

Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro

Severina R.O. Lins, Mário S. Abreu & Eduardo Alves

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, CEP 37.200-000, Lavras, MG, Brasil, e-mail: ealves@ufla.br

Autor para correspondência: Eduardo Alves

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

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho, acompanhar pela microscopia eletrônica de varredura, os processos de infecção, colonização e reprodução de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. Plântulas da cultivar Rubi produzidas por cultura de embrião foram inoculadas com 5µL de suspensão de esporos ajustada para 10⁶ conídios mL⁻¹, na região do hipocótilo e folhas, após ferimento com agulha entomológica. Os isolados avaliados foram *Colletotrichum gloeosporioides* (IH), obtido de ramos e (IF) de folhas de planta de café com sintomas de mancha manteigosa, *C. dematium* (ID) de cafeeiro sadio e *C. gloeosporioides* (IM) de casca de manga com sintomas de antracnose. Duas horas após as inoculações (HAI), fragmentos de folhas e hipocótilos foram transferidos para microtubos de 1,5mL contendo solução fixadora de Karnovsky modificado. As demais amostras foram coletadas 3, 5, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 114 e 144 HAI. Os conídios de todos os isolados aderiram preferencialmente nas depressões dos órgãos inoculados, formando um septo e germinando cinco HAI (*C. gloeosporioides*) e doze HAI (*C. dematium*) emitindo tubos germinativos, tanto nas extremidades como lateralmente. Apressórios globosos, trilobulados, em forma de pé e de vírgula foram produzidos apenas por *C. dematium* (ID), 12 HAI; enquanto que *C. gloeosporioides* (IF), produziu apressórios globosos 24 HAI; os demais isolados não produziram apressórios. *C. gloeosporioides* isolados IH, IF e IM produziram células conidiogênicas 48 HAI. Acérvulos foram produzidos 72 HAI, por *C. gloeosporioides* (IH) e 96 horas por *C. dematium*. O isolado IM colonizou tecidos de plantas de cafeeiro, produzindo conidióforos, no entanto, sem produção de acérvulo. Os isolados mais agressivos foram IH e IF.

Palavras-chave adicionais: mancha manteigosa, microscopia eletrônica de varredura, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum dematium*.

ABSTRACT

Histopathologic study of *Colletotrichum* spp. in coffee plantlets

The objective of this work was to follow the process of infection, colonization and reproduction of different isolates of *Colletotrichum* spp. in coffee plantlets, obtained by embryo culture, using scanning electron microscopy. The embryo explants were obtained from coffee seeds cv. Rubi. Plants produced *in vitro* were inoculated with 5µL of a 10⁶ conidia.mL⁻¹ spore suspension, on the hypocotyl region and leaves, wounding with an entomological needle. Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* were obtained from stem (IS) and leaves (IL) from plants with symptoms of greasy leaf spot, and from mangos with symptoms of anthracnose (IM). Isolates of *Colletotrichum dematium* were obtained from healthy coffee plants. Three hours after inoculation (h.a.i.), leaves and hypocotyl fragments were transferred to 1.5mL-microtubes containing modified Karnovsky's fixative solution. Further samples were collected at 3, 5, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 114 and 144 h.a.i. Conidia of all isolates adhered more frequently in the depressions of hypocotyls and guard-cells, forming a septum 5 h.a.i. Germ tubes were observed 12 h.a.i. starting from the extremities as well as laterally in the conidia. Apressoria were produced by *C. dematium* (globoses, trilobulated and foot and comma-shaped), and *C. gloeosporioides*, respectively globoses, 24 h.a.i. *C. gloeosporioides* (IH and IF) produced conidiogenic cells 48 h.a.i. Acervuli were produced 72 h.a.i. by *C. gloeosporioides* (IH), 96 h.a.i. by *C. dematium*. *C. gloeosporioides* isolated from mango colonized coffee plant tissues, producing conidiogenic cells without production of acervuli. The most aggressive isolates were IS and IL.

Additional keywords: greasy leaf spot, scanning electronic microscopy, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum dematium*.

INTRODUÇÃO

Colletotrichum é um gênero de fungo ascomiceto que engloba muitas espécies causadoras de doenças em

uma gama extensiva de hospedeiros (Bailey & Jeger, 1992). Espécies deste gênero apresentam diversas estratégias na invasão dos tecidos de plantas, 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 (Sutton, 1980). Fungos do gênero

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG. 2006.

Colletotrichum são tidos como modelos para processos de infecções, competindo com *Phytophthora* como o gênero patogênico de plantas mais estudado (Bailey & Jeger, 1992).

Em conídios de *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum truncatum* a germinação inicia-se com a formação de um septo e é precedida por uma mitose (Skoropad, 1967; Staples *et al.*, 1976). Após o núcleo move-se pelo tubo germinativo, onde passa por uma segunda mitose e um segundo septo é formado; então a célula da ponta do tubo germinativo se desenvolve em um segmento de hifa para formar o apressório. Posteriormente ocorre uma mitose e é produzido um apressório binucleado maduro que vai formar a hifa infectiva.

Em cafeeiro, um grande número de espécies de *Colletotrichum* são encontradas, sendo patogênicas ou endófitas. Alguns estudos realizados com espécies patogênicas enfocam o efeito da temperatura e umidade nos processos de desenvolvimento e formação de estruturas de penetração (Dillard, 1989; Garcia, 1999; Estrada *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005). Entretanto, poucos enfocam estudos microscópicos dos processos de desenvolvimento, colonização e reprodução em tecidos de plantas de cafeeiro.

A mancha manteigosa do cafeeiro é uma doença que tem sido atribuída a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. No entanto, existem poucas investigações no que se refere aos processos de penetração e colonização neste patossistema. Estudos realizados até o presente, tentado a reprodutibilidade dos sintomas, não tiveram sucesso, havendo a necessidade de novas pesquisas (Orozco, 2003; Pereira *et al.*, 2005). O objetivo deste estudo foi acompanhar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, os processos de infecção, colonização e reprodução de diferentes isolados de *Colletotrichum*, obtidos de cafeeiro e de manga em plântulas de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de plântulas de cafeeiro pelo método de cultura de embrião

Foram coletadas 300 sementes de café, da cultivar Rubi, do campo experimental de pesquisa da Universidade Federal de Lavras - UFLA, no estádio verde cana, para a extração dos embriões. As sementes foram previamente selecionadas, em seguida colocadas 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-esterilizada. Os embriões foram extraídos das sementes intactas, em câmara de fluxo laminar horizontal sob microscópio estereoscópio, com bisturi e pinça esterilizados. Para este processo, as cascas das sementes foram cuidadosamente retiradas, passando pelo pergaminho até atingir o endosperma, o qual foi cuidadosamente fragmentado com a finalidade de se encontrar o embrião.

Os embriões foram retirados com bisturi e colocados em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) contendo 10 mL de meio agar nutritivo básico de Murashige & Skoog (1962) pH 5,9, acrescido de 6 mg.L⁻¹ do hormônio de crescimento GA3 (giberelina), com pH ajustado para 5,9 e solidificado com ágar na proporção de 7 g/L. Os tubos contendo meio de cultura foram, previamente, vedados com tampa de polipropileno e autoclavados à temperatura de 121°C, durante 20 minutos e 1,2 atm, e deixados em sala a temperatura ambiente. Doze horas após realizou-se a retirada dos embriões. Apenas um embrião foi depositado em cada tubo, tendo sido coletados 240 embriões. Em seguida, o material foi transferido para sala de crescimento à temperatura de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 16M.m⁻².s⁻¹, suprida por lâmpadas grow-lux e branca fria, permanecendo nessas condições por um período de um ano. Ao final deste período, as plântulas já haviam atingido aproximadamente cinco centímetros de tamanho e emitido quatro pares de folhas, estádio em que foram inoculadas. Este procedimento foi utilizado para obtenção das plântulas livres de fungos que permitissem a observação das estruturas dos isolados de *Colletotrichum* inoculados nos tecidos.

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 sadias da mesma cultivar, em campo experimental da UFLA. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas ao Laboratório de Diagnóstico de Enfermidades em Plantas, do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Foram feitas seções dos tecidos infectados e sadios, as quais foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (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 (extrato de malte-ágar) 2%, e incubadas por 7 dias em câmara de crescimento à temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas. Após a constatação de crescimento fúngico foram retirados fragmentos de meio contendo micélio e levados ao microscópio de luz para a identificação do patógeno (Sutton, 1980).

Foram obtidos dois isolados das plantas sintomáticas, sendo, um isolado da haste (IH) e outro isolado da folha (IF), identificados como pertencentes ao grupo do *C. gloeosporioides*. De ramos de cafeeiros assintomáticos foi obtido *C. dematium* (ID). Após 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, foi confirmada a identificação pelos mesmos critérios.

Neste estudo também foi utilizado um isolado de fruto de mangueira com sintomas de antracnose (IM) que passou pelos mesmos critérios de isolamento e identificação descritos para os isolados de cafeeiro e foi identificado como

um fungo do grupo do *C. gloeosporioides*. O objetivo de se utilizar este isolado foi verificar como se comportava um isolado de *C. gloeosporioides* de outra espécie de planta quando inoculado em cafeeiro.

Inoculação

Em placas de Petri, contendo duas folhas de papel de filtro, previamente esterilizadas foram colocados dois suportes de plástico, desinfestados em hipoclorito e álcool 70%. Em um dos suportes colocou-se o hipocótilo (três centímetros) e no outro, folhas de plântulas, cultivar Rubi, obtidas conforme descrito anteriormente. Com agulha entomológica, feriu-se o hipocótilo e as folhas e, em seguida, depositou-se 10µL de cada suspensão de conídios, ajustada a 10⁶ conídios mL⁻¹ com uma micropipeta automática. As testemunhas foram inoculadas com água autoclavada. Para cada isolado, foram preparadas onze placas, sendo uma para cada tempo amostrado. O papel de filtro foi molhado com água destilada esterilizada para promover câmara úmida. As placas de Petri foram incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Coleta de amostras

Amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados (2, 3, 5, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 114 e 144 horas), e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2), por um período mínimo de 24 horas, para serem preparadas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura.

Preparo das folhas para análise em MEV

As amostras de folhas inoculadas, duas folhas para cada isolado em cada tempo, foram retiradas do fixador Karnovsky modificado e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo tampão cacodilato de sódio 0,05M, onde permaneceram por dez minutos. O tampão foi trocado três vezes. Após esta etapa as amostras foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em água destilada, por duas horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente as amostras foram lavadas com água destilada por três vezes e desidratadas em série crescente de concentração 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 completar a secagem pelo método do ponto crítico do CO₂. Após completa a desidratação as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” (cilindros de alumínio com 12mm de diâmetro) cobertos com fita de carbono dupla face para aderência das amostras e cobertas com 20nm de ouro, em aparelho Balzers SCD 050. A observação e documentação foram realizadas em MEV Evo 40XVP, utilizando 20 KeV de voltagem de aceleração e 9mm de distância de trabalho. As imagens geradas depois de gravadas foram visualizadas e trabalhadas no software photopaint do pacote Corel Draw 12.

Preparo dos hipocótilos para análise em MEV

Amostras de hipocótilos foram retiradas do fixador e transferidas para glicerol 30% por 30 minutos; em seguida, imersas em nitrogênio líquido e fragmentadas com bisturi sobre placa de metal, mantida a temperatura do nitrogênio líquido. Após seccionados transversalmente, 15 fragmentos de hipocótilos foram colocados em tubos de 1,5 mL contendo água destilada e preparados para MEV, seguindo a metodologia descrita acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aderência e germinação de conídios

A aderência dos conídios de todos os isolados foi maior nas regiões onde havia maiores depressões, ou seja, nas regiões sobrejacentes às paredes anticlinais do hipocótilo (Figura 1A) e nas junções das células da epiderme das folhas e ou dos estômatos (Figura 1B). Esta adesão 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. A adesão do esporo à superfície do hospedeiro influencia no desenvolvimento da doença, pois, uma rápida adesão dos conídios é relevante para o sucesso do estabelecimento do patógeno (Mercure *et al.*, 1994).

Foi observada uma protuberância sugestiva de septo nos conídios, duas horas após a inoculação no isolado IH (Figura 1C) e três horas para os demais isolados. Como observado em conídios de *C. graminicola* (Skoropad, 1967) e *C. truncatum* (Staples *et al.*, 1976), o início da germinação também é precedido da formação de um septo.

A emissão do tubo germinativo foi observada a partir de cinco horas para isolados de *C. gloeosporioides* e 12 horas após para *C. dematium*. A germinação de conídios dentro do gênero *Colletotrichum* é bastante variável, iniciando-se entre 3 e 48 horas (Bailey *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2005) dependendo, ainda, de fatores externos como temperatura (Orozco, 2003), presenças de compostos químicos (Liu & Kolattukudy, 1998) e presença de materiais exógenos (Bailey & Jeger, 1992; Skipp *et al.*, 1995). Pereira e colaboradores (2005) verificaram que a germinação de *C. gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiro, ocorreu 6 horas após a inoculação; este tempo também foi necessário para germinação de conídios de *C. acutatum* em *Pinus radiata* (Nair & Corbin, 1981).

Os tubos germinativos foram formados, tanto nas extremidades quanto lateralmente. *C. gloeosporioides* emitiu apenas um tubo (Figura 1F) enquanto que *C. dematium* emitiu um, dois, e até três tubos germinativos (Figura 1E). Estes resultados são reforçados por outros autores que verificaram eventos semelhantes, mostrando que a emissão múltipla de tubo germinativo é comumente relatada para este gênero (Nair & Corbin, 1981; Roberts & Snow, 1984; Manandhar *et al.*, 1985; Pereira *et al.*, 2005).

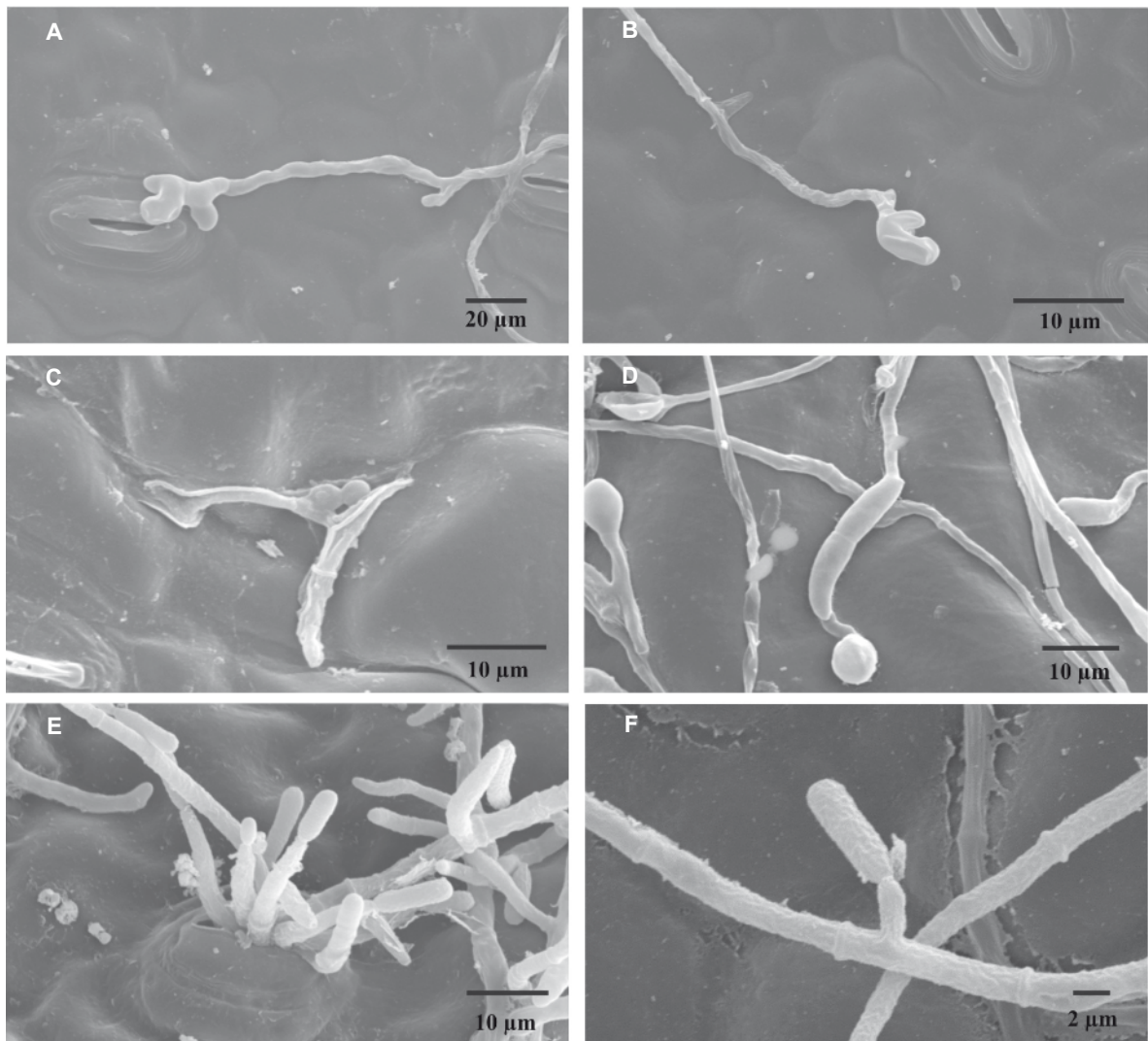


FIG. 1 - Eletromicrografia de varredura mostrando eventos de pré-penetração de *Colletotrichum* spp. **A.** aderência de conídios de *C. gloeosporioides* em regiões anteclinais do hipocótilo; **B.** em depressão de células subsidiárias do aparelho estomático; **C.** septação de conídios (seta) de *C. gloeosporioides* 12 horas após a inoculação; **D.** formação de apressório em *C. dematium* a partir de um tubo germinativo curto, doze horas após a inoculação (setas); **E.** emissão de múltiplos tubos germinativos (setas) em *C. dematium*; **F.** apressório (seta) formado na extremidade do tubo germinativo de *C. gloeosporioides*, 24 horas após a inoculação.

Formação de apressório.

Foram observados apressórios apenas para o isolado de *C. dematium* (12 HAI) e para o isolado de folha de *C. gloeosporioides* (IF) (24 HAI). Garcia (1999) observou a formação de apressório em tempos semelhantes, penetração direta dos tecidos 19 horas após inoculação. O crescimento do tubo germinativo foi variável antes da emissão do apressório, sendo verificado tubos germinativos curtos e longos (Figuras 1D e F, respectivamente). Após o alongamento do tubo germinativo *C. gloeosporioides* (IF) formou apressório globoso a subgloboso, de contorno regular, delimitado por um septo (Figura 1F). De acordo

com Chen *et al.* (2004), a penetração da hifa de apressórios de *C. kahawae* está relacionada com a pressão de turgor do apressório e que esta pressão pode ser influenciada por vários fatores como melanização do apressório e cutinase presente nos conídios. A importância do apressório para a penetração não foi avaliada em nosso estudo.

Em *C. dematium* (ID) observou-se diferentes tipos de apressórios: Trilobados, em forma de vírgula, em forma de pé e globosos no final de tubos germinativos curtos a 96 horas após a inoculação (Figura 2). Esta variação de formas de apressórios foi verificada também para *C. gloeosporioides* em cafeeiro por Pereira *et al.* (2005).

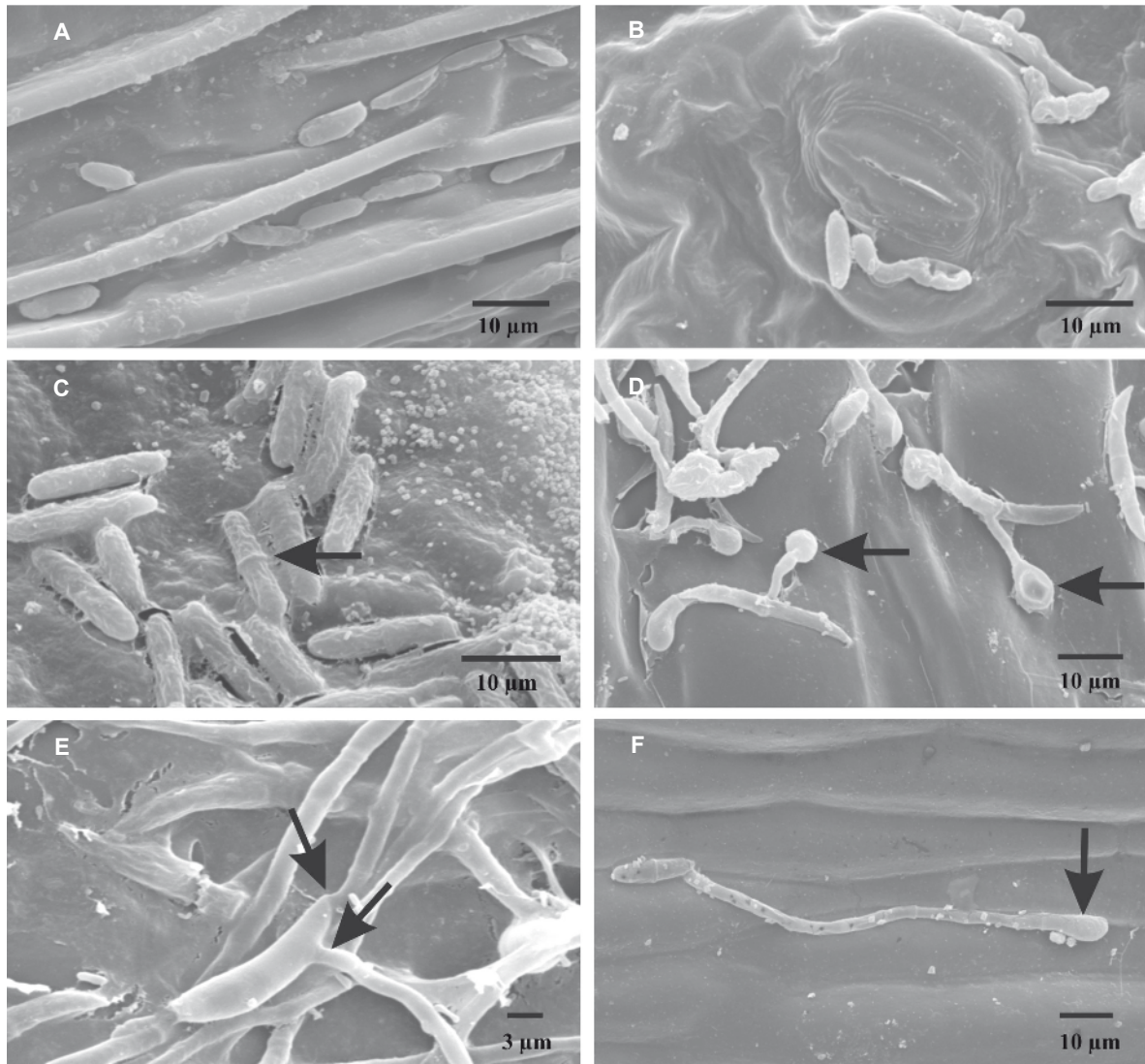


FIG. 2 - Eletromicrografia de varredura mostrando diferentes tipos de apressórios produzidos por *C. dematium* e formação de conidióforos por *C. gloeosporioides*. **A.** Apressório trilobado de *C. dematium*; **B.** apressório de *C. dematium* em forma de vírgula; **C.** apressório de *C. dematium* em forma de pé; **D.** apressório globoso de contorno regular em *C. dematium*; **E.** conidióforo de *C. gloeosporioides* saindo de estômato com células conidiogênicas e conídios enteroblásticos filiais; **F.** célula conidiogênica formada lateralmente em hifa.

Conidiogênese e formação de acérvulo

Acérvulo foi observado no isolado (IH) de *C. gloeosporioides* e no isolado de *C. dematium* (ID). No entanto, o isolado IF exibiu conidióforo, mostrando uma conidiogênese enteroblástica filial típica do gênero *Colletotrichum*, fenômeno observado em tecido do hipocótilo. O mesmo foi verificado no isolado da haste 24 HAI (Figura 2E) e no isolado de manga 96 horas após a inoculação. Células conidiogênicas foram produzidas lateralmente em hifas (Figura 2F), nos isolados IM e no IH 48 HAI.

O isolado da haste produziu acérvulo a partir

de conidióforos formados sobre uma base estromática subcuticular que rompeu a cutícula 72 HAI. Setas contendo conídios nas extremidades foram observadas até 144 HAI (Figura 3A), quando a produção de acérvulo foi bastante acentuada (Figura 3B). Os acérvulos produzidos por *C. dematium* foram observados em tecidos do hipocótilo a partir de 96 HAI, com produção de setas pontiagudas sem produção de conídios nas extremidades (Figura 3C). Até o presente, apenas um autor descreveu a formação de acérvulo em tecidos de cafeeiro inoculados com *C. gloeosporioides* em microscópio de luz, nove dias após a inoculação (Orozco, 2003).

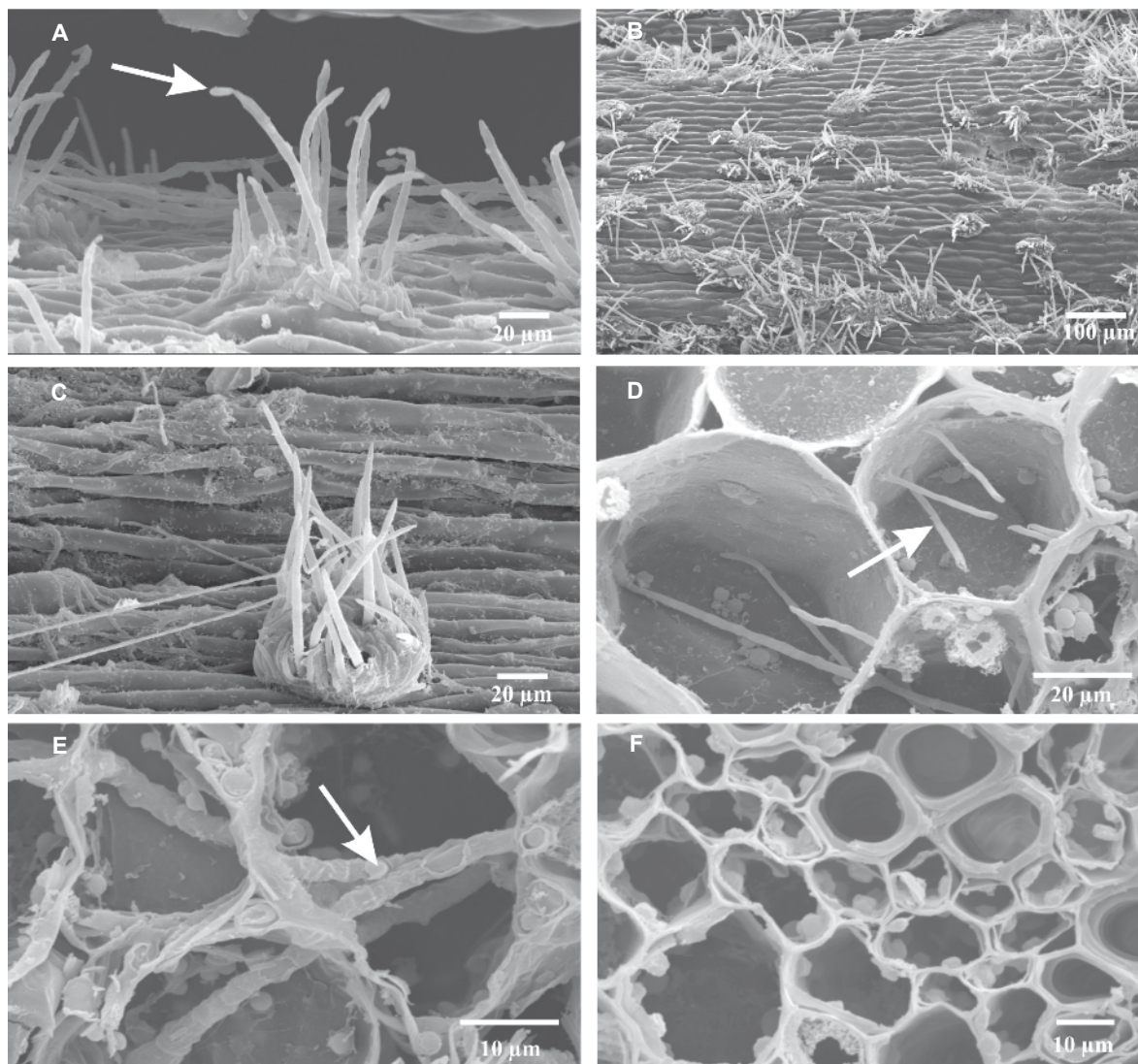


FIG. 3 - Eletromicrografia de varredura mostrando colonização e reprodução de *C. gloeosporioides* e *C. dematium*. **A.** acérvulos formados por *C. gloeosporioides* (IH) em base estromática com setas pontiagudas produzindo conídios na extremidade; **B.** grande quantidade de acérvulos formados por *C. gloeosporioides* (IH) em tecido de hipocótilos 114 horas após a inoculação; **C.** acérvulo formado por *C. dematium* em tecido de hipocótilo 72 horas após a inoculação; **D.** hifas de *C. gloeosporioides* (IM) penetrando as células do córtex; **E.** hifas de *C. gloeosporioides* (IH) destruindo tecidos; **F.** corte transversal do hipocótilo de plântula testemunha mostrando vasos do xilema e células do córtex sem colonização.

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 HAI e isso foi evidenciado até 144 HAI. As hifas perfuraram as células e foram colonizando todo o tecido hospedeiro em todas as direções. Uma vez tendo penetrado no mesófilo foliar e ou no córtex de hipocótilos, a hifa aumentou seu diâmetro em duas a três vezes e colonizou os espaços intercelulares causando destruição extensiva dos tecidos (Figura 3E), o que não ocorreu no tecido das plantas testemunhas inoculadas com água autoclavada esterilizada (Figura 3F).

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 (Garcia, 1999; Chen, 2002; Chen *et al.*, 2004). Foi mostrado que os isolados testados neste estudo não apresentam especificidade em relação ao hospedeiro, já que o isolado de manga também colonizou os tecidos de plântulas de cafeeiro.

Na tabela 1 estão apresentadas, de forma sumarizada, os eventos formados pelos diferentes isolados. Considerando estes eventos, verificou-se que *C. gloeosporioides*, isolado de manga, coloniza tecidos de cafeeiro. Entretanto, *C.*

TABELA 1 - Estruturas formadas pelas espécies de *Colletotrichum*, inoculados em folhas e hipocótilos de plântulas de café, considerando a evolução no tempo para os diferentes eventos da penetração, colonização e conidiogênese

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. dematium</i> (ID)	3 horas	12 horas	12 horas	NO	96 horas	F/E ⁵

(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 conidióforo; (PA)² Produção de acérvulo; (MP)² Modo de penetração; (NO)³ Não observado até 114h após inoculação; (F)⁴ penetração por ferimento; (F/E)⁴ penetração por ferimento e estômato; (IH)¹ Isolado da haste de cafeeiro; (IF)¹ Isolado de folha cafeeiro; (IM)¹ Isolado de manga (CML 461)¹ da Coleção Micológica de Lavras; (ID)¹ Isolado de cafeeiro sadio.

gloeosporioides (IH) mostrou-se mais infectivo durante o processo de colonização e formação de estruturas reprodutivas. Neste sentido, este estudo é pioneiro na demonstração desses processos em plantas de cafeeiro com diferentes isolados. Outros estudos devem ser desenvolvidos, porque há evidências que existam ainda outras espécies de *Colletotrichum* em cafeeiro, ainda não estudadas, e também outras estratégias de infecção.

AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J.A & JEGER, M.J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Kew. CAB International. 1992.

GARCIA, I. Histologia e ultra-estrutura do processo de infecção de *Colletotrichum kahawae* e *C. gloeosporioides* em *Coffea arabica*. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 1999.

CHEN Z. Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *C. gloeosporioides* isolated from coffee berries. PhD Thesis. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 2002.

CHEN, Z., NUNES, M.A. & SILVA, M.C. Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. *Mycologia* 96:1199-1208. 2004.

DIAS, M.D., POZZA, E.A., ABREU, M.S. & OROZCO MIRANDA, E.F. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia* 29:545-552. 2005.

DILLARD, H.R. Effect of temperature, wetness duration, and inoculation density on infection and lesion development

of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. *Phytopathology* 79:1063- 1066. 1989.

ESTRADA, A.B., DODD, J.C. & JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 49: 608-618.2000.

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

KUMAR, V., GUPTA, V.P., BABU, A.M., MISHRA, R.K., THIAGARAJAN, V. & DATTA, R.K. Surface ultra-structural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on Mulberry Leaf Causing Black Spot Disease. *Phytopathology* 149:629-633. 2001.

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

MANANDHAR, L.B., KUWAR, I.K., TRIBHUWAN, S.G., HARTMAN, L. & SINCLAIR, B. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. *Phytopathology* 75:705-709. 1985.

MENEZES, M. & SILVA-HANLIN, D.M.W. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Imprensa Universitária, UFRPE, 1997.

MERCURE, E.W., KUNOH, H. & NICHOLSON, R.L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45:407-720. 1994.

NAIR, J. & CORBIN, J.B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. pinea. *Phytopathology* 71:777-783. 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*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG. 2003.

PEREIRA, I.S., ABREU, M.S., FERREIRA, J.B. & ALVES, E.

Pré-infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiros inoculados artificialmente. Anais, 4º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. CD. Londrina, 2005.

PERFECT, S.E., HUGHES, H. B., O'CONNELL, R.J. & GREEN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genetics and Biology 27:186-198. 1999.

ROBERTS, R.G & SNOW, J.P. Histopathology of cotton ball rot caused by *Colletotrichum capsici*. Phytopathology 74:390-397. 1984.

SKIPP, R.A., BEEVER, R.E., SHARROCK, K.R., RIKKERINK, E.H.A. & TEMPLETON, M.D. *Colletotrichum*. In: Kohmoto, K., Singh, U.S. & Singh, R.P. (Eds.) Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Oxford. Oxford Pergamon - Elsevier

Science. 1995. pp. 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 47:431-434. 1967.

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

SUTTON, B.C. The Coelomycetes. Surrey. CMI Kew. 1980.

SUZUKI, K., FURUSAWA, I., ISHIDA, N. & YAMAMOTO, M. Protein synthesis during germination and appressorium formation of *Colletotrichum lagenarium* spores. Journal of General Microbiology 124:61-69. 1981.

Recebido 27 Março 2006 – Aceito 20 Dezembro 2007 – FB 6038