigosa, por meio da MEV, confirmada por PCR.

***Comitê de Orientação:** Mario Sobral de Abreu - UFLA (Orientador),
Eduardo Alves, UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. **Histopathological studies of Buttery spot in coffee (*Coffea arabica* L.) and behaviour of *Colletotrichum* spp isoaltes in plants obtained by embryo culture.** 2006. 104 p. Dissertação (Mestrado em fitopatologia)-University Federal of Lavras, Lavras, MG*.

Buttery spot is a disease that occurs in coffee and needs more knowledge because of the lack of reproductibility of symptoms. Previous works revealed that *Colletotrichum gloeosporioides* is the causal agent of the disease. Among the blanks that exist to better understand the disease and the pathossystem *Colletotrichum*-coffee it can be emphacied the lack of internal analysis of symptomatic tissues, by transmtion ways and the mode of colonization by the pathogen. The scanning electronic microscopy (SEM) is an important tool for histopathological studies but few works in this patossystem used this technique. The objective of this work was to study the events of pre and post penetration of *Colletotrichum* ssp, in coffee plants obtained by embryo culture, as well as to verify the transmissibility by seed and analyze the causes of buttery spot, internally, through histopathological studies in petioles from diseased plants. The embryonary explants to the production of plants were performed in the Departament of Agriculture of Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG). The other experiments were performed in the Departamento of Plant Pathology of the same University in the period of june 2004 to December 2005. By using MEV, it was proved that *C. gloeosporioides*, isolated from leaves and brenches with symptoms of Buttery spot, as well as one isolated from mango fruits, *C. demathium* (isolated from leaf of a health coffee plant) and *C. acutatum* (obtained from Deposited Cultures - CML-UFLA) colonized plants of coffee. By studies with coffee plants obtained from seeds with and without the disease symptoms, it was observed *C. gloeosporioides* and *Xylella fastidiosa* in the internal tissues of hypocotyls in evaluations performed in destructive samplings 30, 60 and 90 days after seeding. It was observed *Xylella fastidiosa* in petioles of coffee adult plants, with symptoms of Buttery spot, through MEV and confirmed by PCR

* **Adviser Committee:** Mario Sobral de Abreu - UFLA (Advisor),
Eduardo Alves-UFLA (Co-advisor).

CAPÍTULO 1

ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS DA MANCHA MANTEIGOSA EM CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.) E COMPORTAMENTO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* SPP. EM PLANTAS OBTIDAS POR DE CULTURA DE EMBRIÃO

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o cafeeiro ocupa uma área cultivada com cerca de 11.168.000 hectares no mundo. O Brasil contribui com dois milhões de hectares, sendo o país com maior área cultivada, respondendo por 20% da área e 40% da produção mundial, com um potencial produtivo quatro vezes maior que o da Colômbia que ocupa a segunda posição no ranking (Moricochi, 2004).

Levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) indica que a produção brasileira para 2005/2006 gira em torno de 33,3 milhões de sacas de 60 kg. O estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, responsável por cerca de 47% do total, com uma área estimada em 1.084.816 hectares e uma produção de 18.777 mil sacas (60kg), sendo as regiões sul e oeste mineiras responsáveis por mais da metade dessa produção (Conab, 2005). Segundo Cortez (1997), a extensão geográfica e a relativa ausência de geadas são fatores que levam o estado à liderança de produção de cafeeiro no Brasil.

Sabe-se que num futuro próximo, haverá uma demanda ainda maior por cafeeiro, entretanto, a produção pode não responder a necessidade devido às ameaças inerentes à cultura. Dentre estas destacam-se as doenças.

A incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita tem sido um dos principais fatores envolvidos na queda de produção e qualidade do cafeeiro (Sousa & Carvalho, 1997). Historicamente, os fungos têm sido amplamente estudados por serem agentes etiológicos de várias doenças na cafeicultura, afetando negativamente a produtividade. Neste contexto, tem-se buscado formas para aumentar a produção, procurando entender os vários aspectos biológicos dos fungos e de sua interação com as plantas, no sentido de se desenvolver medidas de manejo com maior eficiência.

O gênero *Colletotrichum* abrange importantes patógenos para a cultura do cafeeiro, responsáveis por grandes perdas nas lavouras e, conseqüentemente, na produção de grãos.

A mancha manteigosa do cafeeiro é uma doença que tem sido atribuída a *C. gloeosporioides*. No entanto, existem poucos estudos no que se refere a processos de penetração e colonização neste patossistema e, até o presente, as tentativas para a reprodutibilidade dos sintomas não têm mostrado resultados, sendo necessário que novas pesquisas sejam desenvolvidas com este objetivo.

Uma das ferramentas para estudar esta interação é a microscopia, seja de luz ou eletrônica, por meio dela, pode-se analisar, por exemplo, o tempo que o patógeno leva para penetrar e destruir as células do hospedeiro, o que permite planejar melhor o manejo e a sanidade das lavouras.

Este trabalho teve como objetivos estudar os processos de pré e pós-penetração de *Colletotrichum* spp em plantas de cafeeiro obtidas por culturas de embrião, verificar a transmissibilidade pelas sementes e analisar as causas da mancha manteigosa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A mancha manteigosa

A mancha manteigosa foi primeiramente constatada na Costa Rica e descrita por Wellman (1957). Este pesquisador sugeriu que a doença seria transmitida por vírus, que tinha como vetor um inseto (*Toxoptera aurantiae* Boyer). Em 1972, a etiologia da doença foi elucidada como sendo de origem fúngica, tendo como agente causal *Colletotrichum* sp (Vargas & Gonzalez, 1972). Desde a sua aparição, na Costa Rica, como medida de controle, recomendava-se erradicar todas as plantas doentes (Biachini, 1960). Apesar disso, surgiram novos casos e uma maior incidência no Valle Central, principal região produtora de cafeeiro na Costa Rica. Vargas & Gonzalez (1972) iniciaram o estudo da doença, mas, não obtiveram resultados positivos quando inocularam suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp em frutos e folhas derivados de parentais doentes. Progênies de plantas sadias F1, obtidas de cruzamentos de plantas sadias e doentes, não apresentaram sintomas; assim, estes pesquisadores sugeriram haver um caráter genético que condicionava a suscetibilidade à enfermidade.

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez no estado de São Paulo, por Bitancourt (1958). Posteriormente houve novos relatos em outros estados brasileiros. Em 1977, no estado do Espírito Santo, Mansk & Matiello detectaram a ocorrência de mancha manteigosa em *C. canphora*. Nestas condições, os ataques mais intensos foram observados nas folhas e ramos novos em plantas adultas, apesar de terem sido constatados sintomas em mudas ainda no viveiro. Os cafezais atacados apresentavam desfolha e seca progressiva dos ramos, da extremidade para a base; as brotações novas eram atacadas, causando a morte prematura das plantas. Em Minas Gerais, no ano de 1999, foi constatada

perda total da produção em uma lavoura no município de Cristais (Orozco, 2003). Mais tarde, Costa et al. (2003) relataram estes mesmos problemas ocorrendo na região. Ferreira (2004), realizando isolamentos de lesões novas de folhas, ramos e frutos de cafeeiro, verificou maior incidência de *Colletotrichum* durante a estação quente e chuvosa, quando há intensas brotações nas plantas. Diversos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de reproduzir os sintomas da mancha manteigosa, mas, dificuldades têm sido encontradas (Dorizzotto, 1993; Dias, 2002; Orozco, 2003; Ferreira, 2004). No entanto, os estudos realizados no Brasil têm contribuído para melhores esclarecimentos sobre esta doença.

Diversos trabalhos foram realizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras com relação à mancha manteigosa. Dorizzotto (1993), estudando a caracterização morfológica e a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de regiões cafeeiras do estado de Minas Gerais, identificou o isolado da mancha manteigosa como *Colletotrichum coffeanum* (*C. gloeosporioides*), com características morfológicas idênticas às do agente da CBD, porém não se tratando da variante (CBD) presente na África. Nechet (1999) caracterizou isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de diferentes locais e regiões cafeeiras de plantas mostrando sintomas de mancha manteigosa, por meio de caracteres morfológicos e teste bioquímicos, bem como, por técnicas moleculares, pelo padrão de isoenzimas, além de verificar patogenicidade em mudas. Na mesma pesquisa, a autora constatou que os isolados foram patogênicos a frutos verdes e plântulas, obtendo-se infecção máxima de 51,27% e 24,55% aos trinta dias, respectivamente, entretanto não foram patogênicos às mudas. Dias (2002) caracterizou morfológica e bioquimicamente isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de folhas, ramos e frutos de cafeeiro com sintomas da mancha manteigosa e seca de ponteiros, estudou os efeitos de diferentes temperaturas no comportamento dos isolados, bem como realizou teste de patogenicidade em plântulas de cafeeiro, obtidas

pela cultura de embrião. Nesta pesquisa verificou-se que o isolado proveniente de mancha manteigosa foi patogênico em hipocótilos (estádio palito de fósforo). A autora sugeriu que o agente causal da mancha manteigosa é *C.gloeosporioides*. Este resultado foi reforçado posteriormente por Orozco (2003). Nos trabalhos desenvolvidos por este pesquisador, foi confirmada, por meio de caracterização morfológica e pelos métodos de RAPD e SSR, que o agente causal da mancha manteigosa é *C.gloeosporioides*. O mesmo autor comprovou que há uma variabilidade genética entre isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de plantas de cafeeiro, sugerindo a existência de raças patogênicas do patógeno nesta cultura.

Em 2004, Ferreira estudou a flutuação sazonal e a associação de *Colletotrichum gloeosporioides* a diferentes órgãos e tecidos de cafeeiros, constatando a incidência de *C. gloeosporioides* nos estádios de formação, nos tecidos dos frutos e em ovários de flores recém-fecundadas de plantas com e sem sintomas da mancha manteigosa. Fato semelhante foi constatado por Lins et al. (2004), quando estudaram a incidência de *C. gloeosporioides* nos estádios de formação e nos tecidos dos frutos de cafeeiro. Segundo estes autores o fungo esteve presente em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos chegando, em média, a atingir 86%. Os mesmos autores observaram, ainda, uma elevada incidência do fungo nos tecidos do exocarpo e mesocarpo juntos, atingindo 84,7% destes tecidos na cv Topázio; 79,16% na cv. Rubi e 77,7% na cv. Acaíá.

Dando continuidade aos estudos nesta linha de pesquisa, Pereira (2005) examinou a variabilidade da população de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de cafeeiros, por meio da compatibilidade vegetativa e sexual e realizou estudos histopatológicos em hipocótilos, ramos e frutos. O autor constatou que frutos de cafeeiro com mancha manteigosa apresentam alta colonização por *C. gloeosporioides* e os ramos que apresentam seca descendente

têm o xilema, o floema e o tecido corticoso colonizados por *C. gloeosporioides*, resultados que confirmaram pesquisas anteriores.

2.1.2 Sintomas e sinais da mancha manteigosa

Wellman, em 1957, foi o primeiro a descrever os sintomas da mancha manteigosa. A mesma descrição foi confirmada por Bitancourt (1958) e Mansk & Matiello (1977) que, de forma detalhada, descreveram os sintomas como manchas de cor verde pálido a amarelo, circulares, não necróticas, medindo 2 a 6 mm de diâmetro nas folhas, tanto no bordo inferior como no superior. Em lesões mais velhas, freqüentemente surgem pontos necróticos e escuros no centro. Com a evolução da doença, ocorrem encrespamento, flacidez e queda prematura das folhas jovens. Nos frutos, as lesões são menores e de cor cafeeiro-amarelada. Em frutos maduros surgem áreas necróticas que podem chegar a cobrir todo o fruto provocando sua queda.

Da mesma forma, Costa et al. (2003); Ferreira (2004); Ferreira et al. (2004) e Pereira (2005) observaram sintomas semelhantes: forte definhamento com grande número de ramos mortos, manchas oleosas em folhas e lesões necróticas e acentuada seca de ramos em plantas de cafeeiro arábica. De acordo com outros autores (Bitancourt, 1958; Mansk & Matiello, 1977), os sintomas nas folhas jovens são, inicialmente, manchas de cor verde-clara, com aspecto oleoso, menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. Com o avanço da doença, estas manchas mostram lesões necróticas deprimidas de cor marrom-claro, com bordos irregulares, as quais coalescem e provocam a queda prematura das folhas. Estes mesmos autores relatam que, nos ramos e nos frutos as lesões são menores, com 2 a 3 mm de diâmetro, deprimidas, necróticas com bordos irregulares.

2.1.3 Importância da doença

Plantas com mancha manteigosa produzem poucos frutos, mesmo tendo boa floração, e, com o desenvolvimento dos frutos, principalmente no estágio chumbinho, estes mumificam caindo ao solo (Costa et al., 2003; Ferreira, 2004). Ferreira et al. (2004), fazendo o monitoramento da doença em campo, verificaram que houve declínio vegetativo e, conseqüentemente, produtivo: ramos plagiotrópicos com internódios curtos, florescimento sem a total fecundação acarretando em baixos percentuais de chumbinho e mumificação de frutos. Durante os dois anos de monitoramento, os autores observam perda significativa de produção, chegando a ser nula em algumas plantas; plantas recepadas tiveram suas brotações atrofiadas e, à medida que emitiam novas brotações, surgiam os sintomas da doença.

Ferreira (2004) constatou, por meio de estudos de colonização nos ovários, que as plantas com sintomas de mancha manteigosa foram mais suscetíveis ao *C. gloeosporioides*, com média de 27,91%, enquanto as plantas sem sintomas tiveram média de 5,83%, inferindo que este patógeno possui colonização sistêmica e o uso de recepas não contribui para a eliminação do patógeno e que sua disseminação (quando ocorre) é lenta e a transmissibilidade, provavelmente, está vinculada às sementes de plantas doentes. Ataques intensos são observados em folhas e ramos novos em plantas adultas, ocorrendo necrose e seca dos ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente (Ferreira et al., 2004). Esses ataques intensos observados nas folhas e ramos novos estão relacionados com a fase de maior vegetação, correspondendo ao período quente e chuvoso, de outubro a fevereiro. Em cafeeiros com mancha manteigosa, a produção é afetada gradativamente, chegando a ser nula (Costa et al., 2003; Ferreira, et al., 2004).

2.2 *Colletotrichum* spp na cultura do cafeeiro

Colletotrichum é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Bailey et al., 1992). Causa doenças importantes economicamente em cereais, gramíneas, leguminosas e plantações perenes, incluindo o cafeeiro. A parte aérea das plantas hospedeiras pode ser afetada em todos os estádios de desenvolvimento, desde de plântulas a plantas adultas, bem como sementes. Os sintomas da doença são conhecidos tipicamente como antracnoses, os quais incluem lesões subcirculares ou angulares irregulares, grandes e de coloração castanha, ocorrendo, comumente, nas margens da folha, nas quais massas de esporos e estruturas da fase sexual do fungo são visíveis (Hindorf, 1975; Sutton, 1980; Ainsworth, 1995; Chalfoun, 1997; Lopez, 2001). Além desses, outros são conhecidos, como o *die-back*, que causa queima das folhas do cafeeiro, próximo à extremidade dos ramos secundários, com posterior morte e queda, e, em seguida, os internódios verdes dos ramos novos tornam-se necróticos; *elon die-back*, termo usado no leste africano para designar as plantas atacadas por *Colletotrichum* spp. em áreas não infectadas pelo CBD, apresentando lesões escuras, deprimidas em bagas maduras ou em processo de maturação, sendo incapaz de atacar bagas verdes e, em alguns casos, observando-se a fase sexual (Hocking, 1966) e *coffee berry disease* (CBD), doença restrita ao Continente Africano, causada por *C. kahawae*, que ocasiona manchas deprimidas e escuras nos frutos verdes. A medida que a doença evolui, estas manchas aumentam rapidamente de tamanho, eventualmente cobrindo todo o fruto. Nutman & Roberts (1964) mencionam que em ataques severos, a maior parte das cerejas é mumificada, porém, não caem. Sobre os ramos, podem-se notar os acérvulos com massa de esporos de coloração róseo pálido, característicos de *Colletotrichum* spp.

Na África, onde ocorre a CBD, causada por *C. Kahawae*, as perdas com a produtividade chegam a aproximadamente 50% a 80% (Griffiths et al., 1971; Várzea et al., 2002; Chen, 2002). A doença da baga do cafeeiro foi descrita primeiramente no Quênia, dentro do limite com Uganda, em 1922 (McDonald, 1926). Essa doença logo se espalhou para muitos estados a oeste do Rift Valley no Quênia. Por volta de 1950, tinha cruzado este vale e se estabeleceu nas principais áreas de cultivo de cafeeiro em direção ao leste. Tem sido sugerido (Robinson, 1974) que, antes do cafeeiro ser cultivado no Quênia, o fungo apareceu como um patógeno fraco ou saprofítico sobre os progenitores diploides naturais do halotetraplóide *C. arabica*, tais como *C. eugenoides*, que crescem na floresta da África central e que o aparecimento da CBD no Quênia foi o resultado do reencontro com um patógeno ancestral (Masaba & Waller, 1992). O centro da diversidade de *C. arabica* é o planalto da Etiópia, onde estes progenitores não existem mais.

Segundo Orozco (2003), o patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro, no Brasil, é composto por populações de espécies de *Colletotrichum* associadas, ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma invasiva, sem manifestação de sintomas. Orozco et al. (2002a,b) afirmam, ainda, que existem raças patogênicas para os isolados da espécie *C. gloeosporioides*, os quais ocasionam os sintomas de mancha manteigosa, a seca de ponteiros e a necrose em frutos.

Observou-se que a interação entre *Colletotrichum* spp. e plântulas de cafeeiro é muito variável, dependendo da suscetibilidade do material genético, da variabilidade genética dos isolados e do tempo após inoculação para expressar sintomas (Ferreira, 2004). As perdas são causadas pelos efeitos da doença em diferentes estádios de desenvolvimento, por exemplo, no estabelecimento durante o crescimento vegetativo, por meio da queda prematura de frutos e inflorescências, através de disfunções fisiológicas e fotossintéticas e

por meio de perdas de produção (Bailey & Jeguer, 1992). Na Colômbia em altitudes superiores aos 1.600m, *Colletotrichum* spp. tem sido isolado de brotos, folhas e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, em plantas adultas e plântulas de cafeeiro (Fernandez, 1961).

No Brasil, não há relatos da CBD, no entanto, existem vários relatos de *Colletotrichum* spp. em plantios de cafeeiro causando antracnose em folhas, ramos e frutos, mancha manteigosa e seca de ponteiros, entre outros (Almeida et al., 1979; Dorizzotto & Abreu, 1993; Nechet, 1993; Paradela Filho et al., 2001; Orozco, 2003; Ferreira, 2004; Pereira, 2005).

2.3 Taxonomia de *Colletotrichum* associado ao cafeeiro

A primeira descrição de *Colletotrichum* no Brasil foi feita por Noack, em 1902, como *Colletotrichum coffeanum*. Esta designação foi utilizada por mais de 70 anos, para todos os isolados de *Colletotrichum* associados ao cafeeiro. Após este período, surgiram novas propostas de classificação para os isolados de cafeeiro. Rayner (1952) designou os isolados que ocasionam a CBD como *C. coffeanum* “var. *virulans*”, tendo por base características morfológicas, como a coloração cinzenta esverdeada do micélio. Em 1970, Hindorf realizou estudos morfológicos detalhados em isolados de *Colletotrichum* nomeando-os: *C. coffeanum* Noack, *C. acutatum* Simmons e *C. gloeosporioides* Penz. O mesmo autor descreveu as características morfológicas para separar *C. coffeanum* (*sensu stricto*) em meio MEA, relatando a existência da forma teleomórfica.

A classificação atual contempla a proposta de Waller et al. (1993), que baseia-se em características patogênicas, metabólicas e culturais de isolados de *Colletotrichum*. Eles propuseram a mudança do nome *C. coffeanum sensu* Hindorf para *C. kahawae* J. M. Waller e P. D. Bridge, para aqueles isolados de CBD, já que *C. coffeanum* foi descrito no Brasil.

Orozco (2003), utilizando técnicas de RAPD e SSR, comprovou que os isolados provenientes de plantas com sintomas da mancha manteigosa referem-se a *Colletotrichum gloeosporioides*.

2.4 Transmissão de *C. gloeosporioides* agente da mancha manteigosa

É fácil encontrar, em plantios de cafeeiro aparentemente sadios, reboleiras de plantas atacadas pela mancha manteigosa. O empecilho é o da reprodutibilidade dos sintomas dessa doença, fato ainda não obtido nos estudos desenvolvidos. De acordo com os estudos realizados, essa doença só é transmitida pelas sementes de plantas doentes e só é expressa quando há um estresse fisiológico na planta. (Vargas e Gonzalez, 1972; Orozco, 2003, Orozco, 2002b e Ferreira, 2004).

A transmissibilidade de *Colletotrichum* através de semente já foi relatada em vários estudos (Tiffany, 1951; Nergaard, 1979; Machado, 1994; Almeida Pinto, 2005). Ferreira et al. (2004) verificaram sintomas em plântulas germinadas abaixo de plantas doentes. Orozco (2003) colheu semente em plantas doentes, plantou-as em areia estéril e isolou o fungo com as mesmas características daquelas observadas em isolados de plantas adultas enferma. Este autor sugeriu que a doença é expressa somente em condições especiais de suscetibilidade da planta e ou da modificação das condições ambientais.

Vargas & Gonzalez (1972), realizaram um experimento com enxertia de plantas sadias sobre plantas com sintomas da doença e observaram, após três anos, que os ramos provenientes dessa enxertia continuavam sadios enquanto que plantas vindas de semente de plantas doentes expressaram sintomas característicos da doença. O fato é que, até hoje todos os testes de patogenicidade para este patossistema foram conduzidos com isolados de *Colletotrichum* spp. (Dorizzotto, 1993; Nechet & Abreu, 2002 e Orozco, 2003), os quais não conseguiram a reprodutibilidade dos sintomas

“manchas cloróticas com aspecto oleoso”. No entanto, pela dificuldade em se obter reprodutibilidade dos sintomas, buscaram-se novas ferramentas com o objetivo de avançar nos estudos relacionados a esta doença.

2.5 *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica gram-negativa, que coloniza o xilema de plantas, reduzindo a passagem da água e de nutrientes. A bactéria é transmitida por várias espécies de homópteros vetores, destacando-se algumas cigarrinhas das famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae que, ao se alimentarem no xilema de plantas doentes, adquirem a bactéria que pode ser transmitida para plantas sadias (Lopes, 1996). Essa bactéria tem afetado um grande número de plantas no Brasil e no mundo.

Na cultura cafeeira, ela foi identificada pela primeira vez, por pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas (Paradela Filho et al., 1995), na região noroeste do estado de São Paulo e no sul de Minas Gerais, sendo a doença denominada "requeima do cafeeiro" (Lima, et al., 1996).

Esta doença é caracterizada pela redução do tamanho das folhas, amarelecimento, principalmente na parte apical da planta, queima dos bordos das folhas mais velhas (requeima das folhas do cafeeiro) (Paradella Filho et al., 1995) ou encurtamento de entre-nós (atrofia dos ramos), frutos pequenos, morte de ramos e da planta (Matiello et al., 1998). *Xylella* tem sido encontrada no xilema de diferentes partes, como raízes, caule, ramos plagiotrópicos e ortotrópicos, bem como nas folhas (Ribas et al., 1998). Estudos realizados por Yorinori e colaboradores em 2003, revelaram a presença da bactéria em frutos e sementes, embora a transmissão via semente ainda não tenha sido constatada. Além de grandes prejuízos à cultura do cafeeiro, a grande importância de *X. fastidiosa* está relacionada à cultura de citros no Brasil, causando a clorose variegada dos citros (CVC).

Na cultura cafeeira, embora não tenha sido quantificada sua significância econômica, registrou-se, em São José do Rio Preto), redução de 30% na produção em algumas plantações (Prato, 2000). Desde então, vários estudos têm sido desenvolvidos (Paradela Filho, et al., 1995; Lima et al., 1996; Carvalho et al., 2000; Ishida et al., 2001; Alves 2003; Barbosa, 2003), entretanto, não se sabe ainda avaliar seu efeito, uma vez que o cafeeiro, provavelmente, convive com a bactéria há muitos anos e parece suportar esse patógeno em determinadas situações. Devido à existência de plantas de cafeeiro infectadas em regiões onde não existem plantações de citros, Paradela et al. (1997) sugeriram que o cafeeiro poderia ser o hospedeiro pioneiro da *Xylella*, em relação aos citros. Entretanto, pouco se conhece a respeito da adesão, colonização e expressão dos sintomas.

Embora todas as linhagens de *X. fastidiosa* estejam agrupadas em uma única espécie (Wells et al., 1987), elas diferem quanto a especificidade do hospedeiro, patogenicidade, requerimentos nutricionais, fisiologia, organização do genoma e homologia do DNA, sugerindo que a espécie pode ser dividida em patovares ou subespécies, sendo necessária uma caracterização taxonômica polifásica mais aprofundada destes organismos. De acordo com Paradela Filho (1998), *X. fastidiosa* encontrada em cafeeiros no Brasil, apresenta diferenças moleculares em relação à espécie responsável pela clorose variegada dos citros, embora estes dados tenham sido contrários aos relatados por Paradela Filho et al. (1997). No entanto, deve-se inferir que, a partir das observações relatadas por este autor, outros estudos foram realizados ocasionando novos resultados, muito embora em outra pesquisa, este resultado tenha sido reproduzido. Ciapina (2001) estudou trinta linhagens de *X. fastidiosa* isoladas de plantas de cítrus, cafeeiro, videira, amexeira, elmo e vinca e constatou, por meio do sequenciamento das regiões “ITS” dos genes codificadores de 16-23S rRNAs, três grupos diferentes entre os isolados. Em contrapartida, Lopes (2002) constatou diferenças entre

linhagens de *Xylella* de citros e cafeeiro que apresentaram mecanismos de patogenicidade distintos em fumo. Por outro lado, não se pode descartar que a maioria das áreas onde atualmente se encontra pomares de citros, foi, no passado, ocupada por cafeeiro e, embora existissem poucas plantas de cafeeiro nestas áreas, constatou-se alto índice de *X. fastidiosa* nas mesmas, apesar da CVC ter sido descrita primeiro (Paradela Filho et al., 1997; Rossetti et al., 1990).

2.6 Atrofia dos ramos do cafeeiro e adesão da bactéria

Segundo alguns autores, a causa principal da atrofia dos ramos é uma disfunção no sistema condutor de água, que está relacionada com as oclusões dos vasos do xilema por “gomas”, tiloses ou células de *Xylella* (Esau, 1948; Mircetich et al., 1976 e Mollenhauer & Hopkins, 1976). Existem, porém, divergências na literatura se essas oclusões seriam suficientes para causar um estresse hídrico (Mircetich et al., 1976; French & Stassi, 1978 e Hopkins, 1981). Duas hipóteses para a origem dos sintomas da doença são atribuídas a fitotoxinas (Mircetich et al., 1976 e Lee et al., 1982) e ao desbalanço de reguladores de crescimento (French & Stassi, 1978).

Há muitos anos, o cafeeiro vem apresentando sintomas de infecção pela *Xylella*, os quais, entretanto, eram atribuídos a um esgotamento nutricional devido a altas produções. O efeito dessa bactéria na anatomia da planta foi descrito por Queiroz-Voltan et al. (1998), que sugeriram a evidência de uma relação entre a *X. fastidiosa* e a senescência, associada a fatores de estresse hídrico ou nutricional. Silva et al. (2001) sugerem que a oclusão dos vasos causada por *Xylella* parece ter papel chave no desenvolvimento dos sintomas causados pela bactéria. A goma fastidiana relatada por Simpson et al. (2000), é indicativo de agregado de células bacterianas aderidas umas às outras que formam o biofilme, que pode estar envolvido na virulência da bactéria. Dentre

outras funções do biofilme, podem-se inferir: acúmulo de nutrientes, proteção contra intempéries, concentração da atividade de enzimas, redução do impacto de compostos tóxicos e antibióticos (Costerton & Irwin, 1981 e Waltnick & Kolter, 2000, citados por Alves (2003). Este último autor, estudou as diferentes fases da formação do biofilme de *X. fastidiosa*, por microscopia eletrônica de varredura, utilizando película de poliestireno.

2.7 Métodos para detecção de *Xylella*

Por se tratar de uma bactéria fastidiosa, vários testes são utilizados para detecção de *X. fastidiosa* em plantas e em vetores. Como o isolamento da bactéria é um processo laborioso que envolve um tempo longo para a obtenção da massa bacteriana, cerca de 21 dias, em meio de cultura específico como BCYE (Uchibata et al., 1992) PW (Davis et al., 1981; Hartung et al., 1994) e PWH (Davis et al., 1983) e ainda sujeito a contaminações, outras técnicas mais rápidas foram desenvolvidas com a finalidade de se detectar este patógeno. A sorologia, a microscopia eletrônica e a biologia molecular, com a utilização de “primers” específicos, são ferramentas relevantes e precisas para a detecção deste patógeno.

Barbosa (2003) estudou a ocorrência de *X. fastidiosa* em plantios de cafeeiro com ramos atrofiados, nas regiões Sul e da Zona da Mata de Minas Gerais e constatou a bactéria através de PCR. Mizubuti et al. (1994) detectaram a ocorrência de uma bactéria do tipo *X. fastidiosa* em citros, na Zona da Mata de Minas Gerais, por meio de microscopia de luz. Lima et al. (1997) desenvolveram método rápido para diagnose da CVC, por meio da obtenção do extrato do xilema analisado ao microscópio óptico. Bereta et al. (1991) detectaram a bactéria do mal de “Pierce” da videira e da “periwinkle wilt” da ameixeira, utilizando antígeno específico para este patógeno. Rodrigues Neto et al. (1992, 1993) caracterizaram *Xylella* em material com CVC, utilizando

eletroforese para proteínas totais, bem como imunofluorescência. Resultados semelhantes foram observados por Harakawa et al. (1994). Dando continuidade aos estudos com a bactéria, Paradela Filho et al. (1996) detectaram a presença de *X. fastidiosa* em plantas de cafeeiro, no estado de São Paulo, por meio de testes serológicos, Diba, Elisa, Western blote e PCR, inclusive em regiões onde não havia relatos anteriores.

2.8 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) equivale a uma amplificação enzimática realizada por um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores “primers” que, em poucas horas, sintetizam milhões de cópias de uma sequência nucleotídica específica. É um processo cíclico, desenvolvido em três etapas com temperaturas específicas para cada uma. A primeira consta da desnaturação da fita dupla de DNA, seguida pelo anelamento dos iniciadores à sequência complementar de cada fita simples do DNA desnaturado, e por fim, a extensão dos iniciadores pela DNA polimerase ao longo de ambas as fitas em oposição, com a conseqüente duplicação da quantidade da seqüência do DNA (Batista, 1993; DE Boer et al., 1996).

Considerada uma técnica segura e rápida tem sido empregada com freqüência para os estudos de *Xylella*. Para a detecção específica de *X. fastidiosa* em cafeeiro, Pinto & Leite (1999) otimizaram esta técnica ajustando um protocolo a partir de maceração do tecido de pecíolos em tampão fosfato contendo 0,1 M de ácido ascórbico e PVPP insolúvel e diluição do extrato em 1:100, possibilitando a detecção específica da bactéria em amostras contendo menos de 10^2 UFC/mL. Por meio desta técnica, Lima (1998) verificou diferença entre os produtos de amplificação de citros e cafeeiro, apesar desses “primers” serem específicos para *X. fastidiosa* de citros, havendo a mesma amplificação nos dois grupos.

2.9 Técnicas de microscopia para estudos de microrganismos

A microscopia de luz (ML) é o método mais antigo, em descrições histopatológicas, sendo empregado por vários autores como ferramenta de trabalho para estudos de interações de *Colletotrichum* e bactérias (Nair & Corbin, 1981; Roberts & Snow, 1984; Porto et al., 1988;). O uso do ML combinado com técnicas de coloração ajudou, e vem ajudando, na realização dos estudos histopatológicos de várias interações patógeno-hospedeiro. Todavia, novas técnicas surgiram contribuindo para o avanço desta área de pesquisa.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a de transmissão (MET) são tecnologias modernas e adequadas para a observação de amostras em estudos histopatológicos. Existem várias pesquisas onde foi necessário a utilização do MEV (Roberts & Snow, 1984; Porto et al., 1988; Chau & Alvarez, 1983; Baylei et al., 1992; Alves, 2003; Pereira et al., 2005a,b,c).

Segundo Grimstone (1980), vários pesquisadores têm utilizado MEV nas pesquisas com *Colletotrichum* spp., o que tem favorecido o entendimento de muitas processos, antes não compreendidos (Prusky & Plumbley e Bailey et al., citados por Beiley & Jeguer, 1992).

Estudos histopatológicos com MEV foram desenvolvidos para estudar a infecção por *C. gloeosporioides* em plântulas de pinus por Nair & Corbin (1981). Manandhar et al. (1985) estudaram processos de penetração e infecção em folhas de soja por *Colletotrichum truncatum* e *Glomerella glycines*. Roberts & Snow (1984) também utilizaram esta ferramenta para estudar os aspectos histopatológicos causados por *C. capsici* em maçãs de algodão, observando o tempo para a formação de estruturas como tubos germinativos, apressórios e modos de penetração. Uribeondo et al., (2003) estudando o patossistema, noz x *C. acutatum*, observaram, 36 horas após a inoculação, a formação de “pegs” de penetração e vesícula de infecção nas células onde o fungo penetrou, com o auxílio da microscopia de varredura. Hifas de *Colletotrichum* sp. colonizando

tecidos de hipocótilos de cafeeiro foram observadas por meio da microscopia de luz, por Orozco et al. (2003b).

Em 2005, outros estudos foram realizados através da MEV, obtendo-se novos resultados com relação à mancha manteigosa. Pereira et al. (2005a, b, c) estudaram a relação do tempo de germinação em plantas de cafeeiro com e sem ferimentos; também verificaram que *C. gloeosporioides* está presente em tecidos de fruto de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa. Os mesmos autores comprovaram, por meio da MEV, que *C. gloeosporioides* é o agente causal da seca de ponteiros .

Estes instrumentos também são de valiosa importância para estudos de bactérias Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) estudaram alterações anatômicas em plantas de citros infectadas por *X. fastidiosa*, por meio da microscopia de luz e de transmissão. Lima (1998) verificou colonização e obstrução nos vasos do xilema por *X. fastidiosa* em folhas de citros pela microscopia eletrônica de varredura.

2.10 Obtenção de plantas pela técnica de cultura de embrião

A propagação de plantas *in vitro* tem atraído a atenção dos pesquisadores desde o início do século passado. A terminologia “cultura de embrião” tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião *zigótico in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (Rappaport, 1954). Hannig (1904) foi o primeiro a cultivar *in vitro* embriões imaturos de crucíferas; desde então, pesquisas nessa área têm trazido grandes contribuições para os processos fisiológicos relacionados com a germinação e para os estudos em Fitopatologia (Helgeson & Deverall, 1983), valendo como mais uma ferramenta de pesquisa para o estudo de patógenos que penetram e colonizam plantas.

Paresqui (2003) concluiu, em seus estudos sobre a patogenicidade de *C. gloeosporioides* em cafeeiro, que os testes de patogenicidade devem ser conduzidos em plantas de cultura de tecido, a fim de assegurar a sanidade do material a ser inoculado. Isto porque, mesmo após a esterilização do tecido, o organismo pode permanecer latente.

Propagar plantas a partir de embriões é uma técnica que permite maior segurança no que se refere à obtenção de plantas livres de patógenos (Dias, 2002; Paresqui, 2003), principalmente no caso da cultura do cafeeiro na qual o embrião está envolto por diversas camadas de proteção. Deve-se levar também em consideração que esta técnica acelera a germinação (Dias, 2002), já que é considerada a retomada do crescimento do eixo embrionário, o qual se encontra paralisado nas fases finais do processo de maturação. Contudo, estimulado por condições ambientais, desenvolve-se, ocorrendo, então, o rompimento do tegumento pela radícula, gerando rápida obtenção de plantas pela antecipação da germinação.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, G.C. **Ainsworth and bisby's dictionary of the Fungi**. 8.ed. Surrey: CMI Kew, 1995. 616p.

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

ALMEIDA PINTO, N.F.J. Análise saitária na produção de sementes de grandes culturas. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa-MG, UFV, 2005.502p.

ALVES, E. ***Xylella fastidiosa*: Adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinha vetoras e formações de biofilme sobre película de poliestireno**. 2003. 121f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Piracicaba, SP.

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

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

BARBOSA, J.F. **Ocorrência e padrão espacial da atrofia dos ramos do cafeeiro (*Xylella fastidiosa*) nas regiões sul e Zona da Mata de Minas Gerais**. 2003. 88p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BATISTA, M.F. Métodos moleculares para identificação de patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.1, p.165-196, 1993.

BERETA, M.J.G. et al. Serological detection of *Xylella fastidiosa* associated with citros variegated chlorosis disease in Brasil. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.17, p.10, 1991.

BITANCOURT, A.A. As manchas da folha do cafeeiro. **O biológico**, São Paulo, v.24, n.17, p.191-201, mar. 1958.

CARVALHO, F.M.S.; MENEGUIM, L.; LEITE Jr., R.P. Levantamento da ocorrência de *Xylella fastidiosa* associada a *Coffea* spp. em regiões cafeeiras do Paraná. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas, MG: Embrapa Café, 2000. v.1, p.287-290.

CHALFOUN, S.M. **Doenças do cafeeiro:** importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93p.

CHAU, K.F.; ALVAREZ, A.M. A histological study of antracnose on *Carica papaya*. **Phitopatology**, St. Paul, v.73, n.8, p. 1113-1116, Aug. 1983.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries.** 2002.163p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica)- Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

CIAPINA, L.P. **Sequências repetitivas e sequenciamento do espaço intergênico dos genes 16S-23S rDNA acessando a diversidade genética em *Xylella fastidiosa*.** 2001. 113f. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, SP.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra café 2005/2006:** 1ª previsão e 4ª estimativa safra 2005/2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/Safra/safracafe4.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2006.

CORTEZ, J.G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.27-31, 1997.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; FERRÃO, M.A. Mancha manteigosa em café arábica na região serrana do Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro, BA **Anais...** Porto Seguro, BA: EMBRAPA Café, 2003. p.206.

COSTERTON, J.W.; IRWIN, R.T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review Microbiology**, v.35 p.299-324, 1981.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the causal bacteria associated with phony peach disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, n.3, p.309-314, 1981.

DAVIS, M.J. et al. Periwinkle wilt bacterium: axenic culture pathogenicity, and relationships to other gram-negative, xylem-inhabiting bacteria. **Phytopathology**, v,73, p.1510-1515, 1983.

DE BOER, S.H.; CUPPELS, D.A.; GATAITIS, R.D. Detecting latent bacterial infections. In: DE BOER, S.H. et al. **Pathogen indexing technologies**. London: Academic, 1996. p.27-57.

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

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

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M.S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOAK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, ago. 1993. Suplemento/Resumo.

ESAU, K. Anatomic effects of the viruses of pierce's disease and phony peach. **Hilgardia**, Berkeley, v.18, n.12, p.423-482, 1948.

FERNÁNDEZ, O. Muerte descendente de los brotes del cafeto causada por espécies de *Phoma* e *Colletotrichum*. **Cenicafe**, Colômbia, v.12,n.3, jul./set. 1961.

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

FERREIRA, J.B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. CD ROM.

FRENCH, W.J.; STASSI, D.L. Response of phony- infected peach trees to gibberellic acid. **HortScience**, St. Joseph, v.13, n.2, p.158-159, 1978.

GRIFFITHS, E.; GIBBS, J. N.; WALLER, J.M. Control of coffee berry disease. **Annual Applied Biology**, London, v.67, n.1, p.45-74, Jan. 1971.

HANNIG, E. Zur physiologie pflanzlicher embrionem. I. Ueber die Kultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosacks. **Botanische Zeitung**, v.62, p.45-80, 1904.

HARAKAVA, S. et al. Detection of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis, by western blotting. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.20, p.53, 1994.

HARTUNG, J.S. et al. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other stains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, p.591-597, 1994.

HELGESON, J.P.; DEVERALL, B.J. (Ed.). **Use of tissue culture and protoplasts in plant pathology**. New York: Academic, 1983. 194p.

HINDORF, H. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: a review. **Journal of Coffee Research**, Karnatak, v.5, n.3/3, p.43-56, 1975.

HINDORF, H. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: a review. **Journal of Coffee Research**, Karnatak, v.5, n.3/3, p.43-56, 1975.

HOPKINS, D.L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, p.415-418, 1981.

HOCKING, D. Brown blight (*Colletotrichum coffeanum* Noack) of arabica coffee in East Africa. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.58, p.409-421, 1966.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; CAVALCANTI, L.S. Levantamento da ocorrência de *Xylella fastidiosa* em cafeeiros na região Sul de Minas gerais. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.117, 2001.

LEE, R.F. et al. Phytotoxin(s) produced in culture by the pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p.886-888, 1982.

LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R.; CARLOS, E.F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões

cafeeiras, e seu isolamento in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.392-393,1996.

LIMA, J.E.O. et al. Diagnose da clorose variegada dos citros por microscopia óptica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.370-374, 1997.

LIMA, J.E.O. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, n.1, v.82, p.94-97, 1998.

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

LOPES, J.R.S. **Mecanismos de transmissão de Xylella fastidiosa por cigarrinhas**. Laranja, v.17, p.79-92. 1996.

LOPES, S.A. Reação diferencial de variedades de fumo à *X. fastidiosa* de cítricos e cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.62, 2002. (Suplemento).

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.

MANANDHAR, L.B. et al. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, v.75, n.6, p.705-709, 1985.

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.229-263, 1994.

MASABA, D.; WALLER, J.M. Coffe berry disease: the pathogen and its hosts. In: BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. London: CAB International,1992.388p.

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

MATIELLO, J.B. et al. "**Amarelinho**" ou **requieima das folhas do cafeeiro**: conheça e tome cuidado. São Paulo Fundação/André Tosello/CTC/Fundecitrus/Bayer, 1998. (Boletim Informativo).

Mc DONALD, J.A. A preliminary account of disease green coffee berries in Kenya colony. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.2, n.2, p.145-154, 1926.

MIRCETICH, S.M. et al. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.17-24, 1976.

MIZUBUTI, E.S.G; MATSUOKA, K.; PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella fastidiosa* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Zona da mata de Minas gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.241-244, 1994.

MOLLENHAUER, H.A.; HOPKINS, D.L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiological Plant Pathology**, New York, v.9, p.95-100, 1976.

MORICOCHI, L. Agronegócio café: o papel da pesquisa e da indústria. **Cafeicultura, Agronegócio de café**, v.3, n.10, dez. 2004.

NAIR, J.; CORBIN, J.B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. Pineae. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, n.8, p.777-783, Aug. 1981.

NECHET, K. DE L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. Em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1993. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

NEERGAARD, J.C. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1979. 839p.

NUTMAN, F.J.; ROBERTS, F.M. Coffee berry disease and coffee leaf rust in Kenya. **Outlook on Agriculture**, v.14, n.2, p.72-79, 1964.

OROZCO, M.E.F. et al. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Resumos...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002a. p.59.

OROZCO, M.E.F. et al. Transmissão de *Colletotrichum* spp. por café arábica (*Coffea arabica*) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas, MG, 2002b. p.93.

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

OROZCO MIRANDA, E.F. et al. Determinação da resistência de cultivares de café e evidencição de raças fisiológicas no patossistema café x *Colletotrichum* spp. no Estado de Minas gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.222, 2003b. Suplemento.

PARADELA FILHO, O. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.16, n.2, p.135-136, 1995.

PARADELA FILHO, O.O. et al. Identificação serológica da *Xylella fastidiosa*, causadora da Clorose Variegada dos citros (CVC), em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.67, 1996.

PARADELA FILHO, O. et al. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.46-49, 1997.

PARADELA FILHO, O. *Xylella* do cafeeiro não é a mesma da CVC. **Copercitrus Informativo Agropecuário**, v.12, n.143. p.20-21,1998.

PARADELA-FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2001. 11p. (Boletim Técnico, 191).

PARESQUI, L. **Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2003. 44p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

PEREIRA, I.S. et al. Pré-infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiros inoculados artificialmente. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina, PR, 2005a. CD-ROM

PEREIRA, I.S. et al. Microscopia eletrônica de varredura da infecção de *Colletotrichum* spp. em frutos de cafeeiro com mancha manteigosa. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina, PR, 2005b. CD-ROM.

PEREIRA, I.S. et al. Histopatologia de ramos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) com mancha manteigosa causada por *Colletotrichum* spp. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina, PR, 2005c. CD-ROM..

PINTO, F.G.S.; LEITE Jr., R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.254, 1999. Suplemento.

PORTO, M.D.M. et al Histopathology of *Colletotrichum trifolii* on alfafa. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.3, p.345-349, 1998.

PRATO, J.R.A. Quem diria, a *Xylella fastidiosa* sempre esteve no café. **A Granja**, v.614, p.40-43, 2000.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B. et al. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, Campinas, v.58,n.1, p.23-33, 1998.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, p.55-76, 1999.

RAPPAPORT, J. *In vitro* cultures of plant embryos and factors controlling their growth. **Botanical Review**, v.20, p.201-225, 1954.

RAYNER, R.W. Coffee berry disease, a survey of investigations carried out up to 1950. **East Africa Agricultural Journal**, Nairob, v. 17, p. 130-158, 1952.
RIBAS, A.F.; UENO, B.; LEITE JUNIOR, R.P. estudos sobre a presença da *Xylella fastidiosa* em cafeeiro não depauperado e depauperado. **Summa Phytopathologica**, v.24, n.1, p.64, 1998.

ROBERTS, R.G.; SNOW, J.P. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, v.74, n.4, p.390-397, Apr. 1984.

ROBINSON, R.A. **Terminal report of the FAO coffee pathologist to the government of Ethiopia**. Rome: FAO, 1974. 17p.

RODRIGUES NETO, J.; BERIAN, L.M.; KOMORI, N. Caracterização de isolados de *Xylella fastidiosa* de citros por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.18, p.46, 1992.

RODRIGUES NETO, J.; BERIAN, L.M.; KOMORI, N. Caracterização de isolados de *Xylella fastidiosa* associada a CVC. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.19, p.48, 1993.

ROSSETTI, V. et al. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Academic Science**, Paris, v.310, p.345-349, 1990.

SILVA, S.R. et al. Fastidian gum: The *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possible involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, n.1, p.165-171, 2001

SIMPSON, A.J. et.al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-157, 2000.

SOUZA, S.M.; CARVALHO, V.L. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.21-26, 1997.

SUTTON, B.C. **Coelomycetes**. Surrey: CMI Kew, 1980. 696p.

TIFFANY, L.H. Delayed sporulation of *Colletotrichum* on soybeans. **Phytopathology**. v.41, p.975-981, 1951.

UCHIBATA, E.Y.; LEITE Jr. R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Avaliação de meios de cultura gerais e específicos para o cultivo de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.252-257, 1992.

URIBEONDO, J.D.; FORSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. Digital image analysis of internal light apots of apressoria of *Colletotrichum acutatum*. **American Phytopatological Society**, v.93, n.8, p.923-930, 2003.

VARGAS, G.E. & GONZALEZ, U.L.C. La mancha mantecosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, Costa Rica, v.22, n.2, p.129-135, 1972.

VÁRZEA, V.M.; RODRIGUES C. J.Jr.; LEWIS, BG. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparasion with other related species from coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.2, p. 202-207, Apr. 2002.

WALLER, J. M. et al. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycol. Res.**, UK. v.97, n.8, p.989-994, Aug. 1993

WALTNICK, P.; COUTER, R. Bioflm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.2675-2679, 2000.

WELLS, J.M. et al. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.37, p.136-143, 1987.

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

YORINORI, M.A. et al. Presença de *Xylella fastidiosa* em sementes e mudas de cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DO CAFÉ DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas, MG: Embrapa Café, 2001. v.1, p.294-297.

CAPÍTULO 2

ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS DO COMPORTAMENTO DE *Colletotrichum* SPP. EM PLANTAS DE CAFEIEIRO OBTIDAS POR CULTURA DE EMBRIÃO

1 RESUMO

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. Estudos histopatológicos do comportamento de *Colletotrichum* spp. em plantas de cafeeiro obtidas por cultura de embrião. In:_____. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por de cultura de embrião.** 2006. Cap.2. p 31-62. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

Poucos são os estudos que mostram processos de estabelecimento e infecção de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro. Objetivou-se, neste trabalho, acompanhar pela microscopia eletrônica de varredura, os processos de pré e pós-penetração de diferentes isolados de *Colletotrichum* em plantas de cafeeiro obtidas por cultura de embrião. Para explantes embrionários, foram utilizadas sementes da cv. Rubi. Plantas produzidas *in vitro* foram inoculadas com 5µL de suspensão de esporos ajustada para 10⁶ conídios/mL, na região do hipocótilo e folhas, feridos com agulha entomológica. Os isolados avaliados foram: haste (IH), obtidos de ramos de planta com sintomas de mancha manteigosa, folha (IF) da mesma planta, *C. demathium* (ID), de planta de cafeeiro sadia, manga (IM) de casca de manga com sintomas de antracnose e CML 461 (*C. acutatum*). Duas horas após as inoculações, fragmentos de folhas e hipocótilos foram transferidos para microtubos de 2mL contendo solução fixadora Karnoviskyy para paralisar o crescimento fúngico. As demais amostras foram paralizadas após 5, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 114 e 144 horas após a inoculação de cada isolado. Os conídios de todos os isolados aderiram mais frequentemente nas depressões de hipocótilos e células guardas, formando um septo antes da germinação e germinaram a partir das cinco horas após da inoculação, emitindo tubos germinativos, tanto nas extremidades como lateralmente. Apressórios foram produzidos por *C. demathium* (ID) (globosos, trilobulados e em forma de vírgula), *C. acutatum* (CML 461) e *C. gloeosporioides* (IF), respectivamente globosos, 24 horas após. Hifas de todos os isolados penetraram nos tecidos pelos estômatos ou através dos ferimentos. *C. gloeosporioides* (IH e IF) produziram células conidiogênicas 48 horas após a inoculação. Acérvulos foram produzidos após 72 horas, por *C. gloeosporioides* (IH), após 96 horas, por *C. demathium* e após seis dias por *C. acutatum*. *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de manga colonizou tecidos de plantas de cafeeiro, no entanto, sem produção de acérvulo. Não foi verificado qualquer microrganismo nas plantas testemunhas.

* **Comitê de Orientação:** Mario Sobral de Abreu - UFLA (Orientador),

Eduardo Alves, UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. Histopathological studies of the behaviour of *Colletotrichum* spp. in coffee plants obtained by embryo culture. In: _____. **Histopathological studies of Buttery spot in coffee (*Coffea arabica* L.) and behaviour of *Colletotrichum* spp isolates in plants obtained by embryo culture.** 2006. Cap.2. p 31-62. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

Few are the studies that show the establishment process and infection of *Colletotrichum* spp. in coffee. The objective of this work was, through scanning electronic microscopy, follow the process of pre and post penetration of different isolates of *Colletotrichum* in coffee plants obtained by embryo culture. The embryo explants were obtained from coffee seeds cv. Rubi. Plants produced *in vitro* were inoculated with 5µL of a 10⁶ conidia/mL spore suspension, on the hypocotyl region and leaves, wounding with entomological needle. The isolates were obtained from stem (IS), part of branches of plants with symptoms of “Buttery spot”; leaf (IL) from the same plant; *C. demathium* from health coffee plant; mango (IM), from mango skin with symptoms of anthracnose and CML 461 (*C. acutatum*). Three hours after inoculation, leaves and hypocotyl fragments were transferred to 2mL-microtubes containing Karnovsk fixator to stop fungal growth. Further samples were made at 5, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 114 and 144 hours after inoculation of each isolate. Conidia of all isolate adhered more frequently in the depressions of hypocotyls and guard-cells, forming a septum before germination and germinated five hours after inoculation, releasing germinative tubes in the extremities and laterally. Appressoria were produced by *C. demathium* (globose, trilobulated and comma-shaped), *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, respectively globose, 24 hours later. Hyphae of all isolates penetrated into tissues by stomata or through wounds. *C. gloeosporioides* (IH and IF) produced conidiogenic cells 48 hours after inoculation. Acervuli were produced 72h later, by *C. gloeosporioides* (IH) 96 hours by *C. demathium* and six days by *C. acutatum*. *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango colonized coffee plant tissues. It was not verified any microorganism in control plants.

* **Adviser Committee:** Mario Sobral de Abreu - UFLA (Advisor), Eduardo Alves, UFLA (Co- advisor).

3 INTRODUÇÃO

Colletotrichum é um gênero de fungos Ascomycetes que engloba muitas espécies que causam antracnose em uma gama extensiva de hospedeiros (Bailey & Jeguer, 1992). Espécies deste gênero apresentam diversas estratégias na invasão dos tecidos hospedeiros, que vão de hemicelular hemibiotrófica a intramural intracelular necrotrófica. Além disso, estes patógenos desenvolvem uma série de estruturas de infecção especializadas, incluindo tubos germinativos, apressórios, haustórios, hifas intracelulares necrotróficas secundárias e acérvulos.

Fungos desse gênero causam doenças de importância econômica em cereais, gramíneas, legumes, vegetais e plantações perenes. As partes aéreas das plantas hospedeiras podem ser afetadas em todos estádios de maturação, desde plântula à planta adulta e semente. Os sintomas da doença são conhecidos tipicamente como antracnose e, frequentemente, incluem lesões escuras, as quais são subcirculares ou angulares e, nas quais se desenvolvem massas de esporos rosas e erupentes. As perdas são causadas pelos efeitos da doença em diferentes estádios de desenvolvimento, como, por exemplo, no estabelecimento durante o crescimento vegetativo, pela queda de frutos prematuros e inflorescências, pelas disfunções fisiológicas e fotossintéticas e pelas perdas na pós-colheita devido ao fenômeno de latência da infecção.

Na cultura do cafeeiro, *C. kahawae* ocasiona a “coffee berry disease” (CBD), atacando frutos verdes em desenvolvimento, sendo o principal fator limitante à produção na África. Entretanto, não há relato da presença desta espécie patogênica na América (Dorizzotto, 1993; Orozco, 2003). No Brasil, existem outras espécies de *Colletotrichum* spp. que ocasionam problemas na cultura do cafeeiro e constituem raças diferentes do patógeno. No entanto,

existem vários relatos de perdas significativas causadas por espécies desse gênero nos plantios brasileiros de cafeeiro (Dorizzotto, 1993; Dias, 2002; Orozco Miranda et al., 2002a,b; Várzea et al., 2002; Orozco Miranda, 2003; Costa et al., 2003; Ferreira, 2004; Lins et al., 2004; Pereira, 2005).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* tem sido baseada em critérios morfológicos e culturais, especialmente características dos conídios, presença de setas e escleródios no acérvulo e forma de apressórios. Os conídios podem ser cilíndricos, elípticos, falcados ou em forma de meia lua, como *C. graminicola*. *Colletotrichum* tem gerado grande e significativa discussão. Além de sua importância econômica, é tido como modelo para processos de infecções competindo com *Phytophthora* como o fungo patogênico de plantas mais estudado (Bailey & Jeguer, 1992). Entretanto, faltam estudos que mostrem o processo de pré e pós-penetração destes patógenos em plantas de cafeeiro.

O objetivo deste estudo foi acompanhar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, os processos de pré e pós-penetração de diferentes isolados de *Colletotrichum* em plantas de cafeeiro obtidas pela cultura de embrião.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As plantas, a partir de cultura de embrião, foram obtidas no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da mesma Universidade.

4.1 Obtenção das mudas pelo método de cultura de embrião

Foram coletadas 300 sementes, da cultivar Rubi, considerada suscetível à mancha manteigosa (Orozco, 2003), do campo experimental do setor de cafeicultura do Departamento de Fitotecnia da UFLA, no estádio verde cana, para a extração dos embriões. As sementes foram previamente selecionadas, imersas em álcool 70% por 3 minutos e transferidas para recipiente contendo hipoclorito de sódio 2,5%, onde permaneceram em agitação por 15 minutos e, em seguida, lavadas por duas vezes em água destilada-esterelizada. Os embriões intactos foram extraídos das sementes em câmara de fluxo laminar horizontal desinfestada, sob microscópio esterioscópico, utilizando bisturi e pinça previamente flambados. As cascas das sementes foram retiradas, passando pelo pergaminho até atingir o endosperma, o qual foi cuidadosamente fragmentado com a finalidade de se encontrar o embrião. A posteriori, o embrião foi colocado em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) contendo 10mL de meio nutritivo básico de Murashige & Skoog (1962), acrescido de 6 mg.L⁻¹ de GA3, com pH ajustado para 5,9 e solidificado com ágar na proporção de 7g.L⁻¹, previamente vedados com tampa de polipropileno e autoclavados à temperatura de 121°C, durante 20 minutos a 1,2 ATM. Doze horas após autoclavados, foi feita a deposição dos embriões. Em cada tubo, apenas um embrião foi depositado, sendo coletados 240 embriões. Posteriormente, o material foi transferido para sala de

crescimento à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 16M suprida por lâmpadas “grow-lux” e branca fria, na proporção de 1:1; permaneceu nessas condições por um período de um ano, quando as plantas já haviam atingido aproximadamente quatro centímetros de comprimento e emitido o quarto par de folhas.

4.2 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp. e ajuste da suspensão de esporos

Foram coletados folhas e ramos de plantas de cafeeiro da cultivar Catucaí Vermelho com sintomas de mancha manteigosa e plantas aparentemente saudáveis da mesma cultivar, em campo experimental da UFLA. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças em Plantas, do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Foram feitas seções do tecido infectado, em locais de lesões jovens, superficialmente desinfetadas com álcool 50% (1 minuto) e hipoclorito de sódio 1% (1 minuto) e lavadas em água destilada por duas vezes; em seguida, transferidas para placa de Petri contendo meio de cultura MEA 2% (extrato de malte-ágar) e incubadas por 7 dias em câmara de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após a constatação de crescimento fúngico, foram retirados fragmentos de meio com micélio e levados ao microscópio de luz para a identificação do patógeno pela descrição de Sutton (1992).

Foram obtidos dois isolados das plantas sintomáticas: isolado da haste (IH) e isolado da folha (IF). Das amostras de cafeeiro assintomáticas isolou-se *C. dematium* (ID). Após a identificação, fragmentos das colônias foram transferidos para novas placas contendo MEA 2%, para purificação dos isolados e, após sete dias de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente, foram confirmados pelos mesmos critérios.

Neste estudo também foi utilizado um isolado de manga (IM) que passou pelos mesmos critérios de isolamento e identificação descritos para os isolados de cafeeiro e o isolado CML 461 (*C. acutatum*), da Coleção Micológica de Lavras.

Para cada isolado foi ajustada e aplicada uma suspensão de esporos de 1×10^6 conídios/mL⁻¹, utilizando-se metodologia descrita por Orozco (2003).

4.3 Inoculação

Esta etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal previamente desinfestada com álcool 70% e exposta à luz ultravioleta por meia hora. Plântulas cultivadas em tubos de ensaio foram seccionadas, com bisturi esterilizado, separando-se as folhas do caule. Em placas de Petri, contendo duas folhas de papel de filtro, previamente autoclavadas, foram colocados dois suportes de plástico, esterilizados em hipoclorito por cinco horas e álcool 70% por 24 horas. Em um suporte colocou-se o caule (três centímetros) e no outro folhas de plantas. Com agulha entomológica, feriram-se o caule e as folhas e colocados 15µL de cada suspensão de conídios, utilizando-se uma micropipeta automática. As testemunhas foram inoculadas com água autoclavada. Para cada isolado, foram feitas dez placas com material inoculado, sendo uma para cada tempo amostrado. O papel de filtro foi molhado com água destilada para promover uma câmara úmida, dando condições de umidade para o crescimento fúngico. As placas de Petri foram incubadas em câmara de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

4.4 Coleta de amostras

Duas horas após a inoculação dos isolados, coletaram-se as primeiras amostras (para cada isolado uma amostra em cada tempo + a testemunha) que foram transferidas para “ependorfs” de 1,5mL contendo solução fixativa

(Karnovsky's modificado), pH 7,2 por um período mínimo de 24 horas, para serem analisadas ao microscópio eletrônico de varredura. As coletas seguintes foram realizadas as 2, 3, 5, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 114 e 144 horas após a inoculação de cada isolado.

4.5 Preparo das amostras para MEV

A preparação e a observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Análise Ultraesrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG.

4.5.1 Preparo das folhas

As amostras de folhas inoculadas (duas folhas para cada isolado em cada tempo) foram retiradas do fixador priMário e transferidas para “ependorfs” contendo tampão cacodilato 0,05M, onde permaneceram por dez minutos. O tampão foi trocado três vezes, utilizando-se uma micropipeta de plástico. Após esta etapa as amostras foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato por duas horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente as amostras foram lavadas com água destilada por três vezes e desidratadas em série de acetona (25%, 50%, 75%, 90% – 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Após esta etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030) para a complementação da secagem. Já secas, as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” (cilindros de alumínio com 12mm de diâmetro, cobertos com fita de carbono para aderência das amostras) e submetidas à metalização com ouro, no vaporizador Balzers SCD 050 e observadas em MEV.

4.5.2 Preparo dos hipocótilos para corte em nitrogênio líquido

Hipocótilos foram retirados do fixador e transferidos para glicerol 30% por 30 minutos. Em seguida, imergidos em recipiente plástico contendo nitrogênio líquido e cortados com um bisturi sobre placa de metal imersa em recipiente plástico também contendo nitrogênio líquido. Seccionados transversalmente, os fragmentos de pecíolos (aproximadamente 15) foram colocados em “eppendorfs” contendo água destilada e preparados para MEV, conforme processo descrito acima para amostras de folhas.

4.6 Avaliação dos processos de pré e pós penetração dos isolados

As amostras montadas em “stubs” e placas metalizadas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no software photopaint do pacote Corel Draw 12, onde foi selecionada a opção de visualização de tela cheia utilizando um monitor de 14”. Em cada imagem foram registradas as diferentes fases do comportamento dos isolados inoculados, desde a aderência dos conídios até a formação de acérvulos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Aderência e germinação de conídios.

A aderência dos conídios foi maior nas regiões onde haviam maiores depressões, ou seja, nas junções da epiderme das folhas e ou das células guardas (Figura 1A) e regiões do hipocótilo (Figura 1B).

Esta adesão dos conídios não só assegura que o patógeno permaneça em contato com o hospedeiro pelo tempo necessário para a penetração mas, também favorece a infecção da hifa no local da penetração. Isso é condizente com o relato de Mercure et al. (1994), quando afirmam que a adesão do esporo na superfície do hospedeiro influencia no desenvolvimento da doença, pois, uma rápida adesão dos conídios é relevante para o sucesso do estabelecimento do patógeno.

Em 1984, Irwin et al. já haviam relatado este evento quando realizaram a histopatologia de interações compatíveis envolvendo o patossistema *C. gloeosporioides* x *Stylosanthes*. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2005) quando acompanharam, pela microscopia eletrônica de varredura o início do processo de infecção de hipocótilos de cafeeiro inoculados com *C. gloeosporioides*. Porto et al. (1998) obtiveram resultados semelhantes quando inocularam *C. trifolii* em alfafa. Hamer (1998) declarou que a primeira característica essencial do processo patogênico é a fixação dos propágulos dispersos na superfície da planta. Harper & suwinburne (1979) e Liu & Kolattukudy (1998) relataram que conídios de *C. gloeosporioides* necessitam dessa aderência na superfície de contato para receber os sinais químicos da cera de superfície do hospedeiro, como o etileno e o ácido 2,3- dihidroxibenzóico, para induzir a formação de apressório.

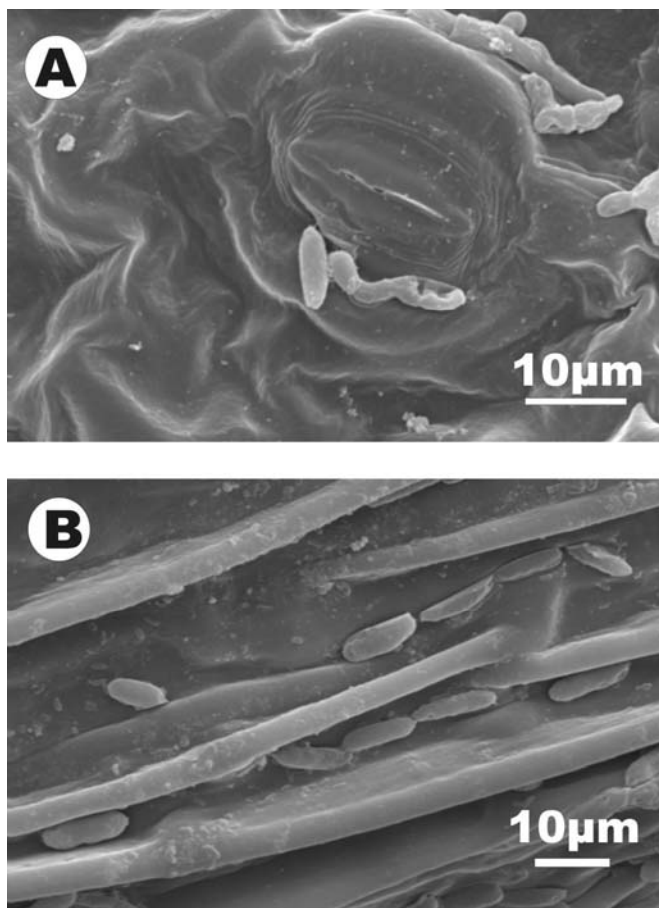


FIGURA 1 Eletromicrografia de varredura mostrando aderência de conídios em depressões de tecidos de cafeeiro: **A)** conídio de *C.acutatum* (CML 461) nas depressões de células guardas e **B)** conídio de *C. acutatum* (CML 461) em depressões do hipocótilo

Foi observado um septo nos conídios de todos os isolados, no início do processo de germinação (Figura 2A). Este evento foi observado duas horas após a inoculação para o isolado da haste e três horas para os demais. A germinação

foi observada a partir de cinco horas (Figura 2B), para isolados de *C. gloeosporioides*, doze horas, para *C. acutatum* e 24 horas, para *C. demathium*.

Vários autores afirmam que a germinação de conídios dentro desse gênero é bastante variável, iniciando-se entre 3 e 48 horas (Nair & Corbin, 1981; Golden Roberts & Snow, 1984; Manandhar et al., 1985; Bailey et al., 1992; Kumar et al., 2001; Orozco, 2003; Pereira, 2005) dependendo, ainda, de fatores externos como temperatura (Orozco, 2003), químicos (English, et al., 1971; Anderson, 1978; Harper & Swinburne, 1979; Wijesundera et al., 1989; Liu & Kolattukudy, 1998) e da presença de materiais exógenos (Bailey, et al., 1992; Skipp et al., 1995).

Em cafeeiro, Chen (2002) constatou que *C. gloeosporioides* germinou, em média, 0,3% após três horas de inoculação em folhas, enquanto que, 6 horas após a germinação, atingiu um percentual de 13,5%. No mesmo estudo foi verificada uma germinação média de 51%, 6 horas após a inoculação em frutos. Pereira et al. (2005) verificaram a germinação de *C. gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiro, 6 horas após a inoculação; este tempo também foi necessário para germinação de conídios de *C. acutatum* em *Pinus radiata* (Nair & Corbin (1981). No entanto, Vineet Kumar et. al. (2001) constataram que conídios de *C. gloeosporioides* começaram a germinar três horas após serem inoculados em folhas de amora. Conídios de *Colletotrichum capsici* necessitaram de um período de quatro horas para germinarem sobre maçã do algodoeiro (Golden Roberts & Snow, 1984). Este tempo também foi ideal para a germinação de *C. truncatum* em folhas de soja (Manandhar, et al., 1985).

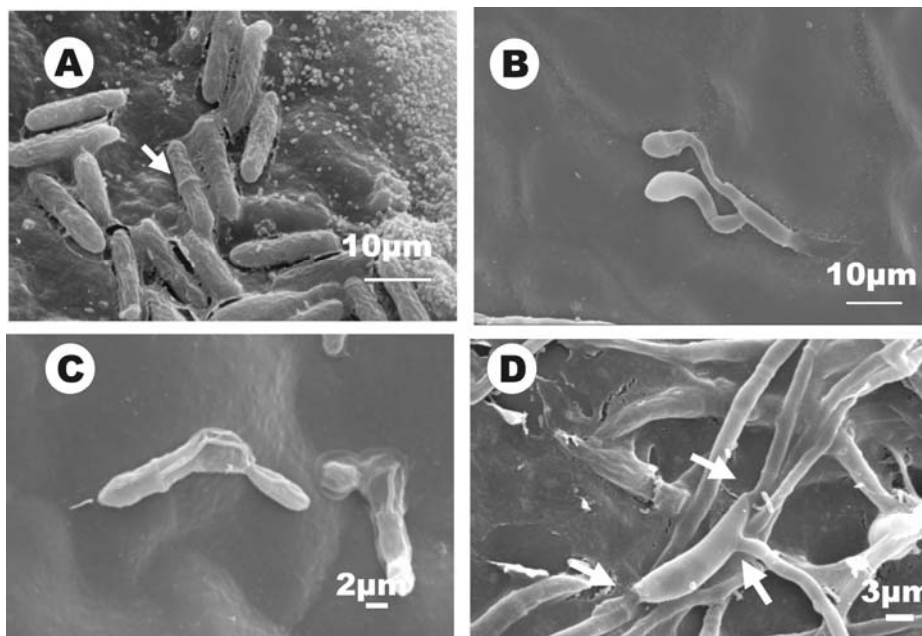


FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura mostrando: **A)** septação de conídio de *C. gloeosporioides* (IH) antes da germinação, **B)** conídio de *C. demathium* emitindo dois tubos germinativos, **C)** conídio de *C. acutatum* germinando pelas duas extremidades, **D)** conídio de *C. demathium* germinando tanto nas extremidades quanto lateralmente.

Entretanto, Porto et al. (1998) constataram que *C. trifolii*, inoculado sobre alfafa, tem taxa máxima de germinação em torno de 24 horas após a inoculação; o mesmo ocorrendo para *C. gloeosporioides*, inoculados sobre frutos de mamão (Chau & Alvarez, 1983). Estes relatos confirmam que existe grande variação no tempo de germinação entre as diferentes espécies de *Colletotrichum*, de acordo com seus hospedeiros.

Tubos germinativos foram formados, tanto nas extremidades quanto lateralmente com emissão de um (Figura 3A) *C. gloeosporioides*, dois (Figura 2C) *C. acutatum* e até três tubos germinativos (Figura 2D) *C. demathium*.

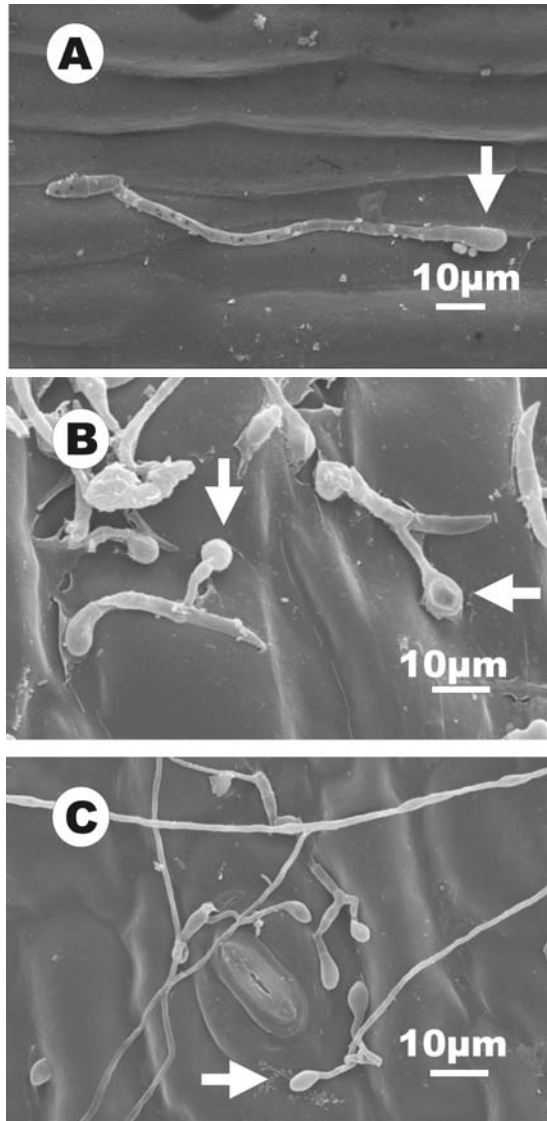


FIGURA 3 Eletromicrografia de varredura mostrando produção de apressórios ao final de tubos germinativos: **A)** apressório formado em tubo germinativo longo, multinucleado por *C. gloeosporioides* (IF) em tecido de hipocótilo de cafeeiro, **B)** apressórios formados ao final de tubos germinativos curtos por *C. demathium* e **C)** apressórios formados ao final de tubos germinativos longos por *C. demathium*.

A emissão de mais de um tubo germinativo é comumente relatada para este gênero (Nair & Corbin, 1981; Roberts & Snow, 1984; Manandhar, et al., 1985; Pereira et al. (2005). Conídios de *C. gloeosporioides* inoculados em hipocótilo de cafeeiro emitiram tubos germinativos, tanto nas extremidades quanto lateralmente (Pereira, 2005), fato também observado para *C. acutatum* f. sp. *pineae* (Nair & Corbin, 1981). Em *C. capsici*, é comum o surgimento de um a três tubos germinativos, em função dos septos presentes nesta espécie (Roberts & Snow, 1984).

O crescimento do tubo germinativo foi variável para produção de apressório em *C. demathium* para o isolado de folha. Apressórios foram formados tanto no final de tubos germinativos curtos quanto longos. Esta variação de tamanho foi verificada para *C. gloeosporioides*, em cafeeiro, por Pereira et al. (2005a).

5.5.2 Formação de apressório.

Foram observados apressórios apenas para o isolado de *C. demathium* (12 horas após a inoculação) e folha (24 horas após a inoculação). O crescimento do tubo germinativo foi variável antes da emissão do apressório. *C. gloeosporioides* (isolado de folha) forma apressório globoso a subgloboso, de contorno regular, delimitado por um septo formado pelo alongamento do tubo germinativo multinucleado (Figura 3A). Este evento acontece, possivelmente, porque a diferenciação do apressório requer síntese de proteína (Suzuki et al., 1981; Perfect et al., 1999) e é acompanhada por uma regulação precisa do comportamento nuclear. Em conídios de *C. graminicola* (Skoropad, 1967) e *C. truncatum* (Staples et al., 1976), a mitose é precedida da formação de um septo. O núcleo move-se pelo tubo germinativo, onde passa por uma segunda mitose e um segundo septo é formado; então, o núcleo simples que estava presente na célula se desenvolve em um apressório. Durante a maturação do apressório

ocorre uma mitose posterior e produz um apressório binucleado maduro que vai formar a hifa infectiva.

Em *C. demathium* (ID), observou-se apressórios globosos no final de tubos germinativos curtos ou longos (Figura 3B e C), globosos (Figura 4A) trilobados (Figura 4B) ou em forma de virgula (Figura 4C), sempre em direção aos estômatos.

Variação na forma de apressórios tem sido constatada neste gênero por vários autores. Como discutido por Sutton (1992), os apressórios são caracteres morfológicos para o gênero *Colletotrichum*, podendo ser globosos e subglobosos com e sem lóbulos. Nem todos os isolados formaram apressório, fato comumente relatado para espécies desse gênero e que pode acontecer por diversos fatores químicos, físicos ou nutricionais do hospedeiro ou do próprio patógeno. Exemplos de penetração sem formação de apressório são descritos por Brow (1975), TeBeest et al. (1978) e Porto et al. (1998). *C. capisici* penetra os tecidos de algodão diretamente mostrando preferência por células estomatais guardas, embora nunca penetrem os tecidos por aberturas do estômato (Robert & Snow, 1984)

Maior formação de apressórios foi observada quando conídios germinaram sobre depressões nos tecidos do hipocótilo (Figura 4d). Neste estudo, os conídios foram colocados na superfície em gotas de água. É possível que a gravidade da flutuação dos esporos agiu para depositar os conídios acima, nas paredes anticlinais, as quais ocorrem nas depressões das células epidérmicas; como resultado, os apressórios são formados mais acima das paredes anticlinais do que na superfície das células. Existem conflitos sobre a topografia do hospedeiro na formação do apressório. Por Exemplo Swinburne (1983) mostrou que a distribuição do apressório na superfície da folha de banana foi diferente daquela na superfície do fruto, indicando que a superfície da folha sozinha, não influencia a formação de tal estrutura.

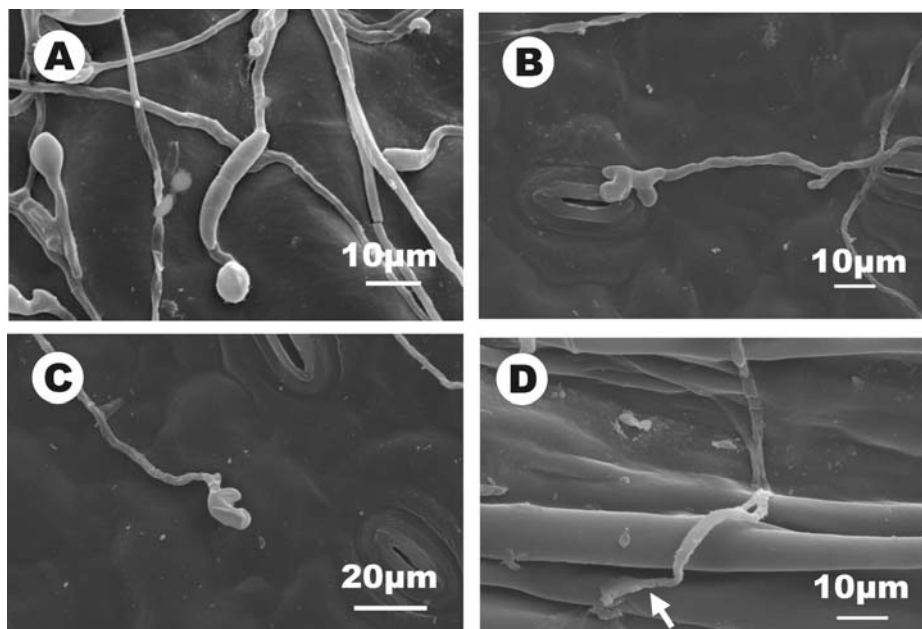


FIGURA 4 Eletromicrografia de varredura mostrando formas de apressórios de *C. demathium*. **A)** apressório globoso, **B)** apressório trilobado, **C)** em forma de vírgula, **D)** mostrando que a produção de apressório foi mais intensa quando os conídios ficaram depositados em regiões anteclineais dos tecidos de hipocótilos.

Os apressórios foram formados no final de tubos germinativos e as vezes produzidos no ápice de hifas, eventos também verificado em outros estudos (Dey, 1933; Sutton, 1968; Lenné, 1978; Cox & Irwin,1988.).

5.5.3 Conidiogênese e formação de acérvulo.

Somente observou-se acérvulo no isolado da haste e em *C. demathium* e *C. acutatum* (CML 461). No entanto, o isolado de folha exibiu conidióforo, mostrando a conidiogênese enteroblástica fialídica típica do gênero *Colletotrichum*, fenômeno observado em tecido do pecíolo. (Figura 5A). Este evento foi verificado também para o isolado da haste 24 horas após a inoculação e isolado de manga às 96 horas após a inoculação. Este último isolado produziu células conidiogênicas também lateralmente em hifas (Figura 5B), fato igualmente verificado para o isolado da haste 48 horas após (Figura 5C) e *C. acutatum* (I 461), 72 horas após a inoculação (Figura 5D).

O isolado de haste (*C. gloeosporioides*) produziu acérvulo a partir de conidióforos formados sobre uma base estromática subcuticular que rompeu a cutícula (Figura 6A), ou saiu pelas aberturas estomatais (Figura 6B) e 72 horas após a inoculação, produziram setas, expondo as frutificações (Figura 6C). Posteriormente, foram produzidos conídios nas extremidades das setas dos acérvulos (Figura 6D). Isso foi observado até 144 horas após a inoculação quando a produção de acérvulo foi bastante acentuada (Figura 7A). Os acérvulos produzidos por *C. demathium* foram observados em tecidos do hipocótilo a partir de 96 horas após a inoculação, com produção de setas pontiagudas (Figura 7B, C). Não foi verificada produção de conídios nas extremidades das setas. O isolado CML 461 (*C. acutatum*) exibiu acérvulos em tecidos do hipocótilo, sem produção de setas, seis dias após a inoculação (Figura 7D).

Até o presente, apenas um autor constatou formação de acérvulo em tecidos de cafeeiro inoculados com *C. gloeosporioides* em microscópio de luz, nove dias após a inoculação (Orozco, 2003). Para outros patossistema, poucos estudos mostraram este evento por meio da microscopia eletrônica. Em amora *C. gloeosporioides* produziu abundantes conidióforos, que romperam a epiderme para formar acérvulos, seis dias após a inoculação (Kumar et al., 2001).

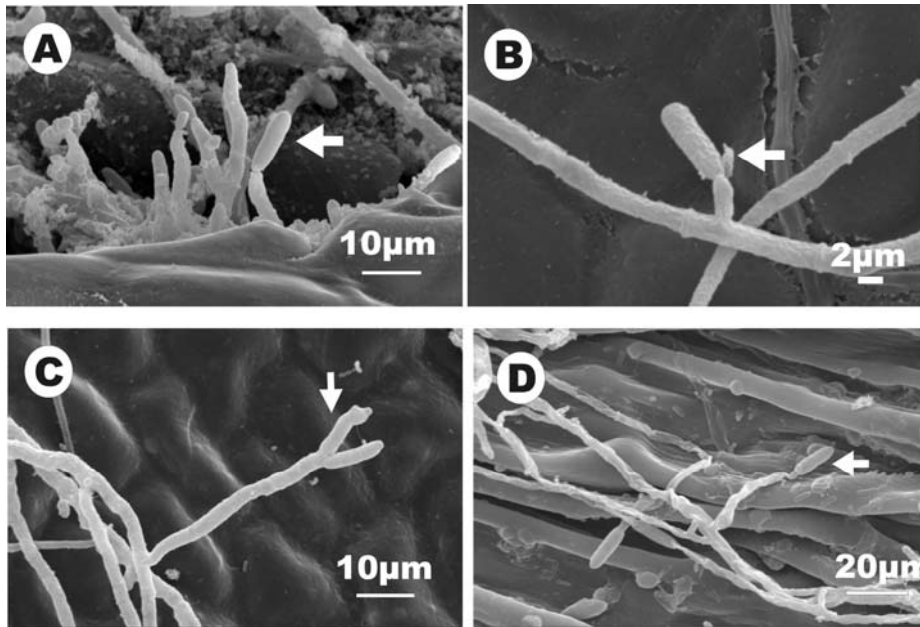


FIGURA 5 Eletromicrografia de varredura mostrando células conidiogênicas enteroblásticas filídicas de *C. gloeosporioides*: **A)** células conídiogênicas de *C. gloeosporioides* (IF) em tecidos de folha de cafeeiro, **B)** células conidiogênicas formadas lateralmente em hifas, por *C. gloeosporioides* (IM), **C)** células conidiogênicas formadas lateralmente em hifas, por *C. gloeosporioides* (IH) e **D)** células conidiogênicas formadas em hifas, por *C. gloeosporioides* (IH).

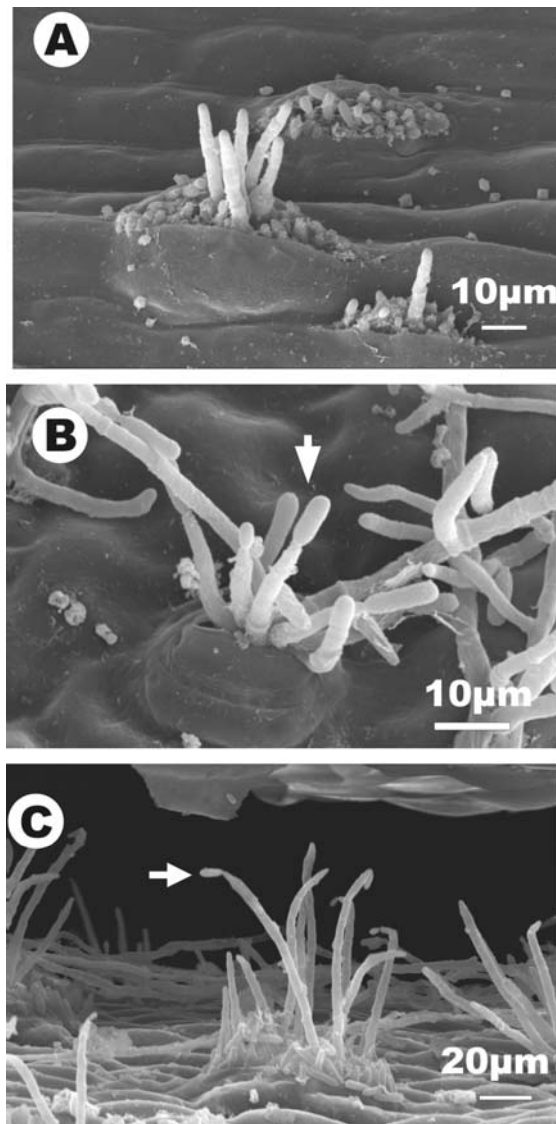


FIGURA 6 Eletromicrografia de varredura mostrando formação de acérvulos por *C. gloeosporioides* (IH): **A**) início de formação de acérvulo em tecido de hipocótilos, **B**) acérvulo formado em estômato e **C**) acérvulo com produção de conídios nas extremidades das setas.

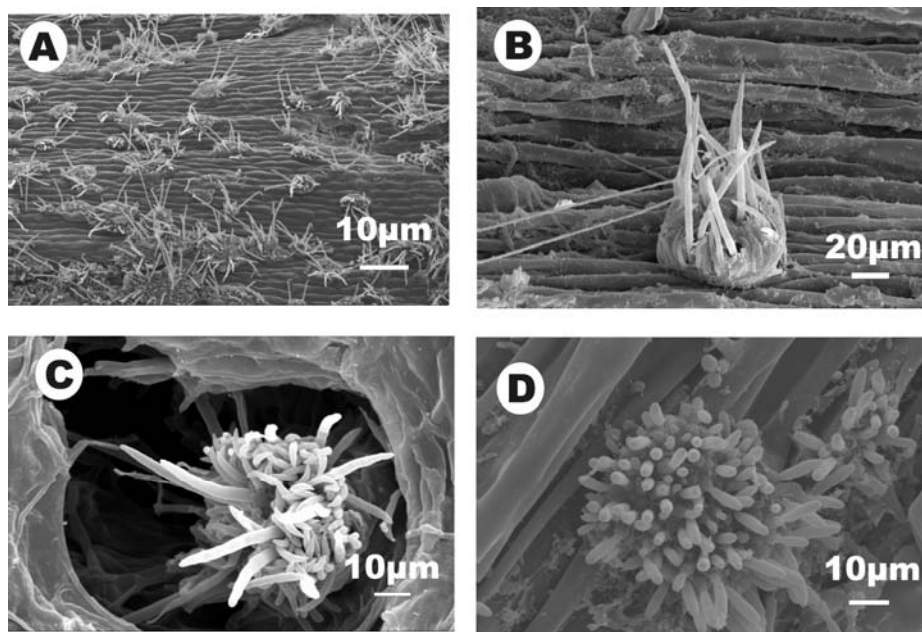


FIGURA 7 Eletromicrografia de varredura mostrando produção de acérvulos por *Colletotrichum* spp.: **A)** produção intensa de acérvulos em tecido do hipocótilo pr *C. gloeosporioides* (IH), **B)** acérvulo formado em tecido do hipocótilo por *C. demathium*, **C)** acérvulo formado em folha, no local do ferimento, por *C. demathium* e **D)** acérvulo formado em tecido de hipocótilo por *C. acutatum* (CML 461).

Nair & Corbin (1981) verificaram produção de acérvulos em plântulas de *Pinus radiata*, 96 horas após a inoculação, pela microscopia de luz. Manandhar (1985), por meio de microscopia de varredura, observou produção de acérvulo por *C. truncatum* em folhas de soja entre 48 e 72 horas após a inoculação. No presente estudo foi verificado que *C. gloeosporioides* (IH) produz acérvulos neste mesmo intervalo; enquanto *C. acutatum* produz após 96 horas e *C. demathium*, 144 horas após.

5.5.4 Colonização dos tecidos internos.

Tecidos do córtex, xilema e floema dos hipocótilos e mesófilos de folhas foram invadidos por hifas de todos os isolados a partir de 48 horas após a inoculação (Figura 8A) e isso foi evidenciado até o sexto dia. As hifas perfuraram as células e foram tomando todo o tecido do hospedeiro em todas as direções (Figura 8B). Não foi verificada penetração de hifas nos tecidos sem ferimentos para isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Após a penetração da hifa primária, formou-se uma hifa secundária mais fina crescendo rapidamente através e entre as células. Uma vez tendo penetrado no mesófilo foliar e ou no córtex de hipocótilos, a hifa aumentou de duas a três vezes o diâmetro e colonizou os espaços intercelulares causando destruição extensiva dos tecidos (Figura 8C). Não foram verificados microrganismos nas testemunhas inoculadas com água autoclavada (Figura 9A, B).

Embora outros trabalhos tenham mostrado eventos de pré e pós-penetração, nenhum tinha documentado, ainda, estes eventos com isolados de diferentes espécies de *Colletotrichum* em plantas de cafeeiro. A Tabela 1 registra o sumário dos resultados do presente estudo. O trabalho discutido aqui demonstrou os processos de *Colletotrichum* spp. pertinente às diferentes fases de desenvolvimento do fungo e interações do fungo-planta, contribuindo para melhores esclarecimentos para esse patossistema. Foi possível constatar que *C. gloeosporioides*, isolado de manga e *C. acutatum*, isolado de pimentão (CML 461), são capazes de colonizar tecidos de cafeeiro. No entanto, *C. gloeosporioides* (IH) mostrou-se mais agressivo durante o processo de colonização e formação de estruturas reprodutivas. No entanto, este trabalho é pioneiro na demonstração desses eventos em plantas de cafeeiro com diferentes isolados. Dessa forma, sugere-se que outras pesquisas sejam desenvolvidas, pois, ainda existem muitas outras espécies para serem estudadas e, mais provavelmente, outras estratégias de infecção deverão ser descobertas.

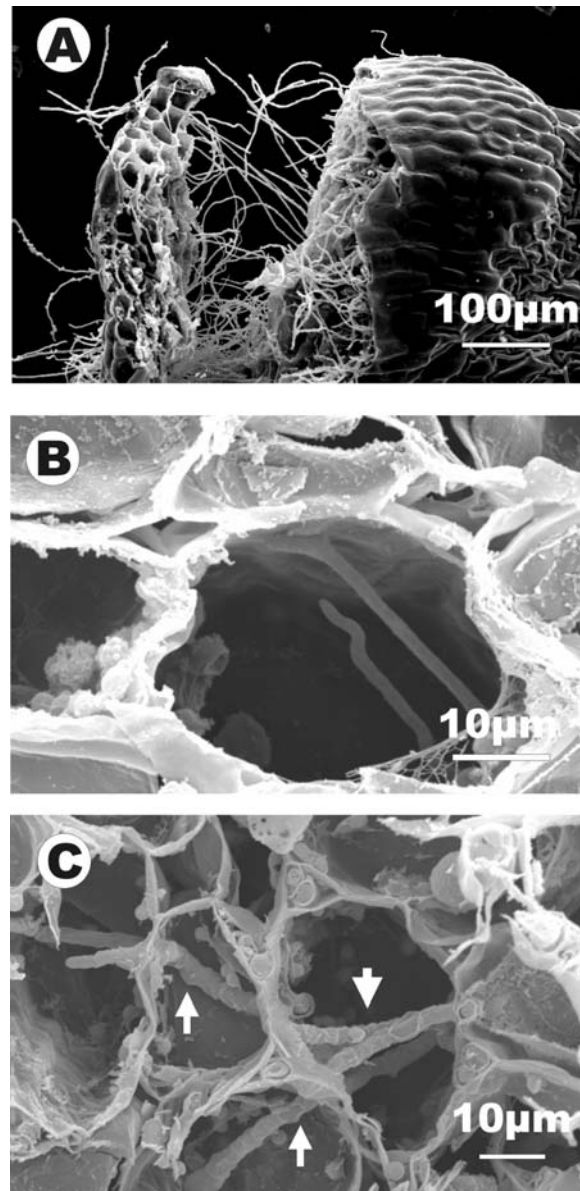


FIGURA 8 Eletromicrografia de varredura mostrando tecidos de hipocótilos colonizados por hifas de *Colletotrichum* spp. **A)** *C. demathium*, **B)** *C. gloeosporioides* (IM) e **C)** mostrando engrossamento de hifas após intensa colonização (IH).

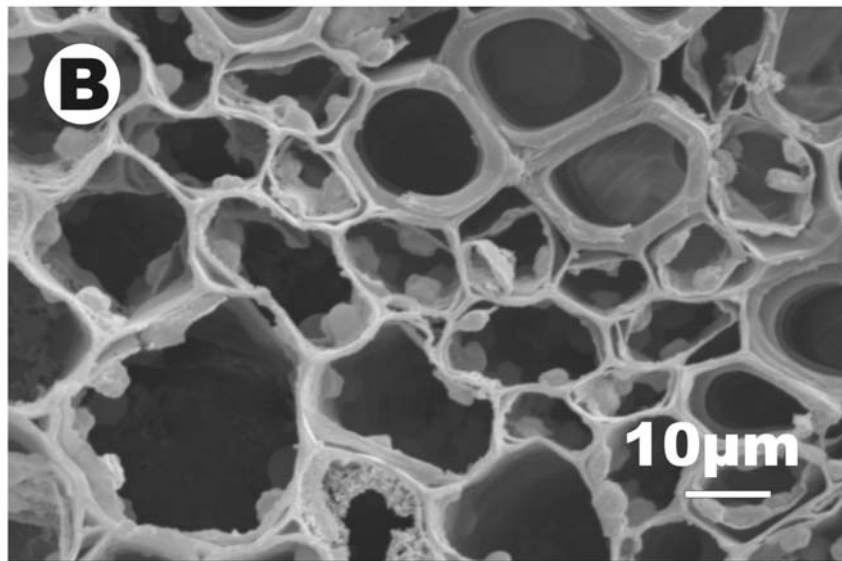
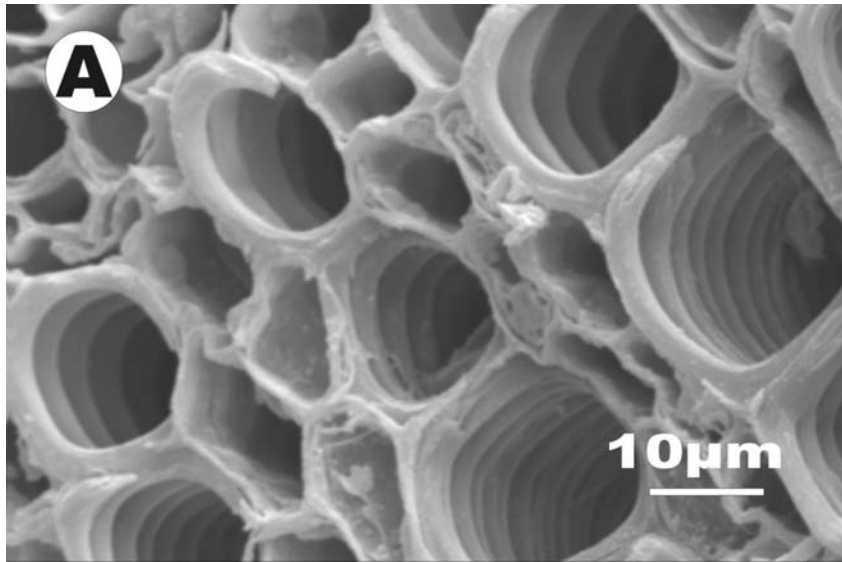


FIGURA 9 Eletromicrografias eletrônicas de varredura mostrando tecidos de hipocótilos inoculados com água, 114 horas após a inoculação. A) região do xilema, B) região cortical e do xilema

TABELA 1 Resumo das estruturas formadas pelas espécies de *Colletotrichum*, inoculados em folhas e hipocótilos de cafeeiro considerando a evolução no tempo para os diferentes eventos da penetração, colonização e reprodução.

Isolados ¹	Estruturas formadas (tempo após inoculação) ²					
	FSAG	GCFTG	FA	PC	PA	MP
<i>C. gloeosporioides</i> (IH)	2 horas	5 horas	NO ³	24 horas	72 horas	F ⁴
<i>C. gloeosporioides</i> (IF)	3 horas	5 horas	24 horas	48 horas	NO ³	F ⁴
<i>C. gloeosporioides</i> (IM)	3 horas	5 horas	NO ³	96 horas	NO ³	F ⁴
<i>C. demathium</i> (ID)	3 horas	12 horas	NO ³	NO ³	96 horas	F/E ⁵
<i>C. acutatum</i> (CML-461)	3 horas	24 horas	12 horas	72 horas	144 horas	F ⁴

(**FSAG**)² Formação de septo antes da germinação (**GCFTG**)² Germinação do conídio e formação do tubo germinativo (**FA**)² Formação de apressório (**PC**)² Produção de conidioforo (**PA**)² Produção de acérvulo (**MP**)² Modo de penetração (**NO**)³ Não observado até o final do experimento (**F**)⁴ Ferimento (**F/E**)⁵ Ferimento e estômato (**IH**)¹ Isolado da haste (**ID**)¹ Isolado de cafeeiro (**IF**)¹ Isolado de folha (**IM**)¹ Isolado de manga (**CML 461**)¹ Coleção Micológica de Lavras.

6 CONCLUSÕES

Colletotrichum gloeosporioides (IM), *C. demathium* (ID) e *Colletotrichum acutatum*, isolados de pimentão (CML 461) colonizam tecidos de cafeeiro mais tardiamente quando comparados com *C. gloeosporioides* (IH) isolado de plantas com sintomas de mancha manteigosa.

Colletotrichum gloeosporioides (IF) isolado de planta de cafeeiro com sintoma de mancha manteigosa foi menos eficiente no tempo para os processos de colonização que *C. gloeosporioides* (IH) isolado de ramo com sintoma da doença.

Conídios de *Colletotrichum* spp (IH, IF, IM, ID, CML 461) germinam em plantas de cafeeiro 5 horas após a inoculação e a diferenciação do tubo germinativo em apressório ocorre 24 horas após (IF, CML 461).

Em hipocótilos de cafeeiro, acérvulos são formados a partir de 72 horas por *C. gloeosporioides* (IH) a partir de 96 horas por *C. demathium* (ID) e 114 por *C. acutatum* (CML 461).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, G.N. Extracellular enzymes produced by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Helminthosporium maydis* during growth on isolated bean and corn cell walls. **Phytopathology**, n.68, p.1585-1589, 1978.
- BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Londres: CAB International, 1992. 388p.
- BAILEY, J.A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum biology, pathology and control**. Londres: CAB, 1992. p.88-120.
- BROWN, G.E. Ultrastructure of penetration of athylene-degreened Robinson's tangerines by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, n.67, p.315-320, 1977.
- CHAU, K.F.; ALVAREZ, A.M. A histological study of antracnose on *Carica papaya*. **Phitopatology**, St. Paul, v.73, n.8, p. 1113-1116, Aug. 1983.
- CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries**. 2002.163p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica)- Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- COSTA, H.; VENTURA, J.A.; FERRÃO, M.A. Mancha manteigosa em café arábica na região serrana do Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro, BA **Anais...** Porto Seguro, BA: EMBRAPA Café, 2003. p.206.
- COX, M.L.; IRWIN, J.A.G. Conidium and appressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Sytenmatic Botany**, n.1, p.139-149, 1988.
- DEY, P.K. Studies in the physiology of the appressoria of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Botany**, n.47, p.305-312. 1933.
- DIAS, M.D. **Caracterização morfológica, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. em *Coffea arabica*L.** 2002. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

ENGLISH, P.D.; JURALE, J.B. AND ALBERSHEIM, P. Host pathogen interactions parameters affecting polysaccharide degrading enzyme secretion by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Olan Physiology**, n.47, p.1-6, 1971.

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

GOLDEN ROBERTS, R.; SNOW, J.P. Histopathology of cotton rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, n.74, p.390-397, 1984.

HAMER, J.E. et al. A mechanism for surface attachment in spore of a plant pathogenic fungus. **Science**, v.239, p. 288-290, 1998.

HARPER, D.B.; SWINBURNE, T.R. 2,3 Dihydroxybenzoic acid and related compounds as stimulants of germination of conidia of *Colletotrichum musae* (Bok. And Cwt.) Arx. **Physiological Plant Pathology**, n.14, p.363-370, 1979.

HINDORF, H. *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica*: a review. **Journal of Coffee Research**, Karnatak, v.5, n.3/3, p.43-56, 1975

IRWIN, J.A.G.; TREVORROW, P.R.; CAMERON, D.F. Histopathology of compatible interactions involving biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* that cause anthracnose of *Stylosanthes* spp. **Australian Journal of Botany**, n.32, p.631-640, 1984.

KUMAR, V. et al. Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on Mulberry Leaf Causing Black Spot Disease. **Phytopathology**, n.149, p.629-633, 2001.

LENNÉ, J.M. **Studies on the biology and taxonomy of *Colletotrichum* species.** 1978. PhD Thesis, (Pós-Doutorado em Fitopatologia)-University of Melbourne, Australian.

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

LIU, Z-M.; KOLATTUKUDY, P.E. Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a ubiquitin-conjugating enzyme by yeast complementation. **Journal Bacteriology**, p.180, p.3592-3597, 1998.

MANANDHAR, L.B. et al. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, v.75, n.6, p.705-709, 1985.

MERCURE, E.W.; KUNOH, H.; NOCHOLSON, R.L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. **Phyological and Molecular Plant Pathology**, London, v.45, n.6, p. 407-720, Dec. 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIR, J.; CORBIN, J.B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. Pineae. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, n.8, p.777-783, Aug. 1981.

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

OROZCO, M.E.F. et al. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Resumos...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002a. p.59.

OROZCO, M.E.F. et al. Transmissão de *Colletotrichum* spp. por café arábica (*Coffea arabica*) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas, MG, 2002b. p.93.

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

PEREIRA, I.S. et al. Pré-infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiros inoculados artificialmente. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina, PR, 2005. CD-ROM.

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

PORTO, M.D.M. et al. Histopathology of *Colletotrichum trifolii* on alfafa. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.3, p.345-349, 1998.

ROBERTS, R.G.; SNOW, J.P. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, v.74, n.4, p.390-397, Apr. 1984.

SKIPP, R.A. et al. *Colletotrichum*. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U.S.; SINGH, R.P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxiford: Oxiford Pergamon/Elsevier Science, 1995. v.2, p.119-142.

SKOROPAD, W.P. Effect of temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form appresoria and penetrate barley leaves. **Canadian Journal of Plant Science**, n.47, p.431-434, 1967.

STAPLES, R.C.; LACCETTI, L. AND YANIV, Z. Appresorium formation and nuclear division in *Colletotrichum truncatum*. **Archives of Microbiology**, n.109, p.75-84, 1976.

SUZUKI, K. et al. Protein synthesis during germination and appresorium formation of *Colletotrichum lagenarium* spores. **Journal of General Microbiology**, n.124, p.61-69, 1981.

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

SUTTON, B.C. The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum falcatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, n.46, p.873-876, 1968.

SWINBURNE, T.R.; BROW, A.E. Appressoria development and quiescent infections of banana fruit by *Colletotrichum musae*. **Transactions of the British Mycological Society**, n.80, p.176-178, 1983.

TeBEEST, D.O.; TEMPLETON, G.E.; SMITHI, R.J. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* on northern jointvetch. **Phytopathology**, n.68, p.1271-1275, 1978.

VÁRZEA, V.M.; RODRIGUES C. J.Jr.; LEWIS, B.G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.2, p. 202-207, Apr. 2002.

VINEET, K. XX, et al. Surface Ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. **Phytopathology**, n.149, p. 629-633, 2001.

WIJESUNDERA, R.L.C. et al. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n.34, p. 403-413, 1989.

CAPÍTULO 3

**ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIIS DE HIPOCÓTILOS DE CAFEIRO
(*Coffea arabica* L.), CULTIVARES CATUCAÍ VERMELHO E
AMARELO, ORIUNDOS DE SEMENTE DE PLANTAS COM E SEM
SINTOMAS DE MANCHA MANTEIGOSA.**

1 RESUMO

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. Estudos ultraestruturais em hipocótilos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo, oriundos de semente com e sem sintomas de mancha manteigosa. In: _____. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas por de cultura de embrião.** 2006. Cap.3. p 63-80. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

A semente é um veículo importante para transmissão, disseminação e sobrevivência de fitopatógenos. Há vários relatos de *Colletotrichum* spp transmitido pelas sementes, causando significativas perdas de produção. Estudos para avaliar a transmissão desse microrganismo por sementes de cafeeiro são raros e as informações disponíveis sobre este evento ainda não estão claras. Os objetivos do presente estudo foram: avaliar a percentagem de germinação de sementes de cafeeiro com e sem sintomas de mancha manteigosa, assim como a produção de plântulas e verificar, por meio de cortes histopatológicos dos pecíolos e plaqueamento em meio para crescimento de fungos (MEA 2%), a presença de estruturas do patógeno. Foram usadas sementes das cultivares Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo de diferentes campos,. Sendo,: lote 1: Catucaí Vermelho, de Campos Altos, MG, safra 2005 (sadias); lote 2: Catucaí Vermelho, de Lavras, MG, safra 2004 (doentes); lote 3: Catucaí Amarelo, do Londrina, PR, safra 2005 (doentes); lote 4: Catucaí Amarelo 2SL, de Campos Altos, MG, safra 2005 (sadias); lote 5: Catucaí Amarelo, de Carmo de Minas, MG, safra 2005 (doentes).e lote 6: Catucaí Amarelo 2SL, de Lavras, MG, safra 2005 (sadias). Sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa tiveram a germinação retardada em relação às sementes de plantas sem sintomas. Sementes sadias tiveram porcentagens semelhantes de germinação; lote 2, 97%, lote 6, 98% e lote 4, 100%. Sementes de plantas com sintomas da doença tiveram menor percentagem de germinação, exceto o lote 3, com 92%. Nos lotes 1 e 5, respectivamente 50% e 35,7% das sementes plantadas germinaram e formaram plântulas. Houve crescimento fúngico nos plaqueamentos dos lotes 1, 3 e 5, no primeiro plaqueamento. No segundo e terceiro plaqueamentos, apenas foi verificado crescimento para os lotes 3 e 5. Na quarta amostragem, não houve crescimento fúngico. Conídios de *Colletotrichum* sp. estavam presentes em células do córtex de pecíolo em plântulas dos lotes 1 e 5, na primeira amostragem e no 5 na segunda amostragem; nas demais não verificaram-se estruturas fúngicas. Observou-se, por meio da microscopia eletrônica de varredura a presença de bactérias semelhantes a *X. fastidiosa* em hipocótilos dos lotes três e cinco, na segunda e terceira amostragens.

***Comitê de orientação:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRAT

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. Ultrastructural studies of coffee hypocotyls (*Coffea arabica* L.), from the cultivars Catucaí Vermelho e Amarelo, obtained from seeds with and without symptoms of Buttery spot in different growth stages. In: _____. **Histopathological studies of Buttery spot in coffee (*Coffea arabica* L.) and behaviour of *Colletotrichum* spp isolates in plants obtained by embryo culture.** 2006. Cap.3. p 63-80. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

It is well-known the importance of seeds in the transmission, dissemination and survival of pathogens. There are various reports of *Colletotrichum* spp transmitted by seeds causing significant yield loss and studies to evaluate transmission of these fungi by coffee seeds were rare and the available information about the event is unclear. The objectives of the present study were to evaluate the percent germination of seeds with and without symptoms of “Buttery spot” as well as production of plantlets and verify, through histopathological petiole cuts and plate in fungal growth media (MEA 2%) the presence of structures of pathogen in plant tissues. It was used seeds from the cultivar Catucaí Vermelho e Amarelo from different fields: (1) Catucaí Vermelho, de Campos Altos - MG, harvest 2005 (health); (2) Catucaí Vermelho, de Lavras - MG, harvest 2004 (diseased); (3): Catucaí Amarelo, from Paraná -PR, harvest 2005 (diseased); (4) Catucaí Amarelo 2SL, from Campos Altos - MG, harvest 2005 (health); (5): Catucaí Amarelo 2SL, from Lavras, MG, harvest 2005 (health) and (6): Catucaí Amarelo, from Carmo de Minas, MG, harvest 2005 (diseased). Plant seeds with symptoms of “Buttery spot” had a lower plant growth rate compared to plants that came from plants without symptoms. Health seeds had close percent germination: (2), 97%, (6) 98% and (4) 100%, while seeds from symptomatic plants had a lower percent germination but sample (3) with 92%. For (1) and (5), 50% and 35.7% of planted seeds germinated, respectively and formed health plants. There was fungal growth in platings for (1), (3) and (5), in the first assay. In the second and third ones, it was only observed growth for (3) and (5). In the fourth sampling, there wasn't fungal growth. Conidia of *Colletotrichum* sp. were present in cortex cells of the petiole in plants from (1) and (5). in the first sampling and from (5) in the second sampling; in the other ones there was not observed any fungal structure.

***Adviser Committee:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Advisor); Eduardo Alves – UFLA (Co- **advisor**).

3 INTRODUÇÃO

A semente é o órgão de propagação de plantas produzido por meio de processo sexuado. É constituída, basicamente, de tegumento, embrião (eixo embrionário + cotilédones) e endospermas (estes podem estar ausentes), responsável pela propagação de 90% das espécies utilizadas para alimentação humana. Além de ser o componente essencial da sustentação da vida, constitui componente essencial da economia e do comércio mundial. Assim, são produzidas e transportadas globalmente para serem consumidas. De acordo com Menten et al. (2005), sementes são utilizadas na propagação das principais culturas do Brasil, entre elas soja, milho, feijão, arroz, cafeeiro, trigo, algodão, fumo e tomate.

Agentes fitopatogênicos são capazes de associar-se, de maneira quase sempre imperceptível, às sementes de seus hospedeiros, podendo, a partir daí, sobreviver por longos períodos, ser disseminados e causar sérios prejuízos ao agricultor. Segundo Machado (1994), a importância da ocorrência de patógenos em sementes pode ser avaliada sob diferentes focos, culminando com o aspecto econômico que cada interação patógeno-hospedeiro determina. *Colletotrichum* spp. tem sido descrito por vários autores como sendo transmitido por sementes nas mais diversas culturas (Tiffany, 1951; Neergaard, 1979; Tanaka & Machado, 1985; Machado, 1988; Machado, 1994; Talamini et al. 2001) e, inclusive, no cafeeiro (Orozco et al., 2002a,b; Orozco, 2003; Lins, et al., 2004), causando sérios problemas às plantações. Na cultura do cafeeiro, no Brasil, Noack (1902) relatou a presença deste patógeno associado a frutos de cafeeiro. Alves & Castro (1998) mencionam que *Colletotrichum* spp. pode ser encontrado nas fases verde-cana e cereja.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a percentagem de germinação de sementes de cafeeiro provenientes de plantas com e sem sintomas de mancha manteigosa bem como a produção de plântulas e verificar, por meio de cortes histopatológicos dos hipocótilos, a presença de estruturas dos patógenos nos tecidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e seleção das sementes

Foram obtidos lotes de sementes de plantas com e sem sintomas de mancha manteigosa, de diferentes campos de plantio sendo, lote 1: Catucaí Vermelho, de Lavras, MG, safra 2004 (doentes); lote 2: Catucaí Vermelho, de Campos Altos, MG, safra 2005 (sadias); lote 3: Catucaí Amarelo, do Londrina, PR, safra 2005 (doentes); lote 4: Catucaí Amarelo 2SL, de Campos Altos, MG, safra 2005 (sadias); lote 5: Catucaí Amarelo, de Carmo de Minas, MG, safra 2005 (doente); e lote 6: Catucaí Amarelo 2SL, de Lavras, MG, safra 2005 (sadias). Foram selecionadas 70 sementes de cada lote, escolhendo-se as maiores.

4.2 Preparo e plantio das sementes

Os pergaminhos foram retirados manualmente e, em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente, desinfestadas com álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 2% por um minuto e novamente lavadas em água destilada por duas vezes. Posteriormente, as sementes foram colocadas em béquer de vidro com capacidade para 500mL contendo água destilada e submetidas à embebição por quatro horas.

Com pinça esterilizada, transferiram-se as semente para bandejas plásticas forradas com papel germitest umedecido com água destilada, posicionando-se 70 sementes de cada lote por bandeja. Após o plaqueamento, colocaram-se papéis umedecidos por cima e as bandejas foram envolvidas com sacos plásticos, vedadas com fita adesiva e acondicionadas em BOD a temperatura de 25°C e 12 horas de fotoperíodo, onde permaneceram até a germinação das sementes, quando emitiram as primeiras radículas, com 18 dias.

A germinação foi monitorada diariamente umedecendo-se e trocando-se a câmara úmida quando necessário. Esta etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar.

4.3 Germinação das sementes e produção de plântulas

Foram consideradas germinadas as semente que emitiram radículas com tamanho de um centímetro (fase conhecida como esporão). Após 18 dias as sementes germinadas foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato Plantmax®. Plântulas produzidas foram consideradas as que cresceram até o estágio palito de fósforo e, posteriormente, emissão de folhas. Foi promovida câmara úmida montando-se uma estrutura com base de madeira e suportes de arame de alumínio cobertos com plástico transparente. As bandejas foram levadas para câmara de crescimento vegetal à temperatura de 28°C e 16 horas de fotoperíodo. Realizou-se molhamento diário do substrato e pulverização do material vegetal que permaneceu nestas condições por 120 dias.

4.4 Coleta das amostras

Foram realizadas amostragens destrutivas. Trinta dias após o plantio, em estágio palito de fósforo, foi realizada a primeira amostragem. Foram coletados cinco hipocótilos de cada lote, que foram seccionados em três partes. Duas partes foram colocadas em tubos de microcentrífuga contendo fixador Karnovsky, para posteriores estudos ultraestruturais. A terceira foi desinfestada com álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 2% por um minuto, lavada em água destilada por duas vezes e plaqueada em MEA 2%, para verificação de crescimento fúngico. Os hipocótilos de cada lote foram plaqueados separadamente. As coletas e plaqueamentos seguintes foram realizados a cada trinta dias totalizando quatro amostragens.

4.5 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos dos hipocótilos foram retirados do fixador (Karnovsky) e transferidos para glicerol 30% por 30 minutos. Em seguida, foram imersos em recipiente plástico contendo nitrogênio líquido e cortados com bisturi sobre uma placa de metal imersa em recipiente plástico também contendo nitrogênio. Seccionadas transversalmente, as amostras (aproximadamente 15 fragmentos) foram colocadas em microtubos com capacidade para dois mL de água destilada. Após esta etapa, as amostras foram imersas em tetróxido de ósmio 1% por duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água destilada por três vezes e desidratadas em série de acetona (25%, 50%, 75% e 90% – 10 minutos cada e 100%, por três vezes de 10 minutos). Posteriormente as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO₂ com o objetivo de se retirar totalmente a umidade. Já secas, as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” (suportes de alumínio com 12mm de diâmetro, coberto com fita de carbono para aderência das amostras) e submetidas à metalização com ouro, no evaporador Balzers SCD 050, para facilitar a condutividade dos elétrons no momento das análises no MEV.

As amostras montadas em “stubs” e placas metalizadas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no software photopaint do pacote Corel Draw 12, onde foi selecionada a opção de visualização de tela cheia utilizando um monitor de 14.

4.6 Identificação de fungos

Amostras de extremidades das colônias foram retiradas e colocadas em lâminas de vidro, contendo corante azul de Aman, cobertas com lamínula e analisadas ao microscópio de luz. Os isolados foram identificados utilizando-se a chave taxonômica descrita por Sutton (1992).

4.7 Análise ao microscópio eletrônico de varredura

As amostras foram montadas em *stubs* e metalizadas; posteriormente foram observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens foram geradas e registradas digitalmente, em aumentos variáveis, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no software Photopaint do pacote Corel Draw 12 para preparação das pranchas apresentadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação e produção de plântulas

Sementes de todos os lotes germinaram, no entanto, as sementes oriundas de plantas com sintomas da mancha manteigosa tiveram o crescimento das radículas retardado em relação ao das sementes de plantas sem sintomas, após 18 dias (Figura 1A, B). Fato semelhante foi observado quando as sementes foram transferidas para as bandejas de isopor contendo substrato Plantmax® para produção de plântulas. Os lotes 2, 6 e 4, de sementes provenientes de plantas saudáveis produziram 97%, 98% e 100% de plântulas, respectivamente. As sementes obtidas de plantas com sintomas de mancha manteigosa, lotes 1, 3 e 5, produziram 50%, 92% e 35,7%, respectivamente. Este fato pode estar relacionado à presença de fungos em estágio de latência nestas sementes, seja externa ou internamente, que dificultam a viabilidade de germinação das mesmas, como sugerido anteriormente por outros autores (Alves & Castro, 1998; Talamini et al., 2001 e Paresqui et al., 2003).

5.2 Plaqueamento em meio de cultura

No plaqueamento da primeira amostragem houve crescimento fúngico para os lotes 1, 3, 4 e 5. Nos segundo e terceiro plaqueamentos, só houve crescimento fúngico nas amostras dos lotes 3 e 5. Na quarta amostragem, não houve crescimento fúngico em qualquer material plaqueado. Este fato pode ser explicado tanto por se tratar de uma amostragem plaqueando-se fragmentos de plantas diferentes, mesmo sendo do mesmo lote de sementes ou ainda pelo fato das amostras terem sido coletadas em épocas diferentes, podendo ter havido translocação do fungo para outras partes da planta.

Por meio da identificação dos fungos, verificou-se que se tratava de *Colletotrichum gloeosporioides*, embora em duas placas do lote 5 e uma do lote 6, constatou-se também *Fusarium* sp.

Na cultura do cafeeiro, no Brasil, Noack (1902) relatou a presença deste patógeno associado a frutos de cafeeiro. *Colletotrichum* spp. em sementes de cafeeiro, já foi relatado anteriormente (Alves & Castro, 1998; Talamini et al., 2001; Paresqui et al., 2003), comprovando que estes fungos podem estar presentes tanto em sementes quanto em plântulas assintomáticas. Os resultados desta pesquisa indicam que as sementes podem constituir fonte de disseminação de inóculo e que as cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo são suscetíveis a *Colletotrichum* spp., confirmando os estudos desenvolvidos por Orozco et al. (2002a, b), Orozco (2003) e Ferreira et al. (2003).

Casa et al. (2004) relataram que a maioria dos patógenos utiliza as sementes como veículo de transporte e como abrigo para sobrevivência. Há muitos anos, Tiffany (1951) verificou este fato com o patossistema *Colletotrichum truncatum* x soja. Por meio de plaqueamentos e cortes do tecido, o autor constatou a presença do patógeno em todas as fases da planta no mesmo ciclo vegetal (desde a semente plantada até as colhidas).

Verificando a incidência de *C. gloeosporioides* nos estádios de formação dos frutos, Ferreira et al. (2003) constataram altos valores, embora a maior incidência tenha sido verificada na casca e na mucilagem dos frutos. Orozco et al. (2002a) estudaram a transmissão de *Colletotrichum* sp. em sementes de cafeeiro arábica e observaram índices altos de transmissibilidade, variando de 80% a 96%. Posteriormente, Orozco (2003) verificou, em frutos com sintomas de mancha manteigosa, uma incidência de 100% de *Colletotrichum* sp. quando fragmentos de sementes foram plaqueados em MEA 2%. No mesmo estudo, foram verificados índices de 0% a 17% do fungo na semente e 0% a 8% no endocarpo.

Reis & Casa (2005) verificaram que a transmissão de fungo, da semente para a planta ocorre com alta eficiência, de tal maneira que muitos imaginam que o inóculo vem de fontes externas.

5.3 Análise de hipocótilos de plântulas em MEV

Na primeira amostragem constatou-se a presença de conídios de *Colletotrichum* sp. (Figura 1C,D) e bactérias semelhantes a *X. fastidiosa* (Figura 1E, F), em células do córtex dos pecíolos, nas plântulas dos lotes 1 e 5. Entretanto, não foram verificados, na mesma amostra, o fungo e a bactéria juntos. Isso pode ter ocorrido pelo fato desses patógenos colonizarem sítios diferentes e ou porque as amostras cortadas para microscopia são muito pequenas, considerando-se, ainda, que foram feitas amostragens destrutivas.

Na segunda amostragem, realizada trinta dias após a primeira, observaram-se conídios e células bacterianas apenas em pecíolos do lote 5 e a bactéria no lote 3; na terceira amostragem verificaram-se apenas células bacterianas no lote 3. Nas demais coletas, não foram observadas estruturas em nenhum material analisado. Não observaram-se conídios e células bacterianas nos tecidos das plântulas oriundas de sementes obtidas de plantas sem sintomas de mancha manteigosa. O lote 5 (sementes de plantas com sintomas) foi o de menor índice de produção de plântulas em que observaram-se conídios nos tecidos em duas amostragens, confirmando a justificativa de que a baixa taxa de germinação e produção de plântulas foi devido à presença de fitopatógenos.

Os resultados obtidos são reforçados por outros descritos anteriormente (Rayner, 1952; Neergaard, 1979; Talamini et al., 2001; Orozco, 2003; Machado, 1994), nos quais é citado que *Colletotrichum* sp. está presente nas sementes de cafeeiro e estas, ao germinarem, mantêm o inóculo em seus tecidos, constituindo fontes de disseminação. A partir das observações feitas no presente trabalho, sugere-se que em algum estágio fenológico das plantas, dependendo da

suscetibilidade ou estresse das mesmas e das condições ambientais, estes conídios possam germinar no interior dos tecidos, interagindo com a bactéria e causar sintomas de mancha manteigosa.

Com relação à bactéria, embora não tenha sido feito outro teste para confirmação, como, por exemplo, PCR, pode-se inferir, pela avaliação anatômica das células (Hopkins, 1989) e presença do biofilme (Leite et al., 2002), que é *X. fastidiosa*. Este fato foi revelado anteriormente por Yorinori et al.(2001), que verificou *X. fastidiosa* em frutos plântulas de cafeeiro, embora não tenham constatado a transmissão através da semente. Pelos resultados obtidos na presente pesquisa, sugere-se que *X. fastidiosa* seja transmitida para o cafeeiro também através da semente . No entanto, por tratar-se um um primeiro relato, há necessidade de mais estudos nesta linha de pesquisa.

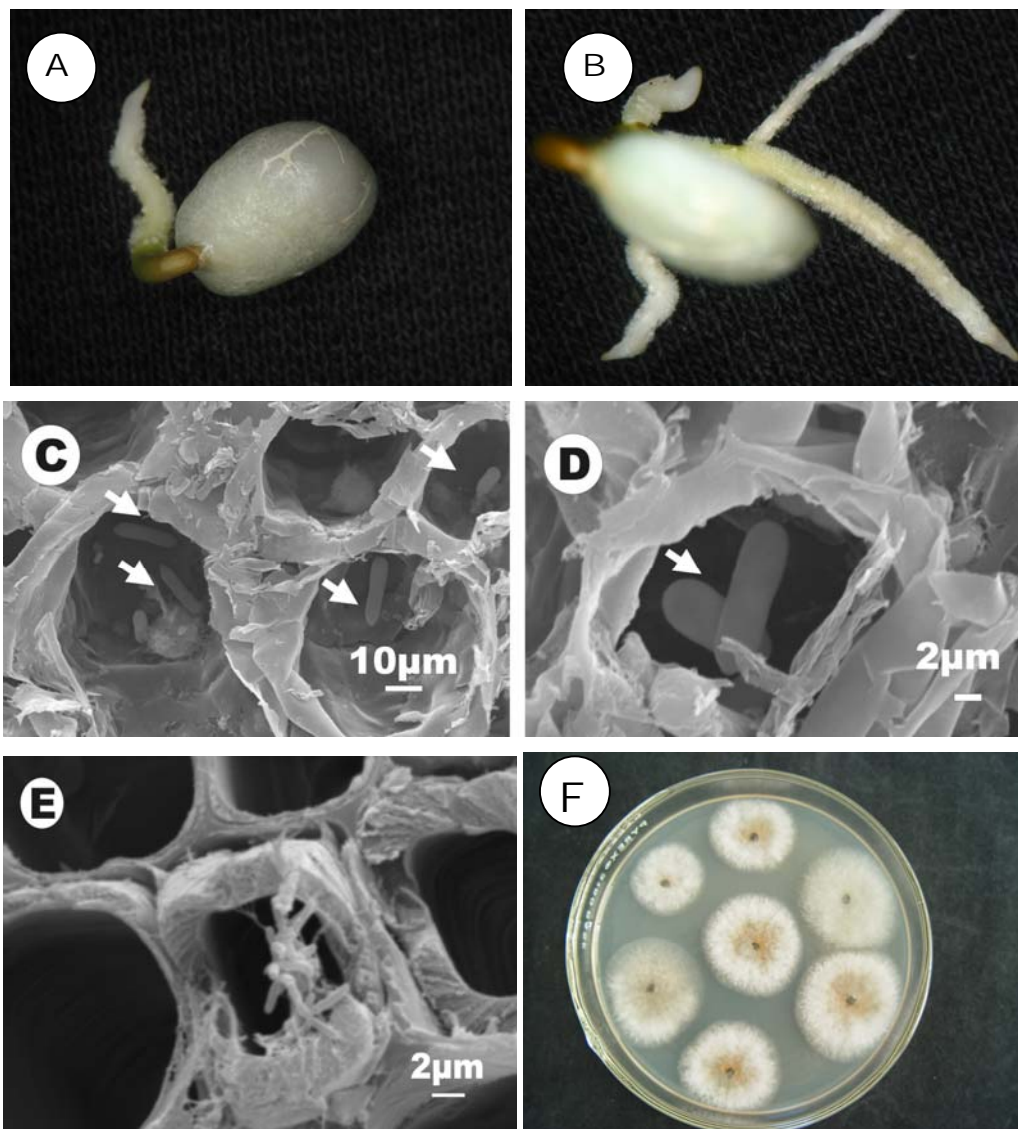


FIGURA 1 Sementes de cafeeiro 18 dias após a indução da germinação e colônias de *C. gloeosporioides* isoladas de pecíolos de plântulas oriundas de sementes doentes: **A)** semente de planta doente, **B)** semente de planta sadia, **C, D)** eletromicrografia eletrônica de varredura de hipocótilo mostrando: conídios dentro de células do córtex de hipocótilos de cafeeiro e **E)** bactéria semelhante a *X. fastidiosa* em células do xilema **F)** isolamento e crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* em MEA % .

6 CONCLUSÕES

Sementes obtidas de plantas com sintomas da mancha manteigosa apresentam germinação retardada em relação as sementes de plantas sadias.

Sementes germinadas, oriundas de plantas com mancha manteigosa dificilmente crescem para formar o estágio de palito de fósforo e plântulas.

Colletotrichum gloeosporioides está presente nos tecidos de plântulas oriundas de sementes de plantas com mancha manteigosa.

Uma bactéria semelhante à *Xylella fastidiosa* está presente em plântulas de cafeeiro oriundas de sementes de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.; CASTRO, H.A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.24, n.1, p.4-7, jan./mar. 1998.

FERREIRA, J.B. et al. Estudo da incidência de *Colletotrichum* spp. nos estágios de formação do fruto de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO, 12., 2003, Lavras, MG. **Resumos...** Lavras: UFLA/APG, 2003. CD ROM.

CASA et al. Efeito do número de espiguetas gibereladas sobre o rendimento, peso de mil grãos e a incidência de *Fusarium graminearum* em grãos de trigo. **Summa Phytopathologica**. V.30, p. 277-280, 2004.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.

LEITE, B. et al. Genomic and X-ray microanalysis indicate that Ca^{2+} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian of Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.6, p.645-560, 2002.

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

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 107p.

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.229-263, 1994.

MENTEN, J.O.M. et al. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: Qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV/DFP, 2005. 502p.

NEERGAARD, J.C. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1979. 839p.

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

- OROZCO, M.E.F. et al. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas, MG. **Resumos...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002a. p.59.
- OROZCO, M.E.F. et al. Transmissão de *Colletotrichum* spp. por café arábica (*Coffea arabica*) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas, MG, 2002b. p.93.
- OROZCO, M.E.F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*.** 2003. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras
- PARESQUI, L. et al. Evidências da latência e associação endofítica de *Colletotrichum* sp. em tecidos de *Coffea arabica* L. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003 Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro, BA. 2003. p.200.
- RAYNER, R.W. Coffee berry disease, a survey of investigations carried out up to 1950. **East Africa Agricultural Journal**, Nairob, v. 17, p. 130-158, 1952.
- REIS, E.M.; CASA, R.T. Danos causados por fungos associados a sementes de cereais de inverno. **Summa Phitopatológica**, Jaboticabal, v.31, p.138-140, 2005.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control.** Wallingford: CAB International, 1992. p.1-26.
- TALAMINI, V. et al. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidas por sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.219-248, 2001
- TANAKA, M.A.; MACHADO, J. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.10 p.219-243, 1985.
- TIFFANY, L.H. Delayed sporulation of *Colletotrichum* on soybeans. **Phytopathology**. v.41, p.975-981, 1951.

YORINORI, M.A. et al. Presença de *Xylella fastidiosa* em sementes e mudas de cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DO CAFÉ DO BRASIL, 1., 2001, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas, MG: Embrapa Café, 2001. v.1, p.294-297.

CAPÍTULO 4

**CONSTATAÇÃO DE *Xylella fastidiosa* EM PECÍOLOS DE FOLHAS DE
CAFEIEIRO COM SINTOMAS DE MANCHA MANTEIGOSA POR
MEIO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ANÁLISE DE PCR**

1 RESUMO

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. Constatação de *Xylella fastidiosa* em pecíolos de folhas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa por meio da microscopia eletrônica de varredura e análise de PCR. In: _____. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas pelo método de cultura de embrião.** 2006. Cap.4. p 81-102. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

Xylella fastidiosa é o agente causal da requeima das folhas do cafeeiro que coloniza o xilema de plantas, reduzindo a passagem da água e de nutrientes. A bactéria tem sido estudada no cafeeiro desde que foi detectada pela primeira vez nessa cultura; entretanto, não se sabe ainda avaliar seu efeito, uma vez que o cafeeiro, provavelmente, convive com a bactéria há muitos anos e parece suportar esse patógeno em determinadas situações. Em plantas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa, a bactéria ainda não tinha sido relatada. Objetivou-se, neste trabalho, analisar pecíolos de folhas de plantas de cafeeiro com sintomas da mancha manteigosa e verificar a relação da bactéria com a doença por meio de teste de PCR e estudos ultraestruturais em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Coletaram-se folhas de plantas com e sem sintomas de mancha manteigosa (40 com sintomas e 40 assintomáticas). Cinco folhas foram amostradas de cada planta. Os pecíolos foram cortados e macerados para extração do DNA e analisados por PCR. Quatro pecíolos de cada amostra (plantas com e sem sintomas) foram processados para MEV. Pela análise em PCR, constatou-se *X. fastidiosa* em 34% das plantas com sintoma da doença e 9,3% nas sem o sintoma da mancha manteigosa. Pecíolos de plantas *Xylella* positivas em PCR mostraram obstrução dos vasos do xilema pelas bactérias. Das quatro plantas negativas em PCR, uma teve o pecíolo com vasos obstruídos pela bactéria quando analisada ultramicroscopicamente. Comparando-se ambas as análises, verificou-se variação da colonização de *X. fastidiosa* em ramos e entre ramos de uma mesma planta de cafeeiro.

***Comitê de orientação:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRAT

LINS, Severina Rodrigues de Oliveira. Report of *Xylella fastidiosa* in leaf tissues of plants with symptoms of “Buttery spot” by scanning electronic microscopy and PCR. In: _____. **Histopathological studies of Buttery spot in coffee (*Coffea arabica* L.) and behaviour of *Colletotrichum* spp isoaltes in plants obtained by embryo culture.** 2006. Cap.4 p 81-102. Dissertation (Master’s in Plant Pathologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.*

Xylella fastidiosa causes atrophy in coffee branches by colonizing plant xylem, reducing water and nutrient flow. *X. fastidiosa* has been studied in coffee since it was first detected but there is still no method to assess the deleterious effect of the bacterium on infected plants, since coffee plants remain productive for many years even in the presence of the pathogen. In coffee plants with symptoms of buttery spot the bacterium had not yet been reported. The objective of this research was to analyze coffee petiole with symptoms of buttery spot and verify the relationship of the bacterium with this disease, in those plants, through PCR and ultrastructural studies by scanning electronic microscopy (SEM). It was sampled plant leaves with and without buttery spot symptoms (40 symptomatic and 40 asymptomatic). Five leaves were sampled from each plant. Petiole were cut and macerated for DNA extraction and analyzed by PCR and four petiole of each sample (plants with and without symptoms) processed for SAM. By PCR it was observed *X. fastidiosa* in 34%, in symptomatic plants and 9,3% in those without symptom of buttery spot. Petiole of PCR positives *Xylella* showed obstruction of vessels of xylem by bacteria. From the four PCR-negatives plants, one had petioles with vessels clogged by bacteria when analyzed by SEM. Comparing both analysis, it was observed a variation in colonization of *Xylella fastidiosa* in and between branches of a same coffee plant.

* **Adviser Committee:** Mario Sobral de Abreu – UFLA (Advisor); Eduardo Alves – UFLA (Co- advisor).

3 INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica limitada ao xilema, que tem afetado grande número de plantas no Brasil e no mundo. Além dos prejuízos na cultura de citros, *X. fastidiosa* acarreta também perdas em outras culturas economicamente importantes, tais como videiras (Hopkins & Mollenhauer, 1973; Davis et al., 1978), alfafa-anã (Goheen et al., 1973), pêssego (Wells et al., 1983) ameixa (Raju et al., 1982), amêndoas (Mircetich et al., 1976) e pêra (Leu & Su, 1993).

Nos últimos anos, *X. fastidiosa* foi detectada em plantas de cafeeiro, no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná e Bahia (Souza, 2001), sendo a doença denominada "requeima do cafeeiro" e, mais recentemente, atrofia dos ramos do cafeeiro (ART). Esta bactéria tem sido estudada no cafeeiro desde que foi detectada pela primeira vez (Paradela Filho et al., 1995); entretanto, não se sabe ainda avaliar seu efeito na cultura, uma vez que o cafeeiro, provavelmente, convive com a bactéria há muitos anos e parece suportar esse patógeno em determinadas situações, pelo fato da bactéria, muitas vezes, estar presente nestas plantas e não expressar sintomas (Lima, et al., 1998). A doença afeta desde mudas no viveiro, de três a quatro pares de folhas, até plantas adultas (Paradela Filho, 1998).

Os sintomas visuais da doença são folhas pequenas, verdes-claras ou amareladas, com característica semelhante à deficiência de zinco, internódios curtos, redução do crescimento da planta, folhas mais velhas, podendo apresentar queima nos bordos e no ápice. Com o ataque intenso ocorre senescência foliar precoce e, posteriormente, morte de ramos, tanto da haste principal como de ramos laterais, podendo ocorrer definhamento e morte do cafeeiro (Paradela Filho, 1995, 1998). Ainda é admitida a ocorrência de estresse

hídrico devido à colonização e ao entupimento dos vasos xilemáticos pela bactéria (Evert & Mullinix, 1983; Goodwin et al., 1988).

Pecíolos de folhas são as partes das plantas mais utilizadas em trabalhos de levantamento de *Xylella* (Hopkins, 1981; Raju et al., 1982; Beretta et al., 1997; Lima et al., 1997; Monteiro et al., 2001 e Barbosa, 2003), por ser a região com maior acúmulo da bactéria. Um dos métodos mais seguros para detecção de *X. fastidiosa* é por meio da amplificação do seu DNA pela reação da polimerase em cadeia (Paradela Filho, 1995; Pooler & Hartung 1995; Lemos 1997; Mentha et al.; 2000; Alves, 2003). Por outro lado, estudos utilizando a microscopia eletrônica favorecem pesquisas neste patossistema (Alves, 2003). Com estas ferramentas, é possível detectar e visualizar as células bacterianas, bem como acompanhar seu comportamento dentro dos tecidos do hospedeiro (Tyson et al., 1985; Chagas et al., 1992; Lima, 1998; Brlansky et al., 1993; Lima, 1998; Queiroz-Voltan et al., 1998; Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999; Queiroz-Voltan et. al, 2000; Alves, 2003).

A mancha manteigosa é uma doença que ocorre no cafezal, em alguns estados brasileiros e foi estudada por vários pesquisadores (Bitancourt, 1958; Vargas & Gonzalez, 1972; Mansk & Matiello, 1997; Dorizzoto & Abreu, 1993; Orozco, 2003; Ferreira, 2004; Lins et al., 2004; Pereira, 2005; Pereira et al., 2005). Os sintomas da doença caracterizam-se por manchas com aspecto oleoso, de coloração pálida a esverdeada, nas folhas e frutos, ramos com murcha descendente e internódios curtos, de etiologia fúngica, tendo como agente etiológico *Colletotrichum gloeosporioides* (Bitancourt, 1958; Orozco, 2003; Ferreira, 2004; Pereira, 2005). No entanto, nenhum dos trabalhos realizados com este patossistema conseguiu reproduzir os sintomas foliares característicos da doença. Por outro lado, nenhum trabalho anterior a este revelou a presença de *X. fastidiosa* em plantas com sintomas de mancha manteigosa.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram analisar pecíolos de folhas de plantas de cafeeiro com sintomas da mancha manteigosa e verificar a relação da bactéria com a doença, nestas plantas, por meio de teste de PCR e estudos ultraestruturais em microscópio eletrônico de varredura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudos ultraestruturais

A preparação e observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraesrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG.

4.2 Triagem e fixação das amostras

Foram coletadas, aleatoriamente, folhas de plantas de cafeeiro da cv. Catucaí Vermelho, com e sem os sintomas típicos de mancha manteigosa, no campo experimental da UFLA e no município de Carmo de Minas, MG. As folhas foram lavadas em água corrente, secas com papel de filtro e os pecíolos foram cortados, utilizando-se tesoura desinfestada com álcool 70% (aproximadamente um centímetro). Posteriormente, os fragmentos foram colocados em eppendorfs com capacidade para 1,5mL, contendo fixador Karnovsky até cobrir as amostras e levados para geladeira por um período mínimo de 24 horas.

4.3 Preparo dos pecíolos para corte em nitrogênio líquido

Pecíolos foram retirados do fixador e transferidos para glicerol 30% por 30 minutos. Em seguida, imergidos em recipiente plástico contendo nitrogênio líquido e cortados com um bisturi sobre placa de metal imersa em recipiente plástico também contendo nitrogênio líquido. Seccionados transversalmente, os fragmentos de pecíolos (aproximadamente 15) foram colocados em “eppendorfs” contendo água destilada e transferidos para “eppendorfs” contendo tampão cacodilato 0,05M, onde permaneceram por dez minutos. O tampão foi

trocado três vezes, utilizando-se uma micropipeta de plástico. Após esta etapa as amostras foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato por duas horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente as amostras foram lavadas com água destilada por três vezes e desidratadas em série de acetona (25%, 50%, 75%, 90% – 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Após esta etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030) para a complementação da secagem. Já secas, as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” (cilindros de alumínio com 12mm de diâmetro, cobertos com fita de carbono para aderência das amostras) e submetidas à metalização com ouro, no vaporizador Balzers SCD 050 e observadas em MEV.

As amostras montadas em “stubs” e placas metalizadas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no software photopaint do pacote Corel Draw 12, onde foi selecionada a opção de visualização de tela cheia utilizando um monitor de 14.

4.4 Detecção da bactéria nas folhas com mancha manteigosa por PCR

As folhas para análise por PCR foram coletadas no campo experimental de cafeeiro localizado no campus da UFLA.

Coletaram-se folhas de plantas com e sem sintomas de mancha manteigosa, sendo 40 com sintomas e 40 assintomáticas. Foram coletadas 5 folhas de cada planta, as quais foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas para o Laboratório de Diagnose e Controle de Enfermidades de Plantas, do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

4.4.1 Extração do DNA genômico de *X. fastidiosa*

Para a extração do DNA em pecíolos, seguiu-se a metodologia descrita por Minsavage et al. (1994), adaptada por Pinto & Leite (1999) para cafeeiro. Pecíolos foram cortados em tamanho de três centímetros, pegando-se parte da nervura central. Cada amostra foi constituída de cinco pecíolos. Os pecíolos foram macerados em tampão succinato-citrato-fosfato, contendo 5% de PVPP e ácido ascórbico 0,1 M, diluídos na proporção de 1:1000. Desse macerado, foram retirados 100µL e colocados em tubos de microcentrífuga contendo 900µL de água destilada autoclavada (ADA). Os tubos foram centrifugados, por dois minutos, a 11.700 rpm. O sobrenadante foi vertido e adicionaram-se 100µL de ADA, seguindo-se nova centrifugação. Outra vez descartou-se o sobrenadante e o pellet foi resuspenso em 567 µL de TE (tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; EDTA 1 mM, pH 8,0), adicionando-se, em seguida, 30µL de SDS 10% e 3µL de proteinase K (20mg/mL), agitando-se vagarosamente. Em seguida, os tubos foram incubados, em banho-maria a 37°C por uma hora. Após este tempo, adicionaram-se 100µL de NaCl 5M e os tubos foram agitados em vortex. Em seguida, adicionaram-se 80mL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10g de CTAB, em 100mL de água), novamente agitando-se em vortex. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C, por 10 minutos, deixados para esfriar e, em uma capela, à temperatura ambiente, adicionaram-se 550µL de clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, seguindo-se agitação manual por 10 minutos. Foi realizada nova centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm. Após este processo, a fase superior foi transferida para novos microtubos, medindo-se o volume. Nesta etapa, adicionaram-se 0,6 volumes de álcool isopropílico e os tubos colocados em “deep freezer” a -80°C, por 10 minutos. Passado este tempo, os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos, retirou-se o sobrenadante e o “pellet” foi lavado em etanol 70% e novamente centrifugado,

na mesma rotação, por 10 minutos. O “pellet” foi resuspendido em 50µL de TE e armazenado a 4°C.

4.4.2 Amplificação do DNA – PCR

Foram utilizados volumes de 25µL do material para amplificação do DNA, sendo, 2,5µL de tampão 10X, 1,5 µL de cloreto de magnésio, 1,0 µL de dNTPs, 0,75 µL de cada primer (RST31 e RST33), 5,0 µL de taq polimerase e 5,0 µL do DNA da amostra, completando-se o volume com água ultrapura. Os primers utilizados foram os descritos por Minsavage et al. (1994), que permitiram a amplificação de um fragmento específico de 733 pares de base. O programa utilizado no termociclador foi adequado às condições deste estudo, sendo um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a 55°C para anelamento, um minuto e trinta segundos a 72°C para extensão, por 30 ciclos e cinco minutos a 72°C para extensão final.

A visualização do produto da PCR foi feita em gel de agarose a 9%, diluído em tampão TBE (TBE 10 X 108g Tris 89 mM, 55g ácido bórico 89 mM, e EDTA 0,5 M em pH 8,0), corado com brometo de etídio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises ultraestruturais

Células bacterianas não foram constatadas em pecíolos de plantas sem sintomas da mancha manteigosa, nos campos amostrados. (Figura 1A), exceto para uma amostra (uma planta) do campus da UFLA. Esse fato pode ter ocorrido pelo fato da planta amostrada estar muito próxima à sintomática, ou seja, o agente vetor pode ter transmitido a bactéria para a planta vizinha. Por outro lado, em todos os pecíolos de plantas com sintomas de mancha manteigosa, tanto nas coletadas do campus da UFLA quanto nos de Carmo de Minas, foi verificada a presença de bactéria agregadas, em forma de bastonete, alongadas, envolvidas em uma goma, com características similares às descritas para *X. fastidiosa* por Brlansky et al. (1992); Timmer et al. (1983); Raju & Wells (1986) e Hopkins (1989). (Figura 1B, C).

Já foi constatado que *C. gloeosporioides* está presente nos tecidos dessas plantas. No entanto, neste estudo não foram verificadas estruturas fúngicas, o que pode ter ocorrido pelas análises terem sido feitas em sítio específico para *Xilella*, ou seja, no xilema dos pecíolos.

Foram encontrados dois ou mais indivíduos alinhados longitudinalmente (Figura 1D), indicando que as bactérias se alongam durante as divisões celulares, o que explica a observação de indivíduos bem maiores em relação a outros da mesma colônia. Lima et al. (1997) também constataram esse fato em seus estudos sobre a clorose variegada dos citros. De acordo com Costerton & Irwin (1981) a agregação da bactéria parece estar ligada à liberação de substâncias extracelulares que assemelham-se quimicamente aos polissacarídeos que constituem o glicocálix, o qual é responsável pela adesão de outras células bacterianas às células vizinhas. As células bacterianas apresentaram-se

envolvidas por uma goma “fastidiana” (Figura 1B), provavelmente produzida pelas próprias células (Alves, 2003). Esta “goma” foi verificada em outros estudos (Raju & Wells 1986; Fry & Milholland, 1990; Hopkins, 1989). Fry & Milholland (1990), creditavam que a formação da goma como um mecanismo de resistência da planta para esse patógeno. Entretanto posteriormente outros autores constataram que a goma era produzida pela própria bactéria para facilitar a agregação. Leite et al. (2002) sugeriram que a presença de agregados de bactérias pode funcionar como uma rede, atraindo íons de nutrientes para a colônia, o que resulta em otimização da atividade de enzimas digestivas relacionadas à ação da bactéria contra o tecido do hospedeiro, levando à ocorrência de deficiências nutricionais observadas nas plantas afetadas pela bactéria, mesmo tendo poucos vasos obstruídos.

De acordo com o modelo para adesão de *Xylella*, descrito por Leite et al. (2002), após a adesão inicial, a bactéria iniciaria a produção da goma fastidiana, a qual estaria envolvida na formação do biofilme produzido pela bactéria no interior dos vasos do xilema. Esse biofilme pode ganhar consistência por meio da ligação de íons de cálcio, tornando o agregado rígido e obstruindo os vasos. De acordo com este mesmo modelo, os autores sugeriram que as bactérias poderiam produzir substâncias que permitiriam a desagregação de células para a colonização de outros sítios no mesmo vaso ou em vasos adjacentes e que o agregado formado no lúmen do xilema poderia funcionar como um filtro, seqüestrando nutrientes que estivessem sendo translocados pelo xilema (Alves 2003).

5.2 Reação da polimerase em cadeia

Os “primes” utilizados amplificaram um fragmento de 733 pares de base (pb) presente no controle positivo (folha de cafeeiro com sintoma de internódios e folhas curtas) e colônia pura de *X. fastidiosa*, porém, ausente nos controles

negativos (planta sem sintomas de *Xylella*). Assim, as amostras que apresentaram o fragmento de 733 pb amplificado foram consideradas positivas para *X. fastidiosa*.

Por PCR, verificou-se que amostras, tanto de plantas com sintomas como sem o sintoma da mancha manteigosa, foram positivas. Entretanto das 40 plantas com sintomas, 34% foram positivas para *Xylella*, enquanto que, das plantas assintomáticas, 9,3% revelaram-se positivas para a bactéria (Figura 2).

A partir desses resultados, sugere-se que a mancha manteigosa pode ter etiologia complexa ocasionada por *C. gloeosporioides* e *X. fastidiosa*, que podem interagir através de enzimas, toxinas ou metabólitos, mesmo tendo sítios de colonização diferentes. No entanto, este trabalho é pioneiro com relação à constatação de *X. fastidiosa* associada a esta doença, sugerindo-se estudos posteriores nesta linha de pesquisa.

5.3 Comparação dos dois estudos

Paralelamente às coletas para análise para PCR foram escolhidas oito plantas, ao acaso, para comparação com microscopia eletrônica, analisando-se internamente os vasos dos pecíolos. Desse total, quatro foram positivas para PCR e, quando analisadas ultraestruturalmente, confirmou-se a presença da bactéria. Por outro lado, das quatro amostras negativas para PCR, três não continham células de *Xylella* quando analisada ao MEV; na outra amostra, foi constatada *Xylella fastidiosa* nos vasos, sugerindo que as células bacterianas podem estar presentes em uma parte e ausente em outra, na mesma planta, haja vista a constatação nos diferentes métodos.

Os resultados da presente pesquisa reforçam os observados por Takatsu et al. (2001), que constataram que a concentração de *X. fastidiosa* no extrato do xilema varia muito entre os ramos coletados da mesma planta e entre as diferentes partes do mesmo ramo. Yorinori et al. (2003) observaram distribuição

não uniforme de *X. fastidiosa* nos tecidos de planta de cafeeiro, quando compararam dois métodos de detecção (imunofluorescência indireta e DAS-ELISA) e atribuíram a fatores como, por exemplo, a distribuição não uniforme da bactéria nos tecidos da planta, fato já constatado anteriormente por outros pesquisadores (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Isso pode colaborar para explicar os resultados da presente pesquisa, revelados após comparação entre as análises ultraestruturais e por PCR, em que amostra negativa em PCR foi positiva na microscopia eletrônica.

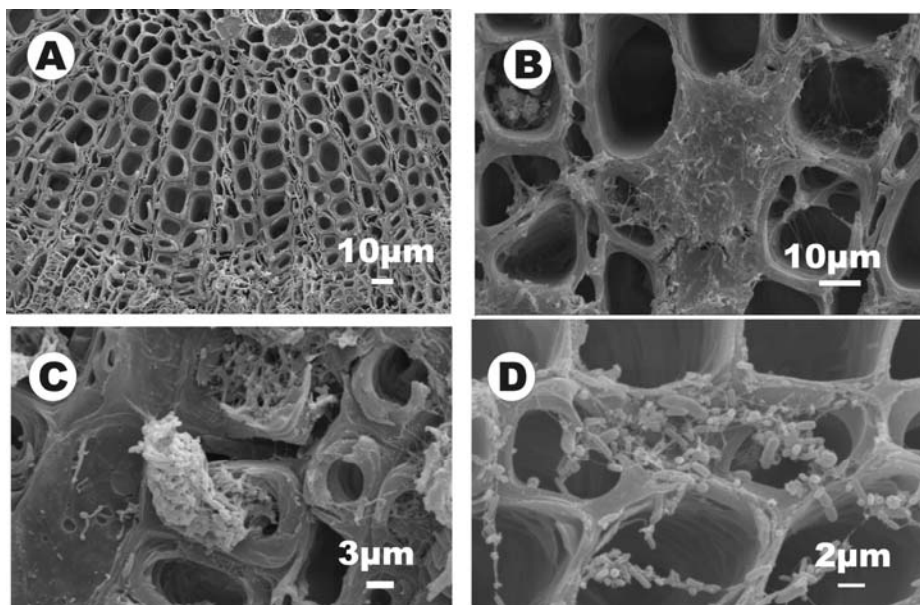
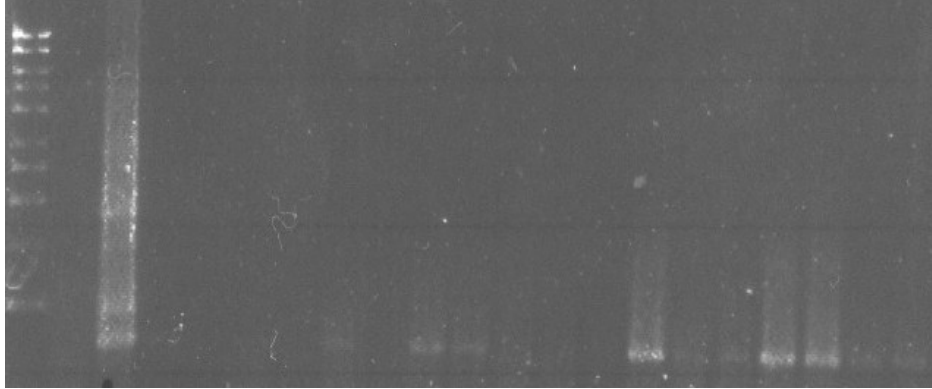


FIGURA 1. Eletromicrografia eletrônica de varredura mostrando pecíolos de folhas de cafeeiro com vasos colonizados por *Xylella fastidiosa*: **A)** pecíolo de planta sem sintoma de mancha manteigosa; **B)** e **C)** pecíolos de plantas com o sintoma da doença, mostrando células bacterianas nos vasos do xilema, envolvidas na “goma” fastidiana e **D)** alongamento diferencial das células bacterianas durante o crescimento.

*M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21



* **Kb 733**

FIGURA 2 Gel de agarose de produtos amplificados por PCR do DNA de *Xylella fastidiosa* extraída de pecíolos de folhas do cafeeiro. **2)** controle negativo – água, **3)** controle positivo – bactéria, **4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12)** Plantas sadias, **10, 15, 17, 18, 19, 20, 21)** Plantas doentes.

6 CONCLUSÕES

Xylella fastidiosa está presente no xilema em pecíolos de folhas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa.

Há uma variação da colonização de *X. fastidiosa* em ramos e entre ramos de uma mesma planta de cafeeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. *Xylella fastidiosa*: Adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinha vetoras e formações de biofilme sobre película de poliestireno. 2003. 121f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Piracicaba, SP.

BARBOSA, J.F. Ocorrência e padrão espacial da atrofia dos ramos do cafeeiro (*Xylella fastidiosa*) nas regiões sul e Zona da Mata de Minas Gerais. 2003. 88p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BERETTA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S. A survey for strain of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant disease**, v.81, n.10, p.1196-1198, 1997.

BITANCOURT, A.A. As manchas da folha do cafeeiro. **O biológico**, São Paulo, v.24, n.17, p.191-201, mar. 1958.

BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; LEE, R.F. Detection transmission of gram-negative xylem limited bacterium sharpshooters from a citrus grove in Florida. **Plant Disease**, v.96, n.7, p. 590-592, 1992.

BRLANSKY, R.H.; DAVIS, C.L.; LEE, R.F.; TIMMER, L.W. Immunogold localization of xylem-inhabiting bacteria affecting citrus in Argentina and Brazil. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS CONFERENCE (IOCV). **Proceedings...** p.311-319, 1993.

CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of xylem-limited bacterium in sweet-orange affected with *Citrus* variegated chlorosis disease in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.34, p.306-312, 1992.

COSTERTON, J.W.; IRWIN, R.T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review Microbiology**, v.35 p.299-324, 1981.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A. H. & THOMSON, S. V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. **Science** 199: 75-77. 1978.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M.S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOAK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, ago. 1993. Suplemento/Resumo.

EVERT, D.R.; MULLINIX Jr., B.G. Xylem water potential of peach trees infected with phony disease. **HortScience**, Alexandria, v.18, p.719-721, 1983.

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

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.80,n.1, p.61-65, 1990.

GOHEEN, A.C.; NYLAND, G. & LOWE, S.K. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. **Phytopathology**, 73: 859-862. 1973.

GOODWIN, P.H.; DEVAY, J.E.; MEDEDTH, C.P. Roles of water stress and phytotoxin in the development of Pierce's diseases of the grapevine. **Physiological and Molecular Plant pathology**, v.32, n.1, p.1-15, 1988.

HOPKINS, D.L. & MOLLENHAUER, H.H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science** 179: 298-300. 1973.

HOPKINS, D.L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, p.415-418, 1981.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.

LEMOS, E.G.M. et al. Extração rápida de DNA de *Xylella fastidiosa* visando a otimização da reação da PCR para diagnóstico da CVC. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.235, 1997. (Suplemento)

LEU, L.S. & SU C.C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the casual bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, v.77, p. 642-646, 1993.

LEITE, B. et al. Genomic and X-ray microanalysis indicate that Ca^{2+} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.6, p.645-560, 2002.

LIMA, J.E.O. et al. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões cafeeiras, e seu isolamento in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.392-393, 1996.

LIMA, J.E.O. et al. Diagnose da clorose variegada dos citros por microscopia óptica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.370-374, 1997.

LIMA, J.E.O. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, n.1, v.82, p.94-97, 1998.

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

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

MENTHA, A.; LEITE Jr, R.P.; ROSATO, Y.B. Polymorphism of *Xylella fastidiosa* strains by RAPD-PCR and SDS-PAGE of proteins. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.651-656, 2000.

MIRCETICH, S.M. et al. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.17-24, 1976.

MINSAVAGE, G.V. ET AL. Developmewnt of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, n.5, p. 456-461, 1994.

MONTEIRO, P.B. et al. *Catharathus roseus* an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.85, n.3, p.246-251, 2001.

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

PARADELA FILHO, O. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.16, n.2, p.135-136, 1995.

PARADELA FILHO, O. *Xylella* do cafeeiro não é a mesma da CVC. **Copercitrus Informativo Agropecuário**, v.12, n.143. p.20-21,1998.

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

PEREIRA, I.S. et al. Histopatologia de ramos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) com mancha manteigosa causada por *Colletotrichum* spp. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina, PR, 2005. CD-ROM.

PINTO, F.G.S.; LEITE Jr., R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.254, 1999. Suplemento.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review Phatopathology**, v.34, p.131-151, 1996.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B. et al. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, Campinas, v.58,n.1, p.23-33, 1998.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, p.55-76, 1999.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B. et al. Relação entre os sintomas morfológicos externos de cafeeiro infectado pela *Xylella fastidiosa* e a porcentagem de obstrução dos vasos do xilema. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Brasília: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 2000. v.1, p.241-244.

RAJU, B.C. et al. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the casual agent. **Phytopathology**, v.72, p.1460-1466, 1982.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M. Disease caused by fastidious xylem-limited bacterium. **Plant Disease**, v.70, n.3, p.182-186, 1986.

SOUZA, R.M. *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café: relatório de projeto. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2001. (Projeto n. 19.1998.157).

TAKATSU, A.; SANTOS, M.R.; MALUF, R.C. *Xylella fastidiosa* do cafeeiro no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Vitória, Es: Embrapa Café, 2001. p.1234-1241

TIMMER, I.W. et al. A fastidious xylem-limited bacterium infecting ragweed. **Phytopatology**, v.73, n.7, p.975-979, 1983.

TYSON, G.E. et al. Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grapes leaves. **Phytopathology**, v.75, n.3, p.264-269, 1985.

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

WELLS, J.M.; RAJU, B.C. & NYLAND, G. Isolation, culture and pathogenicity of the bacterium causing phony peach disease. **Phytopathology**, 73: 859-862. 1983.

YORINORI, M.A. et al. Presença de *Xylella fastidiosa* em sementes e mudas de cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DO CAFÉ DO BRASIL, 1., 2001, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas, MG: Embrapa Café, 2001. v.1, p.294-297.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente considerou-se que a etiologia da mancha manteigosa era de origem virótica, mas posteriormente essa hipótese foi descartada, após o isolamento de *Colletotrichum* sp. nas plantas com os sintomas da doença. Este fato serviu como base para os estudos posteriores que constatavam o patógeno nos isolamentos, embora relato sobre a reprodutibilidade dos sintomas não tenha sido constatado. Diante desses resultados, buscaram-se, no presente estudo, novas metodologias para analisar as causas da doença e constatou-se, por meio dos estudos histopatológicos, que não apenas *Colletotrichum gloeosporioides*, mas também *Xylella fastidiosa* está presente nas plantas com mancha manteigosa, embora os dois patógenos não tenham sido observados juntos na mesma amostra na microscopia eletrônica. Esse fato que pode ser explicado por se tratar de uma amostragem muito pequena (dois milímetros, cada amostra), bem como pelos patógenos colonizarem sítios diferentes.

Com base nestes estudos, pôde-se constatar também que sementes de plantas com a doença abrigam, em seus tecidos, tanto o fungo quanto a bactéria. A erradicação de patógenos em sementes é uma tarefa difícil e, por isso, poucos avanços ou sucessos foram obtidos, embora haja pesquisas que objetivem resultados positivos. Algumas dificuldades podem ser atribuídas à associação íntima do patógenos com o hospedeiro localizado, geralmente, no interior da semente. O conhecimento detalhado da transmissão semente-plântula é a base científica para a definição de algumas estratégias de controle que envolvem o manejo integrado de doenças, pois define-se assim se o inóculo causador da doença chegou à área de cultivo pelo vento ou se foi introduzido por meio da transmissão eficiente da semente para a plântula.

Por meio da microscopia eletrônica e de técnicas de PCR, constatou-se a presença de *Xylella fastidiosa* em pecíolos de folhas de plantas com sintomas de

mancha manteigosa. Por esses resultados, constatou-se que a microscopia eletrônica de varredura é uma técnica eficiente para estudos histopatológicos em cafeeiro com microrganismos. O fato de nunca se ter constatado a presença de *X. fastidiosa* em plantas com estes sintomas pode ter ocorrido pela utilização da metodologia de isolamento direcionada apenas para fungos e ou pelo fato de se tratar de uma bactéria fastidiosa associada ao xilema das plantas. Dessa forma, sugere-se que sejam conduzidos mais estudos como por exemplo: inoculações consecutivas, padronizando-se intervalos de tempo, inoculação conjunta do fungo e da bactéria e inoculação separada inicialmente e posteriormente, dos dois agentes novamente.

Quanto aos estudos envolvendo diferentes isolados de *Colletotrichum* spp., estes foram realizados no intuito de se averiguar como ocorrem o estabelecimento e a colonização de *Colletotrichum* em plantas de cafeeiro. Foram utilizadas plantas oriundas da cultura de embrião para assegurar a sanidade do material a ser inoculado e não deixar dúvidas quanto aos patógenos colonizadores. *C. demathium* e *C. acutatum* foram estudados para comparação dos processos de colonização com os outros isolados em plantas de cafeeiro. Com isso, constatou-se que plantas micropropagadas são eficientes no que se refere à sanidade. Quanto às espécies de *Colletotrichum* estudadas aqui, foi demonstrado que o isolado *C. gloeosporioides* (IH) foi mais agressivo na invasão e na destruição dos tecidos. Embora tenha sido verificada uma colonização por *C. demathium* e *C. acutatum*, isto ocorreu mais tardiamente em relação ao isolado da haste e com menor intensidade. Estes resultados vêm solidificar trabalhos anteriores com a mancha manteigosa, os quais afirmam que *C. gloeosporioides* é o agente causal da mancha manteigosa do cafeeiro.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser explorados com mais pesquisas, a de se buscarem mais informações para este complexo patossistema.