

**FUNGOS ENDÓFITOS E ESPÉCIES DE *Phoma*  
ASSOCIADAS AO CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

**ANDERSON RESENDE ALMEIDA**

**2007**

ANDERSON RESENDE ALMEIDA

**FUNGOS ENDÓFITOS E ESPÉCIES DE *Phoma*  
ASSOCIADAS AO CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

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

Almeida, Anderson Resende

Fungos endófitos e espécies de *Phoma* associadas ao cafeeiro (*Coffea arabica*  
L.) / Anderson Resende Almeida. -- Lavras : UFLA, 2007.

84 p. : il.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Diversidade. 2. Café orgânico. 3. Fungo endófito. 4. *Phoma tarda*. 5.  
*Phoma exigua*. 6. Mancha de phoma. 7. Patogenicidade. 8. Espécie filogenética. 9.  
 $\beta$ -tubulina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

**ANDERSON RESENDE ALMEIDA**

**FUNGOS ENDÓFITOS E ESPÉCIES DE *Phoma* ASSOCIADAS AO  
CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do Curso  
de Doutorado em Agronomia, área de  
concentração Fitopatologia, para obtenção do  
título de “Doutor”.**

APROVADA em 02 de abril de 2007

Prof. Dr. Robert W. Barreto

UFV

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

EPAMIG

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu

UFLA

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA



Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus,

pelo seu imenso amor para com todos nós.

**OFEREÇO.**

A minha esposa, Juliana, pelo amor e apoio.

Aos meus pais, Joaquim Sávio e Zuleica, pelo apoio e dedicação.

As minhas irmãs Alessandra e Alcione, e ao meu irmão Alfredo pelo apoio.

Aos meus sogros Renato e Lais

Ao cunhado Narciso e a cunhada Renata

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida, minha luz e minha salvação.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento de parte deste trabalho.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do café (CBP&D) pelo financiamento de parte deste trabalho.

Ao Professor Ludwig Heinrich Pfenning, pela orientação, paciência e confiança.

Aos professores Mário Lúcio Vilela de Resende, Mário Sobral de Abreu e Robert W. Barreto, e a pesquisadora Sara Maria Chalfoun de Souza pelas valiosas sugestões e participação na banca examinadora.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários e laboratoristas do DFP.

Aos colegas de labuta do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos: Breno, Edson, Elisa, Érika, Janine, Julian Maurício, Juliano, Júnior, Larissa, Loise, Mário, Natália, Sarah, Vivian e em especial ao Cristiano e ao Lucas Abreu, pelas sugestões e apoio constantes e à pesquisadora Mirian Sagado pela colaboração em todas as fases deste trabalho.

Aos amigos Cesar Elias Botelho e José Geraldo Donizetti Santos.

Aos proprietários das fazendas Cachoeira e Taquaril pela gentileza em abrirem as porteiças para a realização das coletas.

Ao apoio prestado pelos professores, funcionários e alunos do Laboratório de Virologia Vegetal da UFLA, Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA e ao Laboratório de Biologia Molecular da ESALQ - USP.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | i  |
| ABSTRACT.....  | ii |
| CAPÍTULO 1 Fungos endófitos e espécies de <i>phoma</i> associadas ao cafeeiro .....          | 1  |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL .....   | 2  |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO .....  | 4  |
| 2.1 Fungos endófitos .....   | 4  |
| 2.1.1 Conceitos.....   | 6  |
| 2.1.2 Detecção e isolamento de fungos endófitos.....   | 8  |
| 2.1.3 Taxonomia.....   | 11 |
| 2.1.4 Padrões de distribuição dos fungos endófitos.....                                      | 13 |
| 2.2 <i>Phoma</i> .....   | 15 |
| 2.2.1 Sintomatologia e epidemiologia das doenças causadas por <i>Phoma</i> em cafeeiros ..   | 16 |
| 2.2.2 Histórico da classificação dos gêneros <i>Phoma</i> e <i>Ascochyta</i> .....           | 17 |
| 2.2.3 Etiologia da mancha de phoma do cafeeiro.....  | 19 |
| 2.2.4 Caracterização molecular .....   | 20 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 22 |
| CAPÍTULO 2 Fungos endófitos em cafeeiro cultivado sob sistemas orgânico e convencional ..... | 31 |
| RESUMO .....   | 32 |
| ABSTRACT.....  | 33 |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 34 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 37 |
| 2.1 Coleta de material vegetal .....   | 37 |
| 2.2 Isolamento e identificação de fungos endófitos.....                                      | 38 |
| 2.3 Análise estatística .....  | 39 |
| 3 RESULTADOS.....  | 40 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1 Colonização e biodiversidade.....                            | 40 |
| 3.2 Padrões de colonização .....                                 | 42 |
| 4 DISCUSSÃO.....   | 45 |
| 4.1 Colonização e biodiversidade.....                            | 45 |
| 4.2 Padrões de colonização .....                                 | 48 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                               | 50 |
| CAPÍTULO 3_Espécies de <i>phoma</i> associadas ao cafeeiro ..... | 55 |
| RESUMO .....   | 56 |
| ABSTRACT .....   | 57 |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 58 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 60 |
| 2.1 Obtenção de isolados e estudos morfológicos .....            | 60 |
| 2.2 Extração de DNA .....  | 62 |
| 2.3 Sequenciamento e análise filogenética .....                  | 63 |
| 2.4 Teste de patogenicidade .....                                | 65 |
| 3 RESULTADOS .....   | 67 |
| 3.1 Caracterização Morfológica .....                             | 67 |
| 3.2 Caracterização Molecular.....                                | 67 |
| 3.2.1 Análise das seqüências .....                               | 67 |
| 3.2.2 Filogenia.....   | 72 |
| 3.3 Patogenicidade .....   | 73 |
| 4 DISCUSSÃO.....   | 76 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                               | 80 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                     | 83 |



## RESUMO

ALMEIDA, Anderson Resende. **Fungos endófitos e espécies de *Phoma* associadas ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais Brasil.<sup>1</sup>

Com o objetivo de contribuir para o conhecimento da diversidade de fungos associados ao cafeeiro no Brasil foram realizados estudos sobre fungos endófitos de cafeeiros em sistema orgânico e convencional de cultivo e sobre as espécies de *Phoma* associadas a este hospedeiro. Para o estudo de fungos endófitos foram realizadas coletas de material vegetal em duas fazendas no município de Santo Antônio do Amparo, Sul de Minas Gerais, nos meses de janeiro e setembro de 2005 e abril de 2006. Após a desinfestação superficial, fragmentos de folhas e hastes foram transferidos para meio de cultura. 1726 unidades formadoras de colônias (UFCs) foram obtidas a partir deste material. As espécies mais frequentes foram *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. crassipes*, *Staninwardia* sp., *Phomopsis* spp. e *Xylaria* spp. O sistema orgânico apresentou taxa de colonização de 53,9%, 993 UFCs e 38 espécies enquanto o sistema convencional apresentou taxa de colonização de 44,6%, 733 UFCs e 33 espécies. O número de isolados observados foi significativamente superior nas hastes em ambos os sistemas. *Pseudohalonectria lutea* e *Staninwardia* sp. são relatados pela primeira vez em café. Foi realizado ainda um levantamento de *Phoma* em 23 municípios do Estado de Minas Gerais e no sudoeste da Bahia com o objetivo de caracterizar as espécies por meio de caracteres morfológicos, moleculares e patogenicidade. Dentre os aproximadamente 60 isolados avaliados foram identificadas *P. tarda*, *P. exigua* var. *exigua*, *P. jolyana* var. *jolyana*, *P. leveillei* e *P. herbarum*. *P. tarda* apresentou-se ocorrência generalizada nas lavouras estudadas e como única espécie patogênica, considerada, portanto, o principal agente etiológico da mancha de phoma do cafeeiro. Na análise filogenética *Ascochyta coffeae* e *Phoma tarda* corresponderam à mesma espécie. Análises de seqüências de  $\beta$ -tubulina e região dos espaçadores internos transcritos (ITS) do rDNA foram utilizadas para avaliar as relações filogenéticas entre *P. tarda* e outras espécies. Na análise de máxima parcimônia, *P. tarda* é agrupado junto a *P. exigua* no mesmo clado. Este agrupamento evidencia a relação estreita entre *P. tarda* e *P. exigua*, que não puderam ser diferenciadas com as regiões analisadas. Assim, regiões mais variáveis devem ser utilizadas para a separação dessas espécies. Outra hipótese é de que *P. tarda* e *P. exigua* correspondam à mesma espécie filogenética.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning (Orientador), Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador)

## ABSTRACT

ALMEIDA, Anderson Resende. **Fungal endophytes and *Phoma* species associated with coffee trees (*Coffea arabica* L.).** 2007. 83 p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>2</sup>

With the objective to contribute to the knowledge about the diversity of fungi associated with the coffee tree in Brazil, studies of the endophytic fungi of coffee trees in organic and conventional management systems, and the *Phoma* species associated were carried out. The endophytic fungi were surveyed in January and September of 2005, and April of 2006, in two farms of Santo Antônio do Amparo municipality, South of Minas Gerais State. After superficial disinfections, fragments of leaves and shoots were transferred to culture medium. A total of 1726 colony forming units (CFUs) were obtained from the material. *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. crassipes*, *Staninwardia* sp., *Phomopsis* spp. and *Xylaria* spp. were the most frequent species found. The organic system presented colonization rate of 53.9%, 993 CFUs, and 38 species, while in the conventional system the colonization rate was 44.6%, 733 CFUs and 33 species. The number of isolates observed was significantly superior in the shoots in both systems ( $P=0,0000$ ). *Pseudohalonectria lutea* and *Staninwardia* sp. are reported for the first time in association with coffee trees. A survey of the occurrence of *Phoma* in 23 municipalities in both Minas Gerais State and in the Southwest of Bahia State also was done with the objective to characterize the species through morphological and molecular characters, and pathogenicity. Among the approximately 60 strains evaluated *P. tarda*, *P. exigua* var. *exigua*, *P. jolyana* var. *jolyana*, *P. leveillei* and *P. herbarum* were identified. *P. tarda*, the main causal agent of the Phoma leaf blight of coffee trees, presented generalized occurrence in the plantations studied, and was the sole pathogenic species found. In the phylogenetic analyses *Ascochyta coffeae* and *Phoma tarda* were conspecific. Portions of  $\beta$ -tubulin gene and the internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA were used to evaluate the phylogenetic relationships between *P. tarda* and the other *Phoma* spp. In the maximum parsimony analysis *P. tarda* was in a clade together with *P. exigua*. This grouping evidenced the narrow relationship between *P. tarda* and *P. exigua*, not differentiated with both genomic regions. Thus, more variable regions of the genome should be analyzed in future studies to test if *P. tarda* and *P. exigua* are from the same phylogenetic species.

---

<sup>2</sup> Advising Committee: Ludwig H. Pfenning (Advisor), Eduardo Alves – UFLA (Co-advisor)

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Minas Gerais é o Estado com a maior produção de café do país (CONAB, 2006). Entretanto, o acompanhamento de fatores que podem afetar a produtividade é indispensável para a manutenção da alta qualidade e do rendimento do produto. Os fungos são os principais causadores de doenças na cultura do café, acarretando perdas significativas (Zambolim & Vale, 2000).

Existem, ainda, muitos fungos que vivem no interior das plantas sem causar sintomas visíveis de doença. Nem sempre a função biológica e o tipo de simbiose podem ser claramente definidos (Redman et al., 2001).

Muitas informações sobre fungos endófitos foram acumuladas nas últimas três décadas. Vários estudos confirmam a presença generalizada de fungos endófitos em várias famílias de plantas, tanto de regiões tropicais quanto temperadas, demonstrando ser a interação planta-endófito tão comum quanto as associações micorrízicas. A obtenção de informações detalhadas sobre fungos endófitos associados ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.) abrirá as portas para estudos futuros envolvendo as funções ecofisiológicas dos fungos endófitos e seu potencial para produção de substâncias bioativas ainda desconhecidas, e também a utilização destes endófitos para controle de patógenos. Fungos endófitos representam importante fonte de novos compostos bioativos com potencial uso para controle alternativo de fitodoeças ou para o desenvolvimento de novos fármacos.

Doenças como a ferrugem do cafeeiro, causado por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., ou a cercosporiose, que tem como agente etiológico o fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, são reconhecidas como de grande importância e são muito estudadas. Entretanto, a mancha de phoma e a seca de ponteiros, causadas por espécies do gênero *Phoma* e *Colletotrichum*, receberam

## **CAPÍTULO 1**

### **FUNGOS ENDÓFITOS E ESPÉCIES DE *PHOMA* ASSOCIADAS AO CAFEIEIRO**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Minas Gerais é o Estado com a maior produção de café do país (CONAB, 2006). Entretanto, o acompanhamento de fatores que podem afetar a produtividade é indispensável para a manutenção da alta qualidade e do rendimento do produto. Os fungos são os principais causadores de doenças na cultura do café, acarretando perdas significativas (Zambolim & Vale, 2000).

Existem, ainda, muitos fungos que vivem no interior das plantas sem causar sintomas visíveis de doença. Nem sempre a função biológica e o tipo de simbiose podem ser claramente definidos (Redman et al., 2001).

Muitas informações sobre fungos endófitos foram acumuladas nas últimas três décadas. Vários estudos confirmam a presença generalizada de fungos endófitos em várias famílias de plantas, tanto de regiões tropicais quanto temperadas, demonstrando ser a interação planta-endófito tão comum quanto as associações micorrízicas. A obtenção de informações detalhadas sobre fungos endófitos associados ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.) abrirá as portas para estudos futuros envolvendo as funções ecofisiológicas dos fungos endófitos e seu potencial para produção de substâncias bioativas ainda desconhecidas, e também a utilização destes endófitos para controle de patógenos. Fungos endófitos representam importante fonte de novos compostos bioativos com potencial uso para controle alternativo de fitodoenças ou para o desenvolvimento de novos fármacos.

Doenças como a ferrugem do cafeeiro, causado por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., ou a cercosporiose, que tem como agente etiológico o fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, são reconhecidas como de grande importância e são muito estudadas. Entretanto, a mancha de phoma e a seca de ponteiros, causadas por espécies do gênero *Phoma* e *Colletotrichum*, receberam

menos atenção. Ao mesmo tempo em que se observa o aumento de sua incidência nas lavouras de café, a identidade precisa e o status patológico destes fungos permanecem ainda obscuros.

Na primeira parte dessa Tese serão apresentados os resultados de pesquisas sobre fungos endófitos associados ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Na segunda parte serão relatados os dados obtidos de estudos sobre fungos do complexo *Phoma* - *Ascochyta* associados ao cafeeiro.

Foram objetivos dos estudos:

- i. isolar, caracterizar e identificar espécies de fungos endófitos de cafeeiro a partir de folhas e hastes;
- ii. comparar a composição de espécies e os padrões de colonização pelos fungos endófitos entre cafeeiros cultivados sob sistema orgânico e convencional;
- iii. isolar e caracterizar espécies de *Phoma* por meio de marcadores morfológicos, moleculares e determinação da patogenicidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fungos endófitos

De modo geral, para se estabelecerem em seu habitat, as plantas interagem direta ou indiretamente com diferentes espécies de seres vivos. Entre estas interações ou associações destacam-se as mutualísticas, estabelecidas com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio. Estas associações se caracterizam pela existência de parte dos organismos associada dentro dos tecidos da planta e outra parte, fora dos tecidos.

Por outro lado, o interior dos tecidos de plantas saudáveis abriga uma diversidade de microorganismos capazes de colonizar órgãos aéreos e subterrâneos de suas plantas hospedeiras sem causar sintomas visuais externos de sua presença. Estes microorganismos endófitos vivem em uma estreita relação de simbiose com seus hospedeiros, variando desde um parasitismo latente ao mutualismo (Carroll, 1988, 1995).

A existência de fungos no interior de tecidos vegetais saudáveis já é conhecida há muito tempo; porém, os fungos eram vistos como patógenos latentes ou saprófitos oportunistas. Somente a partir da década de 70, com os estudos de Berstein & Carroll (1977) e Carroll & Carroll (1978), nos quais várias espécies de fungos endófitos foram recuperadas de acículas saudáveis de várias coníferas, ocorreu o despertar para estudos com endófitos. Vários estudos confirmam a presença generalizada de endófitos em várias famílias de plantas, tanto de regiões tropicais quanto temperadas, demonstrando ser a interação planta-endófito tão comum quanto as associações micorrízicas.

Interações mutualísticas bem definidas podem ser observadas entre algumas espécies de endófitos e algumas espécies de gramíneas e ciperáceas. Estes endófitos são conhecidos como *Balansiaceous* e incluem ascomicetos da

família Balansiaceae, pertencentes aos gêneros *Epichloë* e *Balansia*, e seus anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*. Os endófitos recebem nutrição e proteção da planta hospedeira, enquanto a planta hospedeira pode ser beneficiada pelo aumento das habilidades competitivas e pelo aumento da resistência a herbívoros, patógenos e a estresse abiótico (Schardl & Clay, 1997). Estes fungos colonizam seus hospedeiros de maneira sistêmica e muitas vezes são capazes de colonizar o interior de sementes, sendo transmitidos verticalmente de geração a geração, juntamente com suas plantas hospedeiras (Schardl & Clay, 1997; Schardl et al., 2004).

A disseminação de fungos endófitos associados a arbustos, árvores e plantas herbáceas ocorre horizontalmente via esporos, que penetram os tecidos da planta através de aberturas naturais, ou diretamente, com auxílio de um aparato enzimático. A colonização das plantas lenhosas por fungos endófitos é usualmente localizada, específica para um tipo de órgão ou tecido e pode ocupar uma pequena área do tecido infectado (Fischer e Petrini, 1992; Petrini, 1992).

O interesse em estudar fungos endófitos vem aumentando nos últimos anos, com destaque para três principais vertentes como objeto de estudo, a saber: 1. determinação de sua importância como segmento da diversidade biológica de fungos, considerando sua elevada especialização ao ambiente em que vivem (Arnold et al., 2000; Cannon & Simmons, 2002; Rodrigues & Petrini, 1996); 2. esclarecimento de sua função para a saúde das plantas e seu envolvimento em processos de resistência a patógenos, pragas e estresses climáticos (Arnold et al., 2003; Azevedo et al., 2000; Redman et al., 2001; Rubini et al., 2005); e 3. avaliação de seu potencial como produtores de metabólitos com atividade biológica com potencial para aproveitamento na agricultura e medicina (Schulz et al., 2002; Strobel, 2002).

Há relatos sobre a utilização de fungos não patogênicos controlando fungos patogênicos, como, por exemplo, *Fusarium oxysporum* Schlecht., que na



sua forma não patogênica controla *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* raça 2 do tomateiro, e *F. oxyspororum* Fo47, capaz de induzir resistência a plantas de pepino contra *Pythium ultimum* Trow (Alabouvette et al., 2006; Benhamou et al., 2002; Silva & Bettiol, 2005). Fungos endófitos também possuem um grande potencial para o controle biológico de patógenos (Arnold et al., 2003; Rubini et al., 2005; Tondje et al., 2006).

### 2.1.1 Conceitos

O termo endofítico foi proposto pela primeira vez por De Bary, em 1866, para descrever os microorganismos que colonizavam os tecidos internos da planta (citado por Fröhlich et al., 2000). Durante mais de um século esses organismos foram ignorados, principalmente pelo fato de não produzirem estruturas externas visíveis em tecidos vivos de seus hospedeiros. Estes foram considerados como patógenos em latência ou saprófitos, uma vez que a colonização dos tecidos não causava danos a plantas hospedeiras (Rayner, 1948).

Fungos endófitos vivem internamente nos tecidos de plantas hospedeiras sem causar sintomas aparentes de doença (Chanway, 1996); porém, isto não impede que eles se tornem patogênicos quando o hospedeiro sofrer algum estresse (Carroll, 1988). Além disso, fungos endófitos podem ser patógenos latentes, mutualistas e/ou saprófitas (Fisher & Petrini, 1992). Entretanto, a distinção entre fungo patogênico e mutualista nem sempre é possível.

Alguns fungos desenvolvem associações de natureza diferente dependendo da planta hospedeira e/ou das condições do ambiente, podendo aumentar (mutualismo), diminuir (parasitismo) ou não influenciar (comensalismo) no vigor da planta. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg é um típico exemplo de patógeno latente de milho, o qual pode ser isolado de plantas aparentemente saudáveis (Schulz et al., 1999). Exemplos de mutualismo

incluem os endófitos de gramíneas que produzem metabólitos secundários desagradáveis ou tóxicos para herbívoros (Clay, 1988).

Petrini et al. (1992) sugeriram uma definição mais abrangente do termo endófito, a qual incluía todos os organismos que, durante pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, colonizam o interior dos tecidos vivos de seus hospedeiros sem causar sintomas de doenças. Como podemos observar por esta definição, os endófitos não incluem apenas os fungos filamentosos, mas também leveduras e especialmente bactérias endófitas, fato muitas vezes negligenciado na literatura (Chanway, 1996). Endófitos ocorrem em tecidos aéreos de plantas e também em raízes, porém são distintos das micorrizas por ocuparem exclusivamente o interior dos tecidos, sem formação de hifas externas (Saikkonen et al., 1998).

Fungos endófitos têm atraído a atenção de pesquisadores nas últimas décadas por várias razões: i. estes são encontrados em praticamente todas as plantas; são extremamente abundantes e são bastante diversos (Arnold et al., 2000; Stone & Petrini, 1997); ii. podem alterar a fisiologia dos hospedeiros de tal maneira que as habilidades competitivas são aumentadas, principalmente quando há estresses ambientais (Bacon, 1993; Clay, 1988; Faeth, 2002); iii. constituem uma fonte potencial de novos compostos com atividade biológica (Schulz et al., 2002; Strobel, 2002); e iv. podem proteger as plantas contra o ataque de patógenos e herbívoros (Arnold et al., 2003; Dingle & McGee, 2003; Redman et al. 2001).

Dois tipos de associações mutualísticas são comuns entre endófitos e plantas hospedeiras: mutualismo constitutivo e mutualismo induzido. Mutualismo constitutivo é a associação de endófitos principalmente com gramíneas. Nesta associação os endófitos infectam o óvulo da planta hospedeira e, em consequência, são propagados via semente. Produzem relativamente muita massa fúngica, com um custo metabólico alto para planta hospedeira. Já no mutualismo induzido, os endófitos não infectam as sementes e, por

conseqüência, não possuem esta via de disseminação. Os esporos destes fungos são disseminados pelo vento e pela água. Nesta associação os endófitos infectam as partes vegetativas do hospedeiro e permanecem metabolicamente inativos por determinado período, com relativamente pouca biomassa fúngica no interior das plantas hospedeiras (Carròll, 1988; Clay, 1988; Schardl & Clay, 1997). Pesquisas quantitativas em angiospermas tropicais documentaram notável abundância de endófitos nas folhas das hospedeiras (Arnold et al., 2000; Frölich et al., 2000; Gamboa & Bayman, 2001; Lodge et al., 1996).

### **2.1.2 Detecção e isolamento de fungos endófitos**

Fungos endófitos são geralmente recuperados indiretamente em cultura axênica a partir de fragmentos de tecido vegetal desinfestado superficialmente. A recuperação direta de endófitos de tecidos vegetais senescentes é difícil de ser realizada devido ao crescimento e esporulação de saprófitas decompositores.

O material coletado deve ser processado o mais rápido possível, evitando alterações na composição de espécies e na taxa de colonização por endófitos, causadas por fatores relacionados ao período de estocagem do material (Bills, 1996).

A desinfestação superficial dos tecidos é o primeiro passo no processamento das amostras para isolamentos de fungos endófitos. A série de desinfestação normalmente utilizada é a lavagem do material em água corrente, seguida por álcool, hipoclorito de sódio e uma rápida lavagem final com água ou álcool. Embora esta seqüência seja amplamente utilizada, as concentrações dos agentes desinfestantes e os tempos utilizados em cada etapa são muito variáveis em função do tipo e da idade do material utilizado (Bayman et al., 1998; Fisher & Petrini, 1992; Lodge et al., 1996; Rodrigues, 1994; Schulz et al, 1993). O uso do peróxido de hidrogênio como agente desinfetante (Hata et al., 2002) ou a

lavagem seriada dos tecidos em água destilada sob agitação (Petrini et al., 1990) são menos freqüentes.

Após a desinfestação dos tecidos, estes são fragmentados e transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio de cultura adequado. As folhas são normalmente cortadas em discos com poucos centímetros de diâmetro, os quais podem ser retirados de modo aleatório ou seguindo padrões pré-definidos, tais como discos foliares com ou sem nervuras, na base ou no ápice da lâmina foliar (Frohlich et al., 2000; Gamboa & Bayman, 2001; Hata et al., 2002; Photita et al., 2001). Tecidos mais rígidos, como cascas e ramos, são também cortados em pedaços com alguns centímetros e posteriormente transferidos para meio de cultura (Bills & Polishook, 1991).

O tamanho dos fragmentos a serem colocados no meio de cultura interfere nos resultados do isolamento. Fragmentos grandes podem conter infecções múltiplas, resultando no crescimento de diversos endófitos a partir de um único fragmento. Isso deve ser evitado, pois alguns endófitos de crescimento mais rápido podem suprimir o crescimento de outros e, com isso, ocultá-los, fazendo com que a estimativa da diversidade de endófitos seja subestimada (Carrroll, 1995). Uma solução para este problema é a diminuição do tamanho dos fragmentos de tecido vegetal de maneira a aumentar a superfície de contato com o meio de cultura, aumentando a chance de recuperação de um maior número de isolados por unidade de área amostrada (Gamboa et al., 2002).

O método de filtração de partículas, mais usualmente empregado no isolamento de fungos de solo, tem como base a lavagem e filtração das partículas de solo e sua separação em peneiras com aberturas de malha progressivamente menores, sendo as menores partículas recuperadas nos filtros transferidas para meio de cultura adequado (Bååth, 1988). Bills & Polishook (1994a) recuperaram 1709 isolados, pertencentes a 177 morfo-espécies, de apenas 20 g de liteira de uma floresta da Costa Rica. Os mesmos procedimentos

foram usados pelos autores para o estudo dos fungos associados a quatro folhas senescentes de *Heliconia Marie* Hook., das quais foram recuperadas 1676 isolados pertencentes a 122 morfo-espécies (Bills & Polishook, 1994b). Esta técnica foi utilizada para o isolamento de fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron perrottetti* (D.C.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl, permitindo a recuperação de 1678 unidades formadoras de colônia pertencentes a 128 espécies e morfotipos distintos (Abreu et al., 2005). Devido às suas vantagens, a filtração de partículas mostra grande potencial de aplicação no isolamento de fungos endófitos (Carroll, 1995).

O meio de cultura mais comumente usado no isolamento de fungos endófitos é o MEA, tendo como fonte nutricional o extrato de malte. Este meio de cultura é considerado não seletivo, e a sua adoção generalizada em trabalhos com este grupo de fungos sugere que ele seja eficiente para recuperação de muitas espécies de fungos (Bills & Polishook 1992; Petrini et al., 1992). O uso de uma fonte nutricional restrita pode levar a uma seleção ou, pelo menos, ao favorecimento de algumas espécies de fungos, as quais acabam sendo isoladas com maior frequência do que outras (Bills e Polishook 1991). Exemplos de meios de cultura já usados com sucesso no isolamento de fungos endófitos são o CYCL (extrato de malte, extrato de levedura, Ciclosporina A), BDA (batata dextrose agar), CMA (farinha de milho e agar) e CMD (farinha de milho, dextrose e agar) (Bernstein & Carroll, 1977; Carroll & Carroll, 1978; Dingle & McGee, 2003; Frölich et al., 2000; Gamboa & Bayman, 2001; Rodrigues, 1994).

Antibióticos e compostos fungistáticos ou fungicidas em baixas concentrações são normalmente utilizados no isolamento dos fungos endófitos. Tais substâncias visam suprimir o crescimento bacteriano e impedir que colônias de algumas espécies de fungos cresçam muito rapidamente, inibindo o desenvolvimento daquelas espécies de crescimento mais lento. Entre os antibióticos comumente empregados para este fim destacam-se a estreptomicina,

a clorotetraciclina, o sulfato de estreptomicina, a oxitetraciclina e o cloranfenicol (Bills & Polishook, 1991, 1992; Dingle & McGee, 2003; Fisher et al., 1986; Petrini & Fisher, 1986; Photita et al., 2001; Suryanarayanan et al., 2003).

Substâncias fúngidas como benomil, dicloran e cicloheximida, aplicadas em meio de cultura em baixas concentrações, são eficientes no controle do crescimento das colônias de fungos associados a tecidos rígidos como ramos e cascas de árvores (Bills & Polishook 1991). O rosa de bengala também é um agente fungistático apropriado para o uso como controlador de crescimento no isolamento de fungos endófitos (Photita et al., 2001). Outra substância muito eficiente é a ciclosporina A, um composto capaz de restringir o crescimento de várias espécies de fungos, promovendo um crescimento distorcido das hifas sem levá-las à morte (Bills, 1996). A Ciclosporina A foi adicionada com sucesso no meio de cultura para isolamento dos fungos endófitos associados à palmeira *Euterpe oleraceae* Mert., e seu uso conjunto com o método de filtração de partículas possibilitou a recuperação de uma enorme variedade de espécies de fungos de amostras de material vegetal morto ou senescente (Bills & Polishook 1994; 1996).

### 2.1.3 Taxonomia

Os endófitos são representados principalmente por ascomicetos e seus anamorfos (Carroll, 1988). Fungos pertencentes à família Xylariaceae estão entre os mais comuns, tanto em regiões tropicais como em regiões de clima temperado (Arnold et al., 2003; Bayman et al., 1997, 1998; Frölich et al., 2000; Rodrigues, 1994; Stone & Petrini, 1997). Fungos deste grupo são considerados tipicamente endófitos.

A identificação destes fungos é realizada com base principalmente na fase assexuada devido à dificuldade que estes têm de formar estruturas

reprodutivas sexuais em meio de cultura. Corpos de frutificação contidos em estromas são formados após longo período de incubação em meio de cultura, mas geralmente sem estruturas sexuais (Bayman et al., 1998).

Outras espécies de fungos comumente encontradas como endófitos de diversas espécies vegetais pertencem aos gêneros *Glomerella* (anamorfo *Colletotrichum*), *Guignardia* (anamorfo *Phyllosticta*), *Phoma* e *Phomopsis* (Cannon & Simmons, 2002; Freire & Bezerra, 2001; Gamboa et al., 2002; Hata et al., 2002; Johnston, 1998; Lu et al., 2004; Photita et al., 2001).

Pode-se verificar, entre os fungos endófitos comumente isolados, algumas espécies com formas fitopatogênicas, entre as quais se destaca *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*), que pode ser causador de antracnose em folhas e frutos de diversas espécies vegetais. Fungos desta espécie podem ser comumente recuperados em grande quantidade como endófitos associados a tecidos saudáveis de plantas como o cafeeiro (Gamboa et al., 2002;), cacau (Arnold et al., 2003), bananeira (Costa Pinto et al., 2000; Cao et al., 2002; Pereira et al., 1999; Photita et al., 2001), *Rhododendron* spp. (Okane et al., 1998), cajueiro, mangueira, umbuzeiro, mamoneira e mandioca (Freire & Bezerra, 2001).

Várias espécies menos conhecidas podem ocorrer com frequência como endófitos associados a determinadas espécies hospedeiras, como, por exemplo, *Deightonia torulosa* (Syd.) M.B. Ellis em banana (Photita et al., 2001), *Letendreaopsis palmarum* K.F. Rodrigues & Samuels em *Euterpe oleacea* (Rodrigues, 1994) e *Mycoleptodiscus atromaculans* Bills & Polishook em *Chamaecyparis thuyoides* (L.) Britton, Sterns & Poggenb. (Bills & Polishook, 1992).

Micélio estéril é a denominação atribuída aos fungos que não produzem estruturas reprodutivas em meio de cultura utilizado para isolamento e identificação dos endófitos. Normalmente estes fungos não são identificados;

portanto, faz-se o agrupamento de acordo com suas características culturais em morfo-espécies, o que muitas vezes pode levar a valores subestimados da diversidade de fungos recuperados (Bills & Polishook, 1994b). Muitas vezes a esporulação de culturas estéreis pode ser conseguida transferindo pedaços de folhas e fragmentos de hastes autoclavados da planta hospedeira para o meio (Frölich et al., 2000; Guo et al., 2000) ou apenas inserindo, no meio de cultura, pequenas tiras de material celulósico, como folhas de bananeira (Bills & Polishook, 1994b).

Técnicas mais eficientes têm sido utilizadas na tentativa de obter a identificação de colônias estéreis, tais como estudo enzimático, extração e amplificação do DNA, seqüenciamento de regiões do DNA e posterior comparação dos resultados em bases de dados especializadas (Crozier et al., 2006; Guo et al., 2000; Rodrigues et al., 2004).

#### **2.1.4 Padrões de distribuição dos fungos endófitos**

O padrão de distribuição já foi descrito entre diversos estandes amplamente espalhados na paisagem, entre estandes geograficamente próximos, mas ecologicamente distintos, entre árvores individuais dentro de um estande, entre acículas em um único galho e entre amostras microscópicas dentro de acículas e pequenos fragmentos de casca (Carroll, 1995).

Poucos estudos de quantificação do padrão de colonização de endófitos em plantas tropicais foram realizados. O padrão de colonização de folhas por fungos endófitos varia amplamente. Rodrigues (1994) encontrou apenas 30% dos folíolos de uma palmeira (*E. oleracea*) colonizados por endófitos, enquanto Lodge et al. (1996) encontraram grande proporção de colonização em folhas de *Manilkara bidentata* (A. DC.) Chev. Os valores variaram de 90 a 95% em *Guarea guidonia* (L.) Sleumer; 95-98% dos fragmentos de folhas foram colonizados por fungos endófitos (Gamboa & Bayman, 2001). Já Arnold et al.,



(2000) encontraram 73,9% dos segmentos de folhas de *Heisteria concinna* Standl. e *Ouratea lucens* (Kunth) Engl. colonizados por endófitos.

As causas destas variações estão diretamente relacionadas com a idade das folhas, pois à medida que as folhas envelhecem ocorre um aumento no número de infecções por fungos endófitos (Bernstein & Carroll, 1997, Petrini & Carroll, 1981; Petrini et al., 1992; Photita et al., 2001, Rodrigues, 1994). Este padrão de colonização evidencia que os tecidos das plantas hospedeiras são alvo de infecções múltiplas por parte dos fungos endófitos. Mesmo com esta diferença na frequência de colonização entre tecidos vegetais jovens e desenvolvidos, a composição de espécies é normalmente bastante similar (Bernstein & Carroll, 1977).

Alguns fungos endófitos expressam sua preferência na colonização de pecíolo, nervuras ou regiões entre nervuras (Photita et al., 2001; Rodrigues, 1994). Hata et al. (2002) verificaram maior frequência de *Phyllosticta* sp. e *Phomopsis* sp. em pecíolos e segmentos basais das folhas de *Pasania edulis* Makino contendo a nervura central. Já *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foram isolados com maior frequência de outras partes das folhas. Diferenças nos padrões de colonização são atribuídas não somente aos diferentes meios de infecção das folhas pelos esporos dos endófitos, mas também a prováveis interações antagonistas entre as diferentes espécies de fungos, as quais poderiam restringir os seus nichos de colonização. Em bananeira, *Guignardia cocoicolla* Punith. foi predominante nas folhas, *Pyriculariopsis parasitica* (Sacc. & Berl.) M.B. Ellis e *Dactylaria* sp. no pseudo-caule e *C. gloeosporioides* e *C. musae* nos pecíolos (Photita et al., 2001).

O número de fungos endófitos pode variar de acordo com a espécie de planta pesquisada e as condições em que os experimentos forem realizados. Em geral, cada espécie de planta apresenta um conjunto de espécies de fungos endófitos bem característicos. Johnston (1998) verificou que um isolado de

*Phyllosticta* sp., freqüentemente recuperado como endófito de *Leptospermum scoparium* J.R.Forst. & G.Forst., não foi isolado de plantas de *Kunzea ericoides* (A.Rich.) Joy Thoms em ocorrência mista na mesma área.

Quando a comunidade endófito é avaliada em uma única espécie hospedeira crescendo em local ecologicamente diverso, a variável precipitação (chuva, orvalho, névoa) parece ser um importante determinante da freqüência de infecção. Rodrigues (1994) encontrou maior infecção de folhas de *E. oleracea* por fungos endófitos quando coletadas na estação úmida comparada com a estação seca. Esta tendência não é surpresa, pois considerando que a transmissão de endófitos é horizontal e os propágulos do fungo são dispersos pelo vento, chuva, etc, as condições apresentadas durante a estação úmida favorecem a maior taxa de infecção.

## 2.2 *Phoma*

A “mancha de phoma”, causada por espécies do gênero *Phoma*, constitui um sério problema em todas as regiões produtoras de café. Os principais danos às plantas acontecem em decorrência de surtos epidêmicos favorecidos pelas frentes frias e outras condições climáticas adversas, como chuva de granizo e ventos frios. Nestas condições específicas pode ocorrer, também, a seca dos ramos do cafeeiro (“seca dos ramos”) (Carvalho et al., 1998, Pfenning et al., 2005). Além de *Phoma costarricensis* Echandi, patógeno bem conhecido, outro fungo deste gênero, citado como *Phoma* sp. (Echandi, 1957), tem sido considerado como patógeno emergente de classificação incerta. A taxonomia, biologia e epidemiologia dos patógenos do complexo *Ascochyta - Phoma* (coelomycetes) que podem ser encontrados no cafeeiro no Brasil ainda não foram esclarecidas satisfatoriamente e necessitam, portanto, de mais estudos.

Na lavoura, a doença afeta folhas e ramos e, no viveiro, ocorre na base do caule. Eventualmente, as flores podem ser afetadas, levando à queda dos frutos no estágio inicial de formação. A doença causada por espécies de *Phoma* no cafeeiro é bem conhecida também em outras regiões cafeeiras do mundo, como Camarões, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Guatemala, Índia e Quênia (Echandi, 1957; Fernandez, 1961; Firman, 1965; Rajendran et al., 1983; Ramiro Gómez & Elkin Bustamante, 1977; Pfenning et al., 2005; Stewart, 1957).

Os agentes etiológicos da mancha de phoma e seca de ramos do cafeeiro foram considerados por muitos anos como sendo espécies do gênero *Phoma* e *Ascochyta*. Por meio do estudo da conidiogênese e outras características morfológicas e fisiológicas de isolados desses fungos foi possível diferenciar estes dois gêneros (Boerema & Bollen, 1975; Boerema et al., 2004). Atualmente, *P. tarda* (R.B. Stewart) H. Vermeulen e *P. costarricensis* Echandi são considerados os principais agentes etiológicos da mancha de phoma do cafeeiro.

A partir da década de 90, estudos com marcadores enzimáticos e moleculares começaram a ser utilizados para diferenciar espécies de *Phoma* com características morfológicas semelhantes (Reddy et al., 1998). Comparações de seqüências nucleotídicas dos genes ribossomais e seqüências de genes conservados que codificam proteínas essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, como  $\beta$ -tubulina e fator de alongação-1 $\alpha$ , são utilizados na tentativa de elucidar relações filogenéticas entre taxa de vários grupos de organismos (Irinnyi et al., 2006; O'Donnell et al., 1998).

### **2.2.1 Sintomatologia e epidemiologia das doenças causadas por *Phoma* em cafeeiros**

*Phoma tarda* ocorre desde plântulas em viveiros até folhas e ramos de cafeeiros adultos. Os sintomas típicos observados em mudas consistem de uma constrição do caule a diferentes distâncias do nível do solo, onde são observadas

frutificações (picnídios) do fungo. Estes sintomas podem ser facilmente confundidos com sintomas causados por outros patógenos, como *Rhizoctonia* e *Fusarium*, ou devidos a causas fisiológicas (Figueiredo et al., 1976; Stewart, 1957).

Nos cafeeiros adultos, os sintomas são observados no ápice dos ramos e nos primeiros pares de folhas. Estes sintomas são manchas irregulares de cor castanho-escuro a negra. Com o progresso da doença, as lesões coalescem e as folhas caem. Anéis concêntricos são observados em folhas desenvolvidas. Nos ramos ocorre seca dos tecidos jovens, resultando em morte descendente dos ramos em decorrência de surtos epidêmicos favorecidos pelas frentes frias, chuva de granizo e ventos frios. Eventualmente as flores podem ser afetadas, levando à queda dos frutos no estágio inicial de desenvolvimento (Carvalho et al., 1998; Figueiredo et al., 1976; Ramiro Gómez & Elkin Bustamante, 1977; Pfenning et al., 2005; Stewart, 1957).

A taxa de progresso da epidemia é favorecida por temperaturas entre 15 e 20 °C, acompanhada de alta umidade relativa do ar e molhamento foliar por no mínimo 36 horas. Estas condições são comuns em regiões onde ocorrem frentes frias com duração de até cinco dias, favorecendo os surtos epidêmicos da doença. Normalmente, o inóculo inicial encontra-se nas lesões foliares e nas hastes que permanecem no campo de uma estação para outra (Pfenning et al., 2005; Ramiro Gómez & Elkin Bustamante, 1977; Pozza et al., 2003).

### **2.2.2 Histórico da classificação dos gêneros *Phoma* e *Ascochyta***

O gênero *Phoma* é um dos maiores gêneros de Coelomycetes, compreendendo mais de 2000 nomes de espécies publicados. Muitas espécies são patogênicas com uma ampla gama de hospedeiros, outras são saprófitas ou ocorrem como fungos de solo ou oportunistas (Boerema et al., 2004; Sutton, 1980).

No século XIX e metade do século XX, o sistema taxonômico de Saccardo foi utilizado para fazer o agrupamento e identificação dos fungos. Este sistema consistia em agrupar os fungos de acordo com o substrato, a presença ou ausência de septo e a coloração do conídio. O gênero *Phoma* foi usado para os fungos formadores de conídios hialinos asseptados em picnídios e o crescimento sobre hastes e ramos de plantas vasculares. Quando o fungo apresentava essas características, porém em folhas, a ele se atribuía o nome de *Phyllosticta*. Fungos com conídios hialinos e septados produzidos em picnídios foram agrupados no gênero *Diplodina* quando ocorriam em hastes e ramos; porém, quando em folhas, foram agrupados em *Ascochyta*. Essa classificação gerou uma situação de desconforto entre os estudiosos, os quais observaram a ocorrência de fungos do tipo *Phoma* tanto em hastes como em folhas, e também conídios unicelulares e bicelulares em um único picnídio. Com isso, os fungos do tipo *Phoma* receberam sinônimos nos quatro gêneros descritos (Boerema et al., 2004; Boerema & Bollen, 1975; Sutton, 1980).

Diante dessa problemática, os pesquisadores começaram a utilizar outros caracteres, como a ontogenia dos conídios e estudos morfológicos *in vitro*, para identificação das espécies. Boerema & Bollen (1975) observaram que a conidiogênese de *Phoma* é enteroblástica fialídica, enquanto, em *Ascochyta*, é holoblástica anelídica. Entretanto, apesar de essa característica ser importante para diferenciar estes dois gêneros, a sua interpretação é muito difícil. Diante dessa situação, caracteres baseados no comportamento dos isolados *in vitro* começaram a ser utilizados para descrever as espécies de *Phoma*. Caracteres como pigmentação da colônia, formação de clamidósporos, formação de cristais, características do picnídio e septação dos conídios passaram a ser estudados em condições padronizadas (Aa et al., 1990; Boerema & Bollen, 1975; Boerema & Dorenbosch, 1973; Boerema et al., 2004).

A septação dos conídios de *Ascochyta* é parte essencial do seu completo desenvolvimento, sendo o processo de “distoseptação” o responsável pela formação do septo. Esse processo explica o porquê de todas as espécies de *Ascochyta*, tanto *in vitro* como *in vivo*, produzirem conídios septados. A septação de conídios de *Phoma* é um processo secundário e ocorre independentemente da conidiogênese (Aa et al., 1990; Boerema, 1972; Boerema & Bollen, 1975; Boerema et al., 2004; Monte et al., 1990; Sutton, 1980).

Potanto, *Phoma* sp. pode apresentar, *in vivo*, septação de conídios de 0 a 95% e a maioria dos conídios unicelulares *in vitro*. Entretanto, *Ascochyta* apresenta septação de conídios tanto *in vivo* como *in vitro* (Boerema & Bollen, 1975; Boerema et al., 2004).

### 2.2.3 Etiologia da mancha de phoma do cafeeiro

*Ascochyta coffeae* foi descrita pela primeira vez, por Henning (1902), associada a folhas de cafeeiros coletadas no município de São Paulo. Em 1957, Stewart descreveu o agente etiológico da mancha de folha (*leaf blight*) e seca dos ponteiros (*stem dieback*) do cafeeiro, na Etiópia, como *Ascochyta tarda*. Porém, Stewart não fez nenhuma referência à espécie descrita por Henning. Mais tarde, Firman (1965) e Vermeulen (1979) identificaram *A. tarda* como o mesmo agente etiológico da doença em cafezais no Quênia. Figueiredo et al. (1976) compararam caracteres morfológicos, fisiológicos e sorológicos de culturas de *A. coffeae* isoladas em São Paulo com uma cultura de *A. tarda* isolada por Firman, no Quênia, e concluíram que se tratava de *A. coffea*.

Diversas contribuições ao gênero *Phoma* foram publicadas nas últimas quatro décadas, o que culminou com a publicação do “Manual de Identificação de *Phoma*” (Boerema et al., 2004). Nessa publicação, os autores mantiveram *P. tarda* (sinônimos: *A. tarda*; *A. coffeae*; *Phoma coffeae* Delacr.; *Macrophoma coffea* (Delacr.) Sacc. & P. Syd.) como o agente etiológico da mancha de phoma

do cafeeiro. O epíteto *tarda* refere-se ao aparecimento, mais tarde, de septo no conídio.

*Phoma tarda* e *P. costarricensis* são os principais agentes etiológicos da mancha de phoma do cafeeiro. Estas enfermidades são bem conhecidas em várias regiões cafeeiras do mundo, tais como Brasil, Camarões, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Guatemala, Índia e Quênia. *Phoma costarricensis* foi identificada pela primeira vez na Costa Rica (Echandi, 1957). Posteriormente, foi encontrada nos cafezais da Colômbia (Fernandez, 1961; Ramiro Gómez & Elkin Bustamante, 1977) e da Índia (Rajendran et al., 1983). Em 1979, Vermeulen identificou *P. tarda* em cafezais do Quênia.

*Phoma tarda* ocorre de forma generalizada na região sul de Minas Gerais e no Sudoeste da Bahia. O fungo causa mancha de folhas, queima das brotações novas e queda de frutos jovens (Pfenning et al., 2005).

De acordo com Echandi (1957) e Rajendran et al. (1983), *P. costarricensis* ocorre principalmente em regiões com altitudes entre 1000 e 1700 m, sujeitas a baixas temperaturas (15-20°C), alta umidade relativa, baixa intensidade luminosa e ventos frios frequentes, e depende de ferimentos para infecção dos tecidos de cafeeiros.

#### 2.2.4 Caracterização molecular

A classificação taxonômica dos fungos engloba técnicas micológicas tradicionais e modernas, entre elas morfológicas, bioquímicas e análises de seqüências de ácidos nucléicos (Irinnyi et al., 2006). A partir do final da década de 90, estudos com marcadores moleculares começaram a ser utilizados para diferenciar espécies de *Phoma* com características morfológicas semelhantes.

Para avaliar a classificação de *P. lingam* (Tode) Desm. e *P. wasabiae* Yokogi no gênero *Phoma*, Reddy et al. (1998) utilizaram a região ITS do DNA ribossomal. Variedades de *P. exigua* Desm. foram diferenciadas por seqüências

de ITS e pela técnica de AFLP. As seqüências de ITS mostraram baixa resolução, enquanto a maioria das variedades formou grupos distintos quando da utilização do padrão de bandas gerados por AFLP (Abeln et al., 2002). Balmas et al. (2005) caracterizaram *P. tracheiphila* por RAPD-PCR, microssatélites e seqüenciamento da região ITS do DNA ribossomal e desenvolveram primers específicos para detecção de *P. tracheiphila* na planta. Estudos filogenéticos de espécies de *Phoma* foram realizados com a utilização de seqüências do *fator de alongação 1a* e região ITS. As árvores filogenéticas geradas não deram suporte para as Seções de *Phoma*, caracterizadas com base na morfologia e atualmente utilizadas na identificação de *Phoma* (Irinyi et al., 2006).



### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AA, H. A. van der; NOORDELOOS, M. E.; De GRUYTER, J. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 32, p. 3-19, Dec. 1990.
- ABELN, E. C. A.; STAX, A. M.; De GRUYTER, J.; AA, H. A. van der. Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 4, p. 419-427, Apr. 2002.
- ABREU, L. M. Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras – MG.
- ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological control of plant diseases: the European situation. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 114, n. 3, p. 329-341, Mar. 2006.
- ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 267-274, July 2000.
- ARNOLD, A. E.; MEDJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Science**, St. Paul, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, Dec. 2003.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 3, n. 11, 2000. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/4.pdf>>. Acesso em: 2007.
- BÅÅTH, E. A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, n. 8, p. 1566-1569, Aug. 1988.

- BACON, C. W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophytic infected tall fescue. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 44, n. 1/4, p. 123-141, Mar. 1993.
- BALMAS, V.; SCHERM, B.; GHIGNONE, S.; SALEM, A. O. M.; CACCIOLA, S. O.; MIGHELI, Q. Characterization of *Phoma tracheiphila* by RAPD-PCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of specific primers for in planta PCR detection. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 111, n. 3, p. 235-247, Mar. 2005.
- BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BÁEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, J. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 944-948, Aug. 1998.
- BAYMAN, P.; LEBRÓN, L. L.; TREMBLAY, R.; LODGE, J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytologist**, Cambridge, v. 135, n. 1, p. 143-149, Jan. 1997.
- BENHAMOU, N.; GARAND, C.; GOULET, A. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4044-4060, Aug. 2002.
- BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, n. 6, p. 644-653, Mar. 1977.
- BILLS, G. F. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.) **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: APS Press, 1996. p. 31-65.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 2, p. 187-198, Mar./Apr. 1994a.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1477-1482, July 1991.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from decaying leaves of *Heliconia mariae* (Heliconiaceae). **Brenesia**, San Jose, v. 41-42, p. 27-43, 1994b.

- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 17, n. 3/4, p. 284-294, Sept./Oct. 1996.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thuyoides*. **Sydowia**, Horn, v. 44, n. 1, p. 1-12, 1992.
- BOEREMA G. H. *Ascochyta phaseolorum* synonymous with *Phoma exigua*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 78, p. 113-115, 1972.
- BOEREMA, G. H.; BOLLEN G. J. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. **Persoonia, Leiden**, v. 8, n. 2, p. 111-144, 1975.
- BOEREMA, G. H.; DORENBOSCH, M. M. J. The *Phoma* and *Ascochyta* species described by Wollenwber and Hochapfel in their study on fruit-rotting. **Studies in Mycology**, Utrecht, 3, 1973.
- BOEREMA, G. H.; GRUYTER, J. de; NOORDELOOS, M. E.; HAMERS, M. E. C. ***Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture**. Wallingford: CAB International, 2004. 470 p.
- CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 210-220, Mar./Apr. 2002.
- CAO, L. X.; YOU, J. L.; ZHOU, S. N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. **World Journal of Microbiology & Biotechnolog**, Dordrecht, v. 18, n. 2, p. 169-171, Mar. 2002.
- CARROLL, G. C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1316-1324, 1995. Supplement 1.
- CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbiont. **Ecology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.
- CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, n. 24, p. 3034-3043, Dec. 1978.
- CARVALHO, V. L. de; SOUZA, S. M. C. de; SALGADO, M. **Alguns aspectos da *Phoma* e *Ascochyta* do cafeeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. (Circular Técnica, n. 84).

- CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 3, p. 321-322, Mar. 1996.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 10-16, Feb. 1988.
- COSTA PINTO, L. S. R.; AZEVEDO, J. L.; PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C.; LABATE, C. A. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. **New Phytologist**, Cambridge, v. 147, n. 3, p. 609-615, Sept. 2000.
- CROZIER J.; THOMAS S. E.; AIME M. C.; EVANS H. C.; HOLMES K. A. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 55, n. 6, p. 783-791, Dec. 2006.
- DINGLE, J.; MCGEE, P. A. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 3, p. 310-316, Mar. 2003.
- ECHANDI, E. La quema de los cafetos causada por *Phoma costarricensis* n. sp. **Revista de Biología Tropical**, san Jose, v. 5, n. 1, p. 81-102, 1957.
- FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, copenhagen, v. 98, n. 1, p. 25-36, Oct. 2002.
- FERNANDEZ, B. O. Muerte descendentes de los brotos del cafeto causado por espécies de *Phoma* e *Colletoreichum*. **Cenicafé**, Caldas, n. 3, p. 127-140, jul./sept. 1961.
- FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P. R.; FIGUEIREDO, M. B. *Ascochyta coffeae* P. Henn. agente causal de uma nova doença dos viveiros de café no Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 211-213, jul./ago. 1976.
- FIRMAN, I. D. Some investigations on disease of *Coffea arabica* caused by *Ascochyta tarda*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 48, n. 2, p. 161-166, 1965.
- FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 86, n. 2, p. 153-156, 1986.

- FISHER, P. J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 137-143, May 1992.
- FREIRE, F. C. O.; BEZERRA, J. L. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 304-308, July/Sept. 2001.
- FRÖLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, Oct. 2000.
- GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*). **Biotropica**, St. Louis, v. 33, n. 2, p. 352-360, June 2001.
- GAMBOA, M. A.; LOUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 156, n. 1, p. 41-45, 2002.
- GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, Cambridge, v. 147, n. 3, p. 617-630, Sept. 2000.
- HATA, K.; ATARI, R.; SONE, K. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. **Mycoscience**, Tokyo, v. 43, p. 369-373, 2002.
- HENNINGS, P. Fungi S. Paulenses II. a cl. Puttemans collecti. **Hedwigia**, Dresden, v. 41, p. 295-311, 1902.
- IRINYI, L.; KÖVICS, G. J.; RAI, M. K.; SÁNDOR, E. Studies of evolutionary relationships of *Phoma* species based on phylogenetic markers. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION SYMPOSIUM AT DEBRECEN UNIVERSITY, 4. , 2006, Hungary. **Proceedings...** Hungary, 2006
- JOHNSTON, P. R. Leaf endophytes of manuka (*Leptospermum scoparium*). **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 1009-1016, Aug. 1998.
- LODGE, D. J. , FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 5, p. 733-738, Sept./Oct. 1996.

- LU, G.; CANNON, P. F.; REID, A.; SIMMONS, C. M. Diversity and molecular relationship of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 53-63, Jan. 2004.
- MONTE, E.; BRIDGE, P. D.; SUTTON, B. C. Physiological and biochemical studies in Coelomycetes. *Phoma*. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 32, p. 21-28, Dec. 1990.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 465-493, May/June 1998.
- OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 4, p. 657-663, Apr. 1998.
- PAULUS, B.; GADEK, P.; HYDE, K. Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 6, p. 748-756, June 2003.
- PEREIRA, J. O.; CARNEIRO VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 15, n. 1, p. 37-40, Feb. 1999.
- PETRINI, O.; CARROLL, G. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, n. 5, p. 629-636, May 1981.
- PETRINI, O.; FISHER, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 87, p. 647-651, 1986.
- PETRINI, O.; HAKE, U.; DREYFUSS, M. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. **Mycologia**, New York, v. 82, n. 4, p. 444-451, July/Aug. 1990.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, Hoboken, v. 1, p. 185-196, 1992.

PFENNING, L. H.; SALGADO, M.; ALMEIDA, A. R.; PEREIRA, R. T. G. Estação Perigo - *Phoma* do cafeeiro. **Cultivar: Grandes Culturas**, Pelotas RS, v. 6, n. 79, p. 12-16, nov. 2005.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1508-1513, Dec. 2001.

POZZA, E. A.; SALGADO, M.; PFENNING, L. H. Intensidade da mancha de *Phoma* do cafeeiro (*Phoma tarda*), sob influência de diferentes temperaturas e tempo de molhamento foliar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia, MG, 2003. p. 223.

RAJENDRAN, C.; AHMED, A.; RAO, M. Coffee blight - A new disease of coffee in India. **Journal of Coffee Research**, Balehornnur, v. 13, n. 2, p. 35-39, 1983.

RAMIRO GÓMEZ, Q.; ELKIN BUSTAMANTE, A. Influencia de la luz y la temperatura em el desarrollo de la muerte descendente del cafeto causado por *Phoma* sp. **Fitopatologia Colombiana**, Santa fe de Bogota, v. 6, n. 1, p. 73-80, 1977.

RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. **Nature**, London, v. 161, n. 4085, p. 245-246, 1948.

REDDY, P. V.; PATEL, R.; WHITE JUNIOR, J. F. Phylogenetic and developmental evidence supporting reclassification of cruciferous pathogens *Phoma lingam* and *P. wasabiae* in genus *Plenodomus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 11, p. 1916-1922, Nov. 1998.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, Cambridge, v. 151, n. 3, p. 705-716, Sept. 2001.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleraceae*. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 3, p. 376-385, May/June 1994.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. (Ed.). **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1996. p. 57-69

- RODRIGUES, K. R.; SIEBER, T. N.; GRÜING, C. R.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplification and ITS1-5. 8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 45-52, Jan. 2004.
- RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R. dos; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, p. 24-33, 2005.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 319-431, 1998.
- SCHARDL, C. L.; CLAY, K. Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens. In: CARROLL, G. C.; TUDZYNSKI, A. (Ed.). **The Mycota V. Part B Plant Relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 221-236.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 315-340, 2004.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 9, p. 996-1004, Sept. 2002.
- SCHULZ, B.; RÖMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 10, p. 1275-1283, Oct. 1999.
- SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 12, p. 1447-1450, Dec. 1993.
- SILVA, J.; BETTIOL, W. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of fusarium wilt of tomato. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 409-412, jul./ago. 2005.



SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKAS, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul. APS Press, 1996. p. 3-29.

STEWART, R. B. Leaf blight and stem dieback of Coffee caused by undescribed species of *Ascochyta*. *Mycologia*, New York, v. 49, n. 3, p. 430-433, 1957.

STONE, J. K.; PETRINI, O. Endophytes of forest trees: a model for fungus plant interactions. In: CARROLL, G. C.; TUDZYNSKI, A. (Ed.). **The Mycota**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v. 5, Part B, p. 129-140.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESNA, G.; MURALI, T. S. Endophytic fungal in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 4, p. 489-493, Aug. 2003.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes. Fungi imperfecti with Picnidia, Acervuli and Stromata**. Kew: CMI, 1980. 696 p.

TODJE, P. R.; HEBBAR, K. P.; SAMUELS, G.; BOWERS, J. H.; WISE, S.; NYEMB, E.; BEGOUDE, D.; FOKO, J.; FONTEM, D. Bioassay of *Geniculosporium* species for *Phytophythora magakarya* biological control on cacao pod husk pieces. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 8, p. 648-652, Apr. 2006.

VERMEULEN, H. **Coffee berry disease in Kenya**. 1979. 113 p. (Thesis Agriculture). University of Wageningen, Netherland.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do. Perdas na produtividade e qualidade do cafeeiro causadas por doenças bióticas e abióticas. In: ZAMBOLIM, L. **Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade**. Viçosa: UFV, 2000. p. 83-179.

## **CAPÍTULO 2**

### **FUNGOS ENDÓFITOS EM CAFEIRO CULTIVADO SOB SISTEMAS ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

## RESUMO

ALMEIDA, Anderson Resende. **Fungos endófitos em cafeeiro cultivado sob sistema orgânico e convencional.** 2007. p. 31-54. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.<sup>3</sup>

Fungos endófitos são organismos que colonizam o interior de tecidos vivos de plantas sem causar sintomas de doença. Alguns destes fungos protegem seu hospedeiro contra ataque de insetos e patógenos. Constituem também uma fonte potencial de novos compostos bioativos a serem utilizados na produção de fármacos e agroquímicos e representam segmento importante da diversidade de fungos. O cultivo orgânico fundamenta-se nos princípios da não utilização de agrotóxicos, da busca de equilíbrio solo/planta através do manejo racional do solo e a valorização social do trabalhador rural. Já o cultivo convencional também chamado de moderno, industrial ou químico, tem como base a química, voltado para a máxima produtividade. Com o objetivo de comparar a micobiota endófitas associada ao cafeeiro sob o sistema orgânico e convencional, amostras de material vegetal foram coletadas em duas fazendas localizadas no município de Santo Antônio do Amparo, na região sul do Estado de Minas Gerais nos meses de janeiro e setembro de 2005 e abril de 2006. Folhas e ramos foram retirados do terço médio de dez plantas escolhidas aleatoriamente em cada sistema de cultivo. Após a desinfestação superficial, discos de folhas e fragmentos de hastes foram transferidos para meio de cultura. 1726 UFCs foram detectadas, sendo 993 no sistema orgânico e 733 no sistema convencional. As espécies mais frequentes foram *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. crassipes*, *Staninwardia* sp., *Phomopsis* spp. e *Xylaria* spp. Amostras provenientes do sistema orgânico apresentaram taxa de colonização de 53,9% e 38 espécies enquanto no convencional apresentaram taxa de colonização de 44,6% e 33 espécies. As espécies *C. gloeosporioides* sp3, *Stagonospora caricinella*, *Pseudohalonectria lutea*, *C. crassipes* e *Staninwardia* sp. foram isoladas com frequência de haste de cafeeiro no sistema orgânico e *Phomopsis* sp. e *Fusarium stilboides* em hastes de cafeeiro no sistema convencional. *C. gloeosporioides* sp1 e *Xylaria* sp. foram predominantes em folhas de ambos os sistemas. O número de isolados observados foi significativamente superior nas hastes em ambos os sistemas. *Staninwardia* spp. e *P. lutea* e são relatados pela primeira vez em café.

---

<sup>3</sup> Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning (Orientador), Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador)

## ABSTRACT

ALMEIDA, Anderson Resende. **Endophytic fungi in coffee plantations under organic and conventional management systems.** 2007. 31-54 p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>4</sup>

Endophytic fungi are organisms that colonize the inner tissues of plants without causing any disease symptom. Some of these fungi protect the plants against the attack of both insects and pathogens. They also constitute a potential source for new bioactive compounds that could be used to produce medicines and agrochemicals, besides of being considered an important segment of the fungal diversity. The organic management system has as its fundament the principles of no pesticide use, and the search for the equilibrium between soil and plant through the rational soil management, besides of the concern with the social valorization of the rural worker. On the other hand, the conventional management system, also called modern, industrial or chemical, is based in the use of chemicals to obtain the maximum plant yield. With the objective to compare the endophytic mycobiota associated with coffee trees under cultivation (organic and conventional), vegetal samples were collected in two farms localized in Santo Antônio do Amparo municipality, South of Minas Gerais, in the months of January and September of 2005, and April of 2006. Leaves and shoots were removed from the middle third of ten plants chosen randomly in each of the cultivation systems. After surface sterilization, foliar discs and shoot fragments were transferred to culture medium. A total of 1726 colony forming units (CFUs) were detected, 993 in the organic system, and 733 in the conventional system. *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. crassipes*, *Staninwardia* sp., *Phomopsis* spp. and *Xylaria* spp. were the most frequent species. Samples recovered in the organic system presented colonization rate of 53.9%, and 38 species, while the samples taken from the conventional system showed colonization rate of 44.6%, and 33 species. *C. gloeosporioides* sp3, *Stagonospora caricinella*, *Pseudohalonectria lutea*, *C. crassipes* and *Staninwardia* sp. were the most frequent isolated species from the coffee shoots in the organic system, while *Phomopsis* sp. and *Fusarium stilboides* were the most frequent species in the conventional system. *C. gloeosporioides* sp1 and *Xylaria* sp. predominated in leaves of both systems. The number of recovered isolates was significantly superior in the shoots in both systems. *Staninwardia* spp. and *Pseudohalonectria lutea* are reported on coffee for the first time.

---

<sup>4</sup> Advising Committee: Ludwig H. Pfenning (Advisor), Eduardo Alves – UFLA (Co-advisor)

# 1 INTRODUÇÃO

Fungos endófitos vivem internamente nos tecidos de plantas hospedeiras sem causar sintomas aparentes de doença. O interesse em estudar fungos endófitos vem aumentando nos últimos anos, com destaque para três principais vertentes como objetos de estudo: 1. sua importância como segmento da diversidade biológica de fungos, considerando o ambiente altamente específico em que vivem (Arnold et al., 2000; Cannon & Simmons, 2002; Rodrigues & Petrini, 1996); 2. sua função para a saúde das plantas e seu envolvimento em fenômenos de resistência a patógenos e pragas e estresses fisiológicos (Arnold et al., 2003; Redman et al., 2001; Rubini et al., 2005); e 3. como produtores de metabólitos com atividade biológica com potencial para aproveitamento na agricultura e medicina (Schulz et al., 2002; Strobel, 2002).

Há relatos sobre a utilização de fungos não patogênicos controlando fungos patogênicos, como, por exemplo, *Fusarium oxysporum*, que, na sua forma não patogênica, controla *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* raça 2 do tomateiro, e *F. oxyspororum* Fo47, capaz de induzir resistência a plantas de pepino contra *Phythium ultimum* (Alabouvette et al., 2006; Benhamou et al., 2002). Silva & Bettioli, 2005; Isto porque alguns fungos expressam diferentes modos de vida, dependendo da planta hospedeira e condições ambientais. Assim, os fungos podem aumentar (mutualismo), diminuir (parasitismo) ou não influenciar (comensalismo) no vigor e na resistência da planta. Como fungos mutualistas podem colonizar o mesmo nicho que os patógenos, competindo com estes e excluindo-os, isto os habilitaria para o uso em programas de controle alternativo (Arnold et al., 2003; Baayen et al., 2002; Redman et al., 2001; Rubini et al., 2005).

O Brasil, maior produtor mundial de café, respondeu por aproximadamente 30% da produção mundial na safra 2005/06. Contudo, foi apenas o 6º produtor mundial de café orgânico, atrás de México, Peru, Tanzânia, Costa Rica e Equador, com 80 mil sacas de café orgânico, o que representa 0,2% de sua produção total de café (Moreira et al., 2003).

O Estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro em termos globais e o segundo maior produtor mundial, sendo responsável por aproximadamente 51% do café nacional, com produção superior às do Vietnã e da Colômbia na safra 2005/06, de acordo com CONAB (CONAB, 2006). O sul de Minas Gerais destaca-se como a maior região produtora do Estado, e também a maior região produtora de café orgânico no Brasil (Moreira et al., 2003). O sistema de produção de café orgânico brasileiro é criticado mundialmente devido à baixa diversidade da fauna e da flora. Pesquisadores e produtores precisam encontrar alternativas para o aumento da biodiversidade nas plantações de café para que, assim, o café orgânico brasileiro ganhe mais espaço no mercado mundial (Moreira et al., 2003). Além disso, pouco se sabe sobre a diversidade microbiológica presente nos sistemas alternativos orgânicos de cultivo, quando comparados aos tradicionais. A cafeicultura orgânica no Brasil manteve taxas de crescimento próximas a 100% ao ano (Caixeta & Pedini, 2002) e ocupa uma área de 13.000 ha, cultivada por mais de 400 produtores (Ormond et al., 2002).

A crescente demanda de tecnologias e produtos “ecologicamente corretos” proporcionou o avanço de várias estratégias de aferição da qualidade ambiental de produtos e serviços (Spellerberg, 1991). Os bioindicadores são utilizados, para o monitoramento da recuperação e da qualidade do ambiente. Algumas medidas biológicas podem ser tomadas como bioindicadoras de alguma modificação ambiental ou de qualidade de algum produto em diferentes níveis de abordagem, bioquímico, fisiológico, histológico, indivíduos, populações, comunidades e ecossistemas. O uso de populações de fungos como

bioindicadoras pode ser feito com dados de presença ou ausência de determinada espécie no ambiente. Para comunidades, três propriedades podem ser utilizadas para inferir sobre os efeitos de modificações ambientais: o número de espécies que existem em um local, ou riqueza de espécies; a equitatividade ou o número relativo de indivíduos de cada espécie dentro da comunidade e a composição de espécies da comunidade (Louzada et al., 2000).

As atividades agrícolas alteram drasticamente as comunidades naturais, tendo efeito sobre a riqueza e composição de espécies e a abundância de indivíduos. Os principais fatores de alteração ambiental causadas pelo homem são o desmatamento, a substituição da vegetação natural e a introdução de insumos agrícolas (Louzada et al., 2000). Uma das maneiras de estimar o impacto dos sistemas de produção no ambiente é por meio da análise da diversidade biológica interna das plantas sob os diferentes sistemas de cultivo, representada pela população de fungos endófitos (Redlin & Carris, 1996).

Em relação ao cafeeiro, não há poucas informações sobre a diversidade, frequência e distribuição de fungos endófitos, apesar da importância sócio-econômica da cultura. Como existem especulações sobre a ação benéfica de fungos endófitos em gramíneas e espécies arbóreas tropicais, bem como possíveis efeitos negativos pelo uso de agrotóxicos, os simbiontes em culturas como o café merecem ser investigados.

Neste trabalho, foi investigado se a diversidade expressa pelo cálculo da riqueza e abundância relativa de fungos endófitos do cafeeiro difere entre os sistemas de cultivo orgânico e convencional e se a microbiota endófito de folhas e hastes é diferente. Investigou-se, também, se há diferenças na distribuição de fungos endófitos em folhas e hastes de cafeeiro, visto que os sistemas ditos convencionais representam monocultivo, com uso de grandes quantidades de insumos, como fertilizantes inorgânicos e fungicidas sistêmicos, que podem ocasionar alteração na planta.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de material vegetal

Amostragens de material vegetal foram realizadas em duas fazendas localizadas no município de Santo Antônio do Amparo, na região sul do estado de Minas Gerais. A Fazenda Cachoeira (20°53'18.79"S, 44°57'4.13"W) adotou o sistema orgânico de produção de café em 1995, com espaçamento de plantio de 2 x 1 m. O manejo de doenças, nos anos 2003/2004 e 2004/2005, foi realizado com Viça-café, em cinco aplicações compreendidas de novembro a março. A Fazenda Taquaril (20°52'49.70"S, 44°56'34.29"W) caracteriza-se pelo sistema convencional de produção de café, com espaçamento 2 x 0,8 m. O manejo de doenças, nos anos 2003/2004 e 2004/2005, foi realizado com Epoxiconazole + Pyraclostrobin, aplicados em dezembro e fevereiro, e tebuconazole, aplicado em junho (03/04) e novembro (04/05). As fazendas são vizinhas e estão a uma altitude de aproximadamente 1000 m.

Folhas aparentemente sadias foram amostradas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) cv Acaiá MG/747-19 em cada fazenda, nos meses de janeiro e setembro de 2005 e abril 2006, perfazendo um total de 6 visitas de coletas. Dez plantas por sistema de cultivo foram escolhidas aleatoriamente durante cada coleta, retirando-se, no terço médio de cada planta, dois ramos plagiotrópicos. Folhas maduras (quinto par de folhas) de cada ramo plagiotrópico e a parte mediana de cada ramo foram colhidas para as análises. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, levadas ao Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA e processadas dentro de 24 horas.



## **2.2 Isolamento e identificação de fungos endófitos**

Folhas e hastes foram previamente lavadas em água corrente e submetidas a desinfestação superficial por imersão em etanol 70% (v/v) por 1 min, hipoclorito de sódio 3% por 4 min e etanol 98% (v/v) por 0,5 min., com posterior secagem em papel esterilizado em câmara de fluxo laminar (Petrini et al., 1982). De vinte folhas foram obtidos duzentos discos de 5 mm de diâmetro, com auxílio de um furador de rolhas. Os fragmentos de hastes de aproximadamente 5 mm de comprimento foram cortados longitudinalmente com auxílio de bisturi, preservando a casca aderida aos fragmentos.

Cinco discos de folhas ou fragmentos de hastes foram depositados em placas de Petri (90 mm diam.) contendo 20 mL de meio de cultura extrato de malte 2% (MEA 2%) acrescido de cloranfenicol (50 mg/L) para suprimir o crescimento de bactérias e ciclosporina A (10 mg/L) e evitar que fungos de crescimento rápido mascarassem os de crescimento lento. As placas de Petri foram colocadas sobre bancadas sob temperatura ambiente (~25 °C). As colônias fúngicas recuperadas foram transferidas para MEA 2% sem antibióticos para identificação. A identificação dos fungos foi realizada por meio da avaliação do crescimento em cultura axênica e de caracteres morfológicos de suas estruturas reprodutivas, com auxílio de manuais de identificação e literatura especializada. As avaliações foram realizadas periodicamente durante 40 dias. Um total de 2688 fragmentos foi analisado, sendo, para cada sistema, 702 fragmentos de folhas e 642 fragmentos de hastes. Culturas representativas das espécies isoladas foram preservadas pelo método de Castellani e depositadas na Coleção Micológica de Lavras (CML).

### 2.3 Análise estatística

Os resultados das três coletas de cada fazenda foram combinados para as análises. A taxa de colonização foi determinada de acordo com Petrini et al. (1982).

$$\text{Taxa de colonização} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de discos de folha ou fragmentos de haste na amostra com } \geq 1 \text{ isolado}}{\text{N}^\circ \text{ total de discos de folha ou fragmentos de haste na amostra}}$$

$$\text{Taxa de isolamento} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de isolados obtidos em uma dada amostra}}{\text{N}^\circ \text{ total de discos de folha ou fragmentos de haste na amostra}}$$

O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar a taxa de colonização entre as diferentes amostras de tecidos de folhas e hastes e para comparar o número de isolados entre os sistemas orgânico e convencional e entre os diferentes tecidos de folhas e hastes. A taxa de isolamento é usada preferencialmente como medida da riqueza de fungos em um dado local/planta/tecido (Frölich et al., 2000).

A comparação da riqueza de espécies obtida dos diferentes sistemas de cultivo do cafeeiro foi feita pela análise de curvas de rarefação (Bills & Polishook, 1994; Heck Junior et al., 1975). A comparação da estrutura entre as comunidades de fungos endófitos associadas aos diferentes sistemas de cultivo do cafeeiro e aos diferentes tipos de tecido foi realizada pela análise estatística multivariada de análise de correspondência, para a qual foram utilizadas as espécies mais frequentes, excluindo as colônias compostas de micélio estéril.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Colonização e biodiversidade

1726 unidades formadoras de colônias (UFCs) foram obtidas, sendo 993 no sistema orgânico e 733 no sistema convencional (Kruskall-Wallis,  $H = 19,40$ ;  $P = 0,0000$ ) (Tabela 1). Os fragmentos de hastes produziram, em ambos os sistemas de cultivo, maior número de isolados quando comparados com o número obtido para os discos de folhas (Kruskall-Wallis,  $H = 19,17$ ;  $P = 0,0000$ ) (Tabela 1). A taxa de colonização total do sistema orgânico foi de 53,9%, e do sistema convencional, de 44,6%. A taxa de colonização entre os tecidos não diferiu estatisticamente pelo teste de Kruskall-Wallis ( $H = 1,36$ ;  $P = 0,715$ ). 50% dos fragmentos de hastes e folhas foram colonizados por pelo menos um fungo e um grande número de fragmentos apresentou infecções múltiplas, com dois ou mais de dois fungos por fragmentos (Tabela 1).

**TABELA 1** - Taxa de colonização e número de fragmentos de folhas e hastes colonizados por fungos endófitos nos sistemas de cultivo orgânico e convencional

|                                | Sistemas de produção |       |       |              |       |       |
|--------------------------------|----------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|
|                                | orgânico             |       |       | convencional |       |       |
|                                | folha                | haste | total | folha        | haste | total |
| Nº total de fragmentos         | 702                  | 642   | 1344  | 702          | 642   | 1344  |
| Nº fragmentos $\geq 1$ isolado | 362                  | 362   | 724   | 287          | 312   | 599   |
| Taxa de colonização (%)        | 51,6                 | 56,4  | 53,9  | 40,9         | 48,6  | 44,6  |
| Nº fragmentos 1 isolado        | 331                  | 198   | 529   | 274          | 217   | 491   |
| Nº fragmentos 2 isolado        | 29                   | 115   | 144   | 12           | 71    | 83    |
| Nº fragmentos $> 2$ isolados   | 2                    | 49    | 51    | 1            | 24    | 25    |
| Nº total de isolados (CFUs)    | 397                  | 596   | 993   | 302          | 431   | 733   |

De 1726 UFCs recuperadas, 1670 (96,8%) formaram estruturas reprodutivas, enquanto 56 (3,2%) formaram apenas colônias estéreis. A diversidade de fungos, excluindo os morfotipos estéreis, compreende 29 gêneros e 40 espécies (Tabela 2). Os gêneros com maior frequência de isolamento foram *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Staninwardia*, *Pseudohalonectria*, *Stagonospora* e *Xylaria* (Tabela 2).

Foram encontradas três conexões entre teleomorfo e anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. - *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, *Colletotrichum crassipes* (Speg.) Arx - *Glomerella* sp. e *Phyllosticta capitalensis* Henn. - *Guignardia mangiferae* Roy. Alguns isolados foram identificados com características do gênero *Staninwardia* e pertencem a uma nova espécie. Três morfotipos distintos de *Colletotrichum gloeosporioides* (sp1, sp2 e sp3) foram caracterizados e puderam ser diferenciados por meio de marcadores morfológicos como aspecto da colônia e tamanho de conídio.

Foram recuperadas 38 espécies no sistema orgânico e 33 espécies no sistema convencional. A comparação da diversidade de endófitos entre os sistemas orgânico e convencional por meio de curvas de rarefação apresentou um padrão semelhante para os dois sistemas (Figura 1). Entretanto, a diferença na riqueza de espécies entre hastes e folhas é considerável, com uma diferença mais acentuada do que aquela existente entre os diferentes tipos de cultivo (Figura 1). A curva de rarefação das UFC's obtidas nas hastes é também mais acentuada, indicando uma maior equitabilidade de distribuição das espécies (Figura 2, Tabela 2).

**TABELA 2** - Taxa de isolamento de fungos endófitos de cafeeiro sob cultivos orgânico e convencional com frequência de isolamento total > 1%

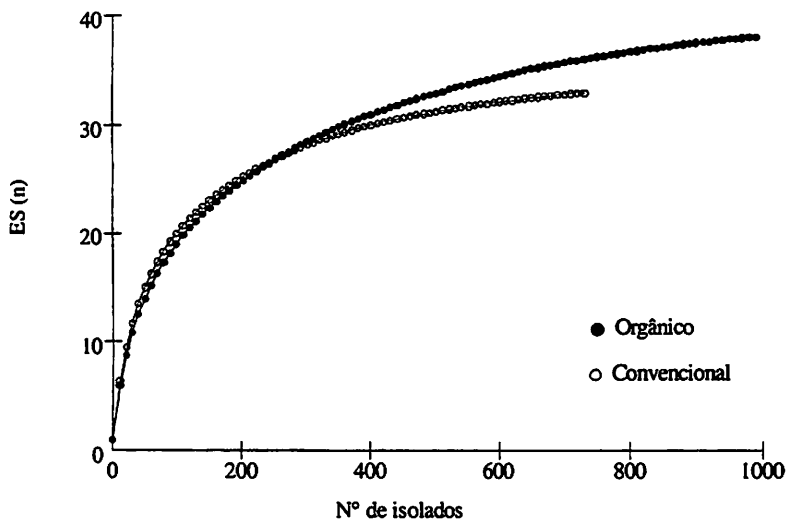
| Espécies                                  | Orgânico |       | Convencional |       | Total |
|---|----------|-------|--------------|-------|-------|
|   | folha    | haste | folha        | haste |       |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sp1 | 37,2     | 19,9  | 25,6         | 7,8   | 23,0  |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sp2 | 5,0      | 11,7  | 5,3          | 15,7  | 9,2   |
| <i>Colletotrichum crassipes</i>           | 4,4      | 15,4  | 1,6          | 9,7   | 7,6   |
| <i>Staninwardia</i> sp.                   | 0,1      | 9,0   | 0,4          | 5,1   | 3,5   |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sp3 | 1,7      | 6,5   | 1,7          | 1,2   | 2,8   |
| micélio cinza                             | 0,7      | 3,4   | 0,9          | 3,6   | 2,1   |
| <i>Phomopsis</i> sp. 1                    | 0,1      | 2,0   | 0,0          | 4,7   | 1,6   |
| <i>Xylaria</i> sp.                        | 3,7      | 0,8   | 1,0          | 0,3   | 1,5   |
| <i>Fusarium solani</i>                    | 0,7      | 0,9   | 2,1          | 1,7   | 1,4   |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i>       | 0,6      | 1,2   | 1,6          | 1,7   | 1,3   |
| <i>Phoma</i> spp.*                        | 0,0      | 2,3   | 0,6          | 2,0   | 1,2   |
| <i>Stagonospora caricinella</i>           | 0,0      | 4,7   | 0,1          | 0,2   | 1,2   |
| <i>Pseudohalonectria lutea</i>            | 0,4      | 3,4   | 0,0          | 0,9   | 1,2   |
| <i>Fusarium stilboides</i>                | 0,0      | 0,8   | 0,0          | 3,3   | 1,0   |

Isolados raros, com frequência relativa < 1%: *Acremonium strictum*, *Alternaria alternata*, *Ascochyta* sp., *Aspergillus flavus*, *Leptosphaeria* sp., *Cladosporiella* sp., *Paraconiothyrium sporulosum*, *Constantinella* sp., *Cyclodonus* sp., *Cyclothyrium* sp., *Dictyochaeta* sp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium semitectum*, *Guignardia mangiferae* (ana. *Phyllosticta* sp.), Micélio branco, *Microsphaeropsis* sp., *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. 2, *Phomopsis* sp. 3, *Scopulariopsis* sp., Celomiceto (não identificado).

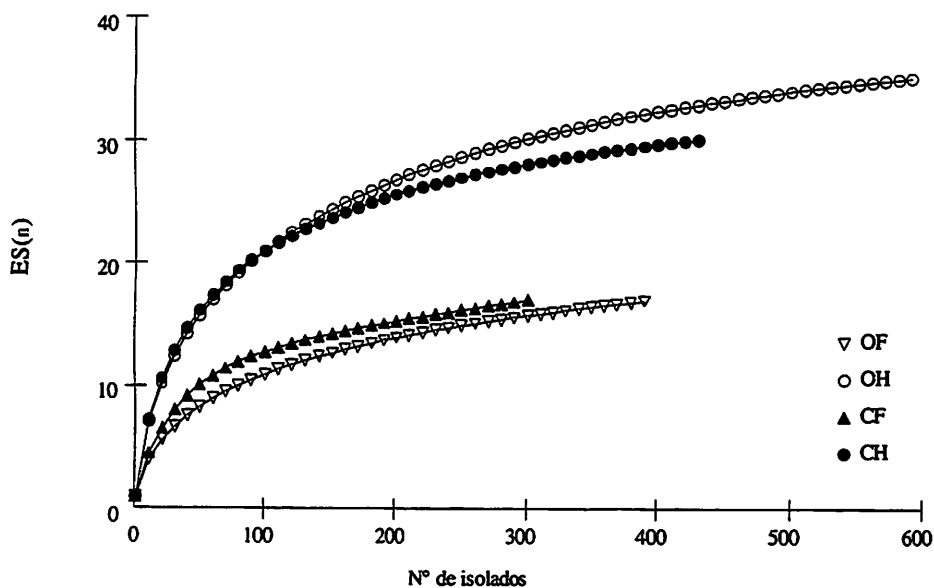
\* *P. exigua* var. *exigua*, *P. herbarum*, *P. jolyana* var. *jolyana* e *P. leveillei* var. *microspora*.

### 3.2 Padrões de colonização

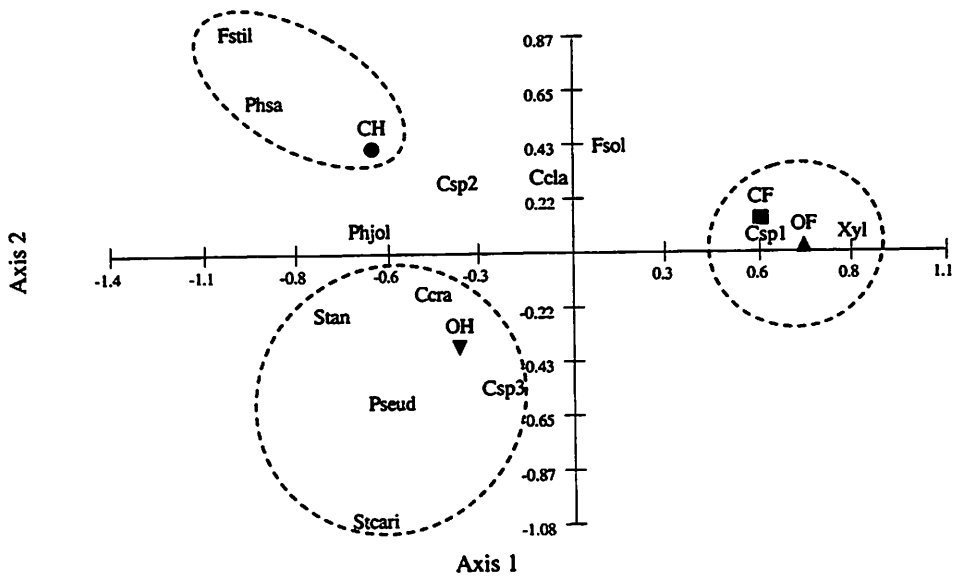
O resultado da análise de correspondência evidenciou a preferência das espécies mais frequentes por algum tipo de tecido. Os dois eixos explicaram 95% da variação dos dados. O eixo vertical separou amostras de hastes das amostras de folhas e o eixo horizontal separou amostras de hastes do sistema orgânico das demais amostras de tecidos (Figura 3).



**FIGURA 1** - Curvas de rarefação de espécies endófitas para os sistemas de cultivo orgânico e convencional.



**FIGURA 2** - Curvas de rarefação de espécies endófitas para os tipos de tecidos em cada sistema de cultivo. OF: orgânico, folha; OH: orgânico, haste; CF: convencional, folha; CH: convencional, haste.



**FIGURA 3** - Análise de correspondência (CA) mostrando a preferência das espécies mais frequentes por tipo de tecido. OF: orgânico, folha; OH: orgânico, haste; CF: convencional, folha; CH: convencional, haste; Ccla: *Cladosporium cladosporioides*; Ccra: *C. crassipes*; Csp1: *Colletotrichum gloeosporioides* sp1; Csp2: *C. gloeosporioides* sp2; Csp3: *C. gloeosporioides* sp3; Fstil: *Fusarium stilboides*; Phjol: *Phoma jolyana*; Phsa: *Phomopsis* sp. 1; Pseud: *Pseudohalonestria*; Stan: *Staninwardia*; Stcari: *Stagonospora caricinella*; Xyl: *Xylaria* sp.

A disposição gráfica obtida permitiu que fossem identificados três agrupamentos distintos. As espécies *Colletotrichum gloeosporioides* sp3, *Stagonospora caricinella*, *Pseudohalonestria lutea*, *Colletotrichum crassipes* e *Staninwardia* sp. foram isoladas com frequência de haste de cafeeiro no sistema orgânico de cultivo. O segundo grupo distinto é composto por *C. gloeosporioides* sp2, *Phomopsis* sp. e *Fusarium stilboides* em hastes de cafeeiro no sistema convencional de cultivo. O terceiro grupo evidenciado no gráfico é formado por *C. gloeosporioides* sp1 e *Xylaria* sp. em folhas de cafeeiro, em ambos os sistemas de cultivo (Figura 3).

## 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigado se a diversidade expressa pelo cálculo da riqueza e abundância relativa de fungos endófitos do cafeeiro difere entre os sistemas de cultivo orgânico e convencional e se a distribuição de fungos endófitos nas folhas e hastes de cafeeiro é diferente.

### 4.1 Colonização e biodiversidade

Apesar de a taxa de colonização entre os diferentes tecidos variar de 40,9 a 56,4%, observou-se alta taxa de infecções múltiplas (Tabela 1). Isto se deve principalmente à metodologia utilizada. Os ramos plagiotrópicos e as folhas foram coletados aleatoriamente no talhão; com isso, fatores ambientais como exposição ao sol, ventos e proximidade a carreadores podem ter influenciado na colonização de algumas folhas e hastes.

A taxa de colonização de folhas e hastes obtida para os dois sistemas de cultivo não diferiu de forma significativa, sendo 53,9% para o sistema orgânico e 44,6% para o convencional (Tabela 2). Entretanto, é possível observar uma tendência do sistema orgânico em comportar um maior número de fungos. A curva de rarefação representando o sistema convencional tende a atingir uma assíntota com o eixo das abscissas, enquanto a curva do sistema de cultivo orgânico ainda continua bastante inclinada na amostragem efetuada (Figura 1). Se a taxa de colonização fosse bem maior, por exemplo, 90%, provavelmente a riqueza de espécies também aumentaria e as curvas seriam mais inclinadas. Logo, parece que a amostragem foi eficiente em desvendar uma grande parcela da riqueza de espécies de fungos associados ao cafeeiro, dentro dos limites da metodologia.



Estes resultados estão dentro de uma amplitude encontrada em outros estudos com fungos endófitos. Uma grande variação na taxa de colonização foi encontrada em palmeiras, variando de 12,5% (Rodrigues & Samuels, 1990) a elevadas taxas de 80,8-89,2% (Fröhlich et al., 2000). Em estudo no qual somente folíolos foram examinados, a taxa de colonização foi de 21-30% (Rodrigues, 1994). Em bananeira (*Musa acuminata* L.), essa taxa variou de 41,7-56,5% (Photita et al., 2001) e de 48,3-66,7% (Kumar & Hyde, 2004). O menor tamanho dos discos de folhas (3 mm) possivelmente explica as menores taxas de colonização observadas por Photita et al. (2001) e Rodrigues (1994), enquanto Kumar & Hyde (2004) e Taylor (1999) utilizaram discos com 6 mm de diâmetro e observaram maiores taxas de colonização dos tecidos.

A comunidade de fungos endófitos de *C. arabica* foi representada por 40 espécies. Essa comunidade foi similar para os sistemas orgânico e convencional. Entre os gêneros com taxa de isolamento acima de 1%, *Colletotrichum* foi o mais freqüente (46,6%), seguido por *Staninwardia* (3,5%), *Phomopsis* (1,6) e *Xylaria* (1,5%) (Tabela 2).

*Xylaria*, *Colletotrichum* e *Guignardia* foram os gêneros de fungos endófitos recuperados com maior freqüência de cafeeiros (*C. arabica*) em Porto Rico (Santamaría & Bayman, 2005) e *M. acuminata*, na Tailândia (Photita et al., 2001). *Xylaria*, *G. cingulata* e *Phomopsis* sp. foram os fungos endófitos dominantes em *Stylosanthes guianensis* (Pereira et al., 1993).

Fungos endófitos dos gêneros *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Xylaria* e *Fusarium* foram isolados com freqüência de diversas plantas (Camatti-Sartori et al., 2005; Cannon & Simmons, 2002; Gamboa & Bayman, 2001, Pereira et al., 1993, 1999; Rodrigues, 1994, Rubini et al., 2005). Portanto, as micobiotas endófitas de diferentes plantas tropicais são aparentemente similares em sua composição taxonômica ao nível genético.

Todavia, *Staninwardia* sp. foi o quarto endófito mais freqüentemente isolado neste estudo e este é o primeiro registro de sua ocorrência em cafeeiro. Esta espécie foi recuperada principalmente de hastes do cafeeiro e trata-se de uma nova espécie. Outras duas espécies de *Staninwardia*, *S. breviscula* B. Sutton e *S. suttonii* Crous & Summerell, foram registradas causando lesões foliares em eucalipto (Summerell et al., 2006; Sutton, 1980).

Aproximadamente 35% das espécies apresentaram taxa de isolamento entre 1% e 23%, enquanto a maioria das espécies ocorreu raramente, com taxa de isolamento < 1% (Tabela 2). Esse padrão de poucas espécies com alta freqüência de recorrência e muitas espécies com baixa ocorrência segue uma distribuição log-normal, é comum em estudos de diversidade ou riqueza de espécies de plantas, animais e fungos e não é único para estudos com endófitos (Frölich et al., 2000; Gamboa & Bayman, 2001; Santamaría & Bayman, 2005).

A comparação da diversidade de endófitos entre os sistemas orgânico e convencional foi realizada pela análise das curvas de rarefação. As curvas de rarefação de espécies seguem um padrão semelhante para os dois sistemas (Figura 1). O sistema orgânico mostrou-se o mais rico em espécies. A sua curva de rarefação de espécies tende a uma estabilização mais tardia, enquanto a curva de rarefação de espécies do sistema convencional logo tende a uma estabilização (tendência a atingir uma assíntota com o eixo x), sugerindo ser este o sistema com a menor riqueza de espécies. O sistema de plantio orgânico de maçãs na região sul do Brasil mostrou maior diversidade de fungos endófitos e leveduras comparado com o sistema convencional (Camatti-Sartori et al., 2005). A espécie *Sporobolomyces roseus* Kluyver & C.B. Niel (Ascomycota, Sporidiobolaceae) ocorreu somente no sistema orgânico de cultivo e pode, eventualmente, ser utilizada como bioindicador desse sistema.

## 4.2 Padrões de colonização

A alta recorrência de espécies como *S. caricinella*, *P. lutea*, *C. crassipes* e *Staninwardia* sp. em café orgânico pode ser uma indicação de uma sensibilidade maior dessas espécies a condições de manejo encontradas no cultivo convencional. Possivelmente, esses fungos poderiam servir como bioindicadores de ambientes mais conservados, sem a aplicação demasiada de insumos agrícolas, como ocorre no cultivo convencional.

*Xylaria* sp. foi recuperada principalmente de folhas, tanto no sistema orgânico como no convencional. A ocorrência de fungos xylariáceos em folhas é comum em estudos de fungos endófitos. Estes fungos são tidos como decompositores de matéria orgânica, mas ocorrem também tipicamente como endófitos (Petrini et al., 1995; Rodrigues, 1994).

*Colletotrichum crassipes* foi recuperado como o terceiro endófito mais freqüente neste estudo. Espécies de *Colletotrichum* são conhecidas como patógenos foliares comuns, mas algumas delas, especialmente formas de *C. gloeosporioides*, são conhecidas como endófitas (Freire & Bezerra, 2001). A grande diversidade de morfotipos de fungos do gênero *Colletotrichum* em cafeeiros da África é bem conhecida (Hindorf, 1973). No presente trabalho, o morfotipo *C. gloeosporioides* sp1 ocorreu com freqüência tanto em folhas como em haste, enquanto *C. gloeosporioides* sp2 e *C. gloeosporioides* sp3 apresentaram maior freqüência em hastes. Os morfotipos sp1 e sp2 apresentam micélio branco e produzem com facilidade a fase sexuada (*Glomerella cingulata*) em meio de cultura. Entretanto, *C. gloeosporioides* sp3 apresenta micélio esverdeado e a fase sexuada não foi observada. Infecção latente de diferentes morfotipos de *Colletotrichum*, e também de *Phoma* e *Phomopsis*, foi observada em folhas sadias de cafeeiro por Rayner (1948). O autor observou que alguns morfotipos de *Colletotrichum* foram mais freqüentes em determinados órgãos do cafeeiro. Como os diferentes morfotipos representam, provavelmente,

espécies biológicas distintas, deve-se recorrer à caracterização molecular e a cruzamentos na tentativa de esclarecer esse complexo de morfoespécies dentro do gênero. Para o estudo do padrão de colonização e da interação fungo-planta, o uso de isolados geneticamente modificados com marcadores fluorescentes pode fornecer novas informações sobre esse complexo patossistema.

No presente trabalho observou-se que o sistema de cultivo orgânico apresentou maior número de isolados, maior taxa de colonização das folhas e hastes por fungos e maior número de fragmentos com infecções múltiplas. Além disso, apresentou a maior porcentagem de fungos endófitos menos comuns nos isolamentos. Entretanto, com as informações obtidas nestes dois anos de estudo não é possível inferir sobre a real possibilidade de alguma dessas espécies exóticas serem bioindicadoras, isto porque, para identificar mudanças no ecossistema, são necessárias coletas repetidas no tempo e no espaço. Estudos a longo prazo permitem a compilação de inventários ambientais compreensíveis, que podem fornecer informações sobre a extensão de influências antrópicas.

Esse trabalho consta de levantamento da comunidade de fungos endófitos do cafeeiro em sistemas de cultivo orgânico e convencional e sua distribuição na planta; portanto, não se pode inferir qual função estes fungos exercem na planta.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological control of plant diseases: the European situation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 114, n. 3, p. 329-341, Mar. 2006.
- ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT G. S.; COLEY P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 267-274, July 2000.
- ARNOLD, A. E.; MEDJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Science**, St. Paul, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, Dec. 2003.
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; AA, H. A. van der, WERDT, M. de, Brouwershaven, I. R. van; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI JUNIOR, W.; BLANCO, C. G. de; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 5, p. 464-477, May 2002.
- BENHAMOU, N.; GARAND, C.; GOULET, A. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4044-4060, Aug. 2002.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, New York, n. 2, v. 86, p. 187-198, Mar./Apr. 1994.
- CAIXETA, I. F.; PEDINI, S. Comercialização do café orgânico. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 149-152, 2002.
- CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T. da; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. , PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional,

integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, n. 5, p. 397-402, 2005.

CANNON, P. F.; SIMMONS C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 210-220, Mar./PR. 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO / MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - CONAB. 2006. **Safra Café**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3levantamentocafesafra200607.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2007.

FREIRE, F. C. O.; BEZERRA, J. L. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 304-308, July/Sept. 2001.

FRÖLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, Oct. 2000.

GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*). **Biotropica**, St. Louis, v. 33, n. 2, p. 352-360, June 2001.

GAMBOA, M. A.; LOUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 156, n. 1, p. 41-45, 2003.

HECK JUNIOR, K. L.; BELLE, G. van; SIMVERLOFF, D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. **Ecology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1459-1461, 1975.

HINDORF, H. *Colletotrichum* population on *Coffea arabica* L. in Kenya II. Qualitative and quantitative differences in the *Colletotrichum* population. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 77, p. 216-234, 1973.

KUMAR, S. S. D.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 17, p. 69-90, Oct. 2004.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*, New York, v. 88, n. 5, p. 733-738, Sept./Oct. 1996.

LOUZADA, JULIO N. C.; SANCHES, N. M.; SCHLINDWEIN, M. N.; Bioindicadores de qualidade e de impactos ambientais da atividade agropecuária. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 21, n. 202, p. 72-77, 2000.

MOREIRA, C. F.; FERNANDES, E. A. N.; TAGLIAFERRO, F. S. Discriminação de café orgânico produzido sob sombra e a pleno sol pela composição química elementar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA, 3. , 2003, Recife PE. **Terceiro Congresso Brasileiro de Metrologia – artigos**. São Paulo: O2 Estúdio Web/Metrologia & Instrumentação, 2003. p. 1-5.

ORMOND, J. G. P.; PAULA, S. R. L. de; FAVERET FILHO, P.; ROCHA, L. T. M. da. Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n. 15, p. 3-34, 2002.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: A first report. *Mycologia*, New York, v. 85, n. 3, p. 362-364, May/June 1993.

PEREIRA, J. O.; CARNEIRO VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Dordrecht, v. 15, n. 1, p. 37-40, Feb. 1999.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 60, p. 789-796. 1982

PETRINI, O.; PETRINI, L.; RODRIGUES, K. F. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 4, p. 531-539, jul./ago. 1995.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research*, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1508-1513, Dec. 2001.

- RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. *Nature*, London, v. 161, n. 4085, p. 245-246, 1948.
- REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press, 1996. 223 p.
- REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist*, Cambridge, v. 151, n. 3, p. 705-716, Sept. 2001.
- RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleraceae*. *Mycologia*, New York, v. 86, n. 3, p. 376-385, May/June 1994.
- RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE K. D. (Ed.). **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1996. p. 57-69.
- RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research*, Cambridge v. 94, n. 6, p. 827-830, Sept. 1990.
- RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R. dos; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, Bethesda, v. 1, p. 24-33, 2005.
- SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, New York, v. 50, n. 1, p. 1-8, July 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, Cambridge, v. 106, n. 9, p. 996-1004, Sept. 2002.
- SILVA, J.; BETTIOL, W. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of fusarium wilt of tomato. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 30, n. 4, p. 409-412, July/Aug. 2005.
- SPELLERBERG, I. F. **Monitoring ecological change**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 334 p.



STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

SUMMERELL, B. A.; GROENEWALD, J. Z.; CARNEGIE, A. J.;  
SUMMERBELL, R. C.; CROUS, P. W. *Eucalyptus* microfungi known from culture. 2. *Alysiidiella*, *Fusculina* and *Phlogicylindrium* genera nova, with notes on some other poorly known taxa. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 23, p. 323-350, Oct. 2006.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes. Fungi imperfecti with Picnidia, Acervuli and Stromata.** Kew: CMI, 1980. 696 p.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, Cambridge, v. 142, n. 2, p. 335-346, May 1999.

## **CAPÍTULO 3**

### **ESPÉCIES DE *PHOMA* ASSOCIADAS AO CAFEIEIRO**

## RESUMO

ALMEIDA, Anderson Resende. *Espécies de Phoma associadas ao cafeeiro*. 2007. p. 55-82. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>5</sup>

Os principais danos causados por espécies de *Phoma* às plantas de café acontecem em decorrência de surtos epidêmicos favorecidos pelas frentes frias e outras condições climáticas adversas, como chuva de granizo e ventos frios. Realizou-se um levantamento em 23 municípios da região sul do Estado de Minas Gerais e no sudoeste da Bahia com o objetivo de caracterizar e identificar por meio de caracteres morfológicos, moleculares e patogenicidade as espécies de *Phoma* associadas ao cafeeiro. De aproximadamente 60 isolados avaliados foram identificadas por meio de caracteres morfológicos seis espécies; *P. tarda*, *P. costarricensis*, *P. exigua* var. *exigua*, *P. exigua* var. *noackiana*, *P. jolyana* var. *jolyana*, *P. leveillei* var. *microspora* e *P. herbarum*. *P. tarda* apresentou ocorrência generalizada em todas as lavouras cafeeiras estudadas e foi a única espécie patogênica sendo, portanto o principal agente etiológico da mancha de *Phoma* do cafeeiro. *P. exigua* var. *noackiana* e *P. costarricensis* foram isoladas de folhas com sintomas de mancha de *Phoma* mas a patogenicidade não foi comprovada. As demais espécies foram obtidas de hastes e folhas de plantas assintomáticas. Análises de fragmentos de seqüências de  $\beta$ -*tubulina* e região dos espaçadores internos transcritos ITS do RNA ribossômico foram utilizadas para determinar as relações filogenéticas entre *P. tarda* e outras espécies de *Phoma*. Na análise de máxima parcimônia para as duas regiões do genoma estudadas *P. tarda*, *P. costarricensis* e *P. exigua* var. *noackiana* de Minas Gerais agruparam-se no mesmo clado de *P. exigua*. Observou-se nesse estudo uma estreita relação entre *P. tarda* e *P. exigua* que não puderam ser diferenciadas com estas duas regiões. Provavelmente, a distância genética entre *P. tarda* e *P. exigua* é muito pequena e regiões mais variáveis do genoma devem ser utilizadas para a separação dessas espécies. Outra hipótese é de que *P. tarda* e *P. exigua* correspondam à mesma espécie filogenética.

---

<sup>5</sup> Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning (Orientador), Eduardo Alves – UFPA (Co-orientador)

## ABSTRACT

ALMEIDA, Anderson Resende. *Phoma* species associated with coffee tree. 2007. 55-82 p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>6</sup>

The main damages caused by *Phoma* species to coffee trees occur when epidemic outbreaks are favored by cold fronts and other adverse climatic conditions, like hailstorm and cold winds. A survey for *Phoma* leaf blight in 23 municipalities of the South region of Minas Gerais State, and in the Southwest region of Bahia State was done with the objective to characterize and identify the *Phoma* species associated with coffee trees, through morphological and molecular characters, and pathogenicity. In a total of 60 strains evaluated, six *Phoma* spp. were identified through morphological characters: *P. tarda*, *P. costarricensis*, *P. exigua* var. *exigua*, *P. exigua* var. *noackiana*, *P. jolyana* var. *jolyana*, *P. leveillei* var. *microspora* and *P. herbarum*. *P. tarda* was widespread in the coffee plantations surveyed, and was the sole pathogenic species found, thus considered to be the main causal agent of *Phoma* leaf blight e stem dieback of coffee trees in both regions. *P. exigua* var. *noackiana* and *P. costarricensis* were isolated from leaves presenting *Phoma* leaf blight symptoms, but the pathogenicity to these strains was not confirmed. The other species were obtained from shoots and leaves of asymptomatic plants. Portions of the  $\beta$ -*tubulin* gene and the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal RNA were used to determine the phylogenetic relationships between *P. tarda* and other *Phoma* spp. In the maximum parsimony analysis to both regions of the genome *P. tarda*, *P. costarricensis* and *P. exigua* var. *noackiana* from Minas Gerais clustered in the *P. exigua* clade. A narrow relationship between *P. tarda* and *P. exigua* was observed in this study, since these species could not be differentiated when using two genome regions. The genetic distance between *P. tarda* and *P. exigua* probably is too small to be detected with these regions, thus it is needed to found more variable regions of the genome to separate these species, if possible. It is also hypothesized that *P. tarda* and *P. exigua* corresponds to the same phylogenetic species.

---

<sup>6</sup> Advising Committee: Ludwig H. Pfenning (Advisor), Eduardo Alves – UFLA (Co-advisor)

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas de exportação do Brasil, sendo a espécie *Coffea arabica* L. a mais amplamente cultivada. O cafeeiro pode ser acometido por várias doenças, sendo as de natureza fúngica as principais responsáveis por perdas na produtividade e qualidade do produto (Carvalho et al., 1998; Pfenning et al., 2005).

Os principais danos causados às plantas de café por espécies de *Phoma* acontecem em decorrência de surtos epidêmicos favorecidos pelas frentes frias e outras condições climáticas adversas, como chuva de granizo e ventos frios (Carvalho et al., 1998).

Na lavoura, a doença afeta folhas e ramos, e no viveiro ocorre na base do caule. Eventualmente, as flores podem ser afetadas, levando à queda dos frutos no estágio inicial. A doença causada por espécies de *Phoma* no cafeeiro é bem conhecida também em outras regiões cafeeiras do mundo, como Camarões, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Guatemala, Índia e Quênia (Echandi, 1957; Fernandez, 1961; Firman, 1965; Rajendran et al., 1983; Ramiro Gómez & Elkin Bustamante, 1977; Stewart, 1957; Vermeulen, 1979).

Os agentes etiológicos da mancha de phoma do cafeeiro foram considerados por muitos anos como sendo espécies do gênero *Phoma* e *Ascochyta*. Entretanto, foi mostrado, por meio do estudo da conidiogênese e outras características morfológicas e fisiológicas de isolados desses fungos, que a espécie tida como *Ascochyta coffeae* Henn. corresponde a *Phoma tarda* (R.B. Stewart) H. Vermeulen (Boerema & Bollen, 1975; Boerema et al., 2004). *Phoma tarda* e *P. costarricensis* Echandi são considerados os principais agentes etiológicos da mancha de phoma e da “seca de ponteiros” do cafeeiro.

A partir da década de 90, marcadores enzimáticos e moleculares começaram a ser utilizados para diferenciar espécies de *Phoma* com características morfológicas semelhantes (Abel et al., 2002; Balmas et al., 2005; Reddy et al., 1998).

Comparações de seqüências nucleotídicas dos genes ribossomais e seqüências de genes conservados que codificam proteínas essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, como  $\beta$ -tubulina e fator de alongação 1- $\alpha$ , também são utilizados na tentativa de elucidar relações filogenéticas com o uso crescente em vários organismos (O'Donnell et al., 1998; Irinyi et al., 2006).

Foram objetivos do presente estudo: i. fazer um levantamento de espécies do complexo *Phoma* em cafeeiro em vários municípios de Minas Gerais e Bahia; ii. isolar e caracterizar as espécies de *Phoma* por meio de caracteres morfológicos; iii. avaliar sua patogenicidade; e iv. fazer análise filogenética dos isolados com base no seqüenciamento da região ITS do DNA ribossomal e de parte do gene da  $\beta$ -tubulina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de isolados e estudos morfológicos

Folhas com mancha de phoma foram coletadas na região do Alto Paranaíba, Central, Centro-Oeste, Jequitinhonha, Sul e Zona da Mata de Minas Gerais e no sudoeste da Bahia no período de 1998 a 2006 (Tabela 1). Culturas puras foram obtidas em extrato de malte 2% (MA; 20 g de extrato de malte, 18 g de ágar, 1 L água) por isolamento direto a partir de picnídios presentes nas folhas e hastes. Foram utilizados, também, isolados endófitos de *P. exigua* var *exigua*, *P. herbarum*, *P. leveillei* var *leveillei* e *P. jolyana* var *jolyana*, obtidos como explicado no capítulo 2 (Tabela 1). Culturas de referência de espécies de *Phoma* foram obtidas da coleção *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) (Tabela 1).

A identificação dos isolados foi realizada com base no Manual de Identificação de *Phoma* (Boerema et al., 2004). Os isolados foram cultivados em MA 4% e em meio de aveia OA (20 g de aveia, 18 g de ágar, 1 L água) a 22 °C e sob fotoperíodo de 12 horas. Após sete e quinze dias de crescimento em MA 4%, mediu-se o diâmetro e avaliaram-se a coloração das colônias e a presença de clamidósporos. A morfologia dos picnídios e dos conídios foi avaliada em meio OA. Os conídios foram caracterizados de acordo com suas dimensões, forma e septação. O teste de NaOH foi realizado em culturas crescidas em MA por sete dias. Dez e sessenta minutos após colocar uma pastilha de NaOH na margem das colônias, avaliou-se a formação ou não de pigmentação. As características avaliadas *in vivo* foram as dimensões, a forma e a septação dos conídios, e também a coloração dos picnídios, sua posição em relação ao tecido do hospedeiro e a presença de pilosidade.

Os isolados estudados no presente estudo foram preservados pelo método de Castellani (Castellani, 1967) e depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

TABELA 1 - Isolados de *Phoma* examinados neste estudo.

| Cultura                | Espécie                                    | Substrato                 | *Procedência        | Data |
|------------------------|--|---------------------------|---------------------|------|
| <sup>1</sup> CML 192†* | <i>P. costarricensis</i>                   | <i>C. arabica</i> – folha | Nepomuceno MG       | 1998 |
| CBS 506.91*            | <i>P. costarricensis</i>                   | <i>C. arabica</i> – folha | Nicarágua           | 1991 |
| CBS 431.74†*           | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>Solanum tuberosum</i>  | Holanda             | 1974 |
| CML 646                | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>C. arabica</i> – haste | S. A. Amparo MG     | 2005 |
| CML 647                | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>C. arabica</i> – haste | S. A. Amparo MG     | 2005 |
| CML 648                | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>C. arabica</i> – haste | S. Rita Sapucaí MG  | 2005 |
| CML 649                | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>C. arabica</i> – folha | S. A. Amparo MG     | 2005 |
| CML 701                | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>C. arabica</i> – folha | Lavras MG           | 2006 |
| CML 706†*              | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>C. arabica</i> – folha | Lavras MG           | 2006 |
| CML 944†               | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>        | <i>C. arabica</i> – folha | Machado MG          | 2006 |
| CML 324†*              | <i>P. exigua</i> var. <i>noackiana</i>     | <i>C. arabica</i> – folha | Lavras MG           | 2001 |
| CBS 101203*            | <i>P. exigua</i> var. <i>noackiana</i>     | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Colômbia MG         | 1998 |
| CML 190                | <i>P. herbarum</i>                         | <i>C. arabica</i> – folha | Capelinha MG        | 1999 |
| CML 253                | <i>P. herbarum</i>                         | <i>C. arabica</i> – grão  | Viçosa MG           | 2001 |
| CML 325                | <i>P. herbarum</i>                         | <i>C. arabica</i> – folha | Ingáí MG            | 2004 |
| CML 357                | <i>P. herbarum</i>                         | <i>C. arabica</i> – folha | Machado MG          | 2003 |
| CML 358                | <i>P. herbarum</i>                         | <i>C. arabica</i> – folha | Lavras MG           | 2002 |
| CML 359                | <i>P. herbarum</i>                         | <i>C. arabica</i> – haste | Machado MG          | 2002 |
| CBS 615.75†*           | <i>P. herbarum</i>                         | <i>Rosa multiflora</i>    | Holanda             | 1975 |
| CBS 463.69†*           | <i>P. jolyana</i>                          | <i>Mangifera indica</i>   | Índia               | 1969 |
| CML 194                | <i>P. jolyana</i> var. <i>jolyana</i>      | <i>C. arabica</i> – folha | S. S. do Paraíso MG | 1999 |
| CML 330                | <i>P. jolyana</i> var. <i>jolyana</i>      | <i>C. arabica</i> – grão  | Viçosa MG           | 2001 |
| CML 331                | <i>P. jolyana</i> var. <i>jolyana</i>      | <i>C. arabica</i> – haste | Lavras MG           | 2002 |
| CML 195                | <i>P. leveillei</i> var. <i>microspora</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Lavras MG           | 1999 |
| CML 191†               | <i>P. tarda</i>                            | <i>C. arabica</i> – ramo  | Patrocínio MG       | 1999 |
| CML 193†*              | <i>P. tarda</i>                            | <i>C. arabica</i> – folha | Machado MG          | 1998 |



Tabela 1 Continua...

|             |                 |                           |                        |      |
|-------------|-----------------|---------------------------|------------------------|------|
| CML 326†*   | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Ingai MG               | 2004 |
| CML 333†*   | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | S. S. do Paraíso MG    | 1998 |
| CML 334*    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Lavras MG              | 1997 |
| CML 360     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Araponga MG            | 2002 |
| CML 642†    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – muda  | São Gotardo MG         | 2005 |
| CML 643     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Patrocínio MG          | 2005 |
| CML 644     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | S. A. Amparo MG        | 2005 |
| CML 645†    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | S. Rita Sapucaí MG     | 2005 |
| CML 710†    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Cabo Verde MG          | 2006 |
| CML 714†    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Campestre MG           | 2005 |
| CML 716*    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Campanha MG            | 2005 |
| CML 721†*   | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | S. A. Amparo MG        | 2006 |
| CML 722     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | L. E. Magalhães BA     | 2006 |
| CML 945†    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Machado MG             | 2006 |
| CML 946     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Machado MG             | 2006 |
| CML 947     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Machado MG             | 2006 |
| CML 950†    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Três Pontas MG         | 2006 |
| CML 956†    | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Muzambinho MG          | 2006 |
| CML 959     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Campos Altos MG        | 2006 |
| CML 960     | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Pres. Kubitschek<br>MG | 2006 |
| CBS 109183* | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Camarões               | 2001 |
| CBS 119730* | <i>P. tarda</i> | <i>C. arabica</i> – folha | Brasil                 | 1998 |

<sup>1</sup>CBS: Centraal Bureau voor Schimmelcultures; CML: Coleção Micológica de Lavras.

†Isolados usados no teste de patogenicidade; \*Isolados com seqüência de pelo menos uma região do DNA.

<sup>2</sup>S. S do Paraíso: São Sebastião do Paraíso; S.A. Amparo: Santo Antônio do Amparo; S.R. Sapucaí: Santa Rita do Sapucaí; L.E. Magalhães: Luiz Eduardo Magalhães – BA.

## 2.2 Extração de DNA

O protocolo usado baseia-se em CTAB e foi adaptado de Macdonald et al. (2000) e Möller et al. (1992). Os isolados foram cultivados em extrato de malte líquido 2%, em agitação constante de 100 rpm por cinco dias em temperatura de 25 a 28°C. Cerca de 150 mg de micélio seco foram macerados em cadinho com nitrogênio e suspensos em microtubos de 1,5 mL com 750

$\mu\text{L}$  de tampão de extração CTAB 3% (100 mM de Tris-HCl [pH 8,0]; 20 mM de EDTA, 1,4 M de NaCl, 3% de CTAB, 2% PVP), sendo 1  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol adicionado ao tampão no momento da extração. Os tubos foram incubados a 65°C por 45 minutos, seguido por acréscimo de 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, 550  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram recuperados em um novo tubo e adicionaram-se 143  $\mu\text{L}$  de NaCl 5N e 65  $\mu\text{L}$  de CTAB 10%, com incubação em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Mais uma vez adicionaram-se 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico, seguidos de centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. Após este processo, foram recuperados 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante em um novo tubo e adicionaram-se 225  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  5 M. Os microtubos ficaram imersos em gelo por 30 minutos, seguidos por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionaram-se 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto gelado para precipitar o DNA. Os tubos foram colocados no freezer a -20°C por 30 minutos. Após centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% gelado, seco a vácuo e ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de TE (Tris EDTA) e armazenado a 4 °C. O DNA foi quantificado utilizando-se eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado por comparação da intensidade da banda com DNA lambda digerido de bacteriófago (*Hind* III) de peso conhecido.

### 2.3 Seqüenciamento e análise filogenética

Os primers ITS5 (senso, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (antiseno, 5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) foram utilizados na reação de PCR para amplificação de parte do DNA ribossomal dos isolados de *Phoma*. Para amplificação de parte do gene da  $\beta$ -tubulina foram utilizados os primers Bt2a (senso, 5'-

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC-3') e Bt2b (antisense, 5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') (Glass & Donaldson, 1995).

As reações de PCR para  $\beta$ -tubulina foram realizadas como descrito por O'Donnell & Cigelnik (1997). Para a região ITS, as reações de PCR foram realizadas em volume de 50  $\mu$ L, contendo 5  $\mu$ L de tampão 10X; 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 25 mM; 5  $\mu$ L de dNTPs, 2 mM; 2  $\mu$ L de cada primer, 10  $\mu$ M; 0,5  $\mu$ L de taq DNA polimerase, 5  $U \cdot \mu L^{-1}$ ; 2  $\mu$ L de DNA, 20  $ng \cdot \mu L^{-1}$  e 29,5  $\mu$ L de água ultrapura. Os ciclos da reação de PCR foram: desnaturação inicial, 94 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 40 segundos; anelamento a 55 °C por 55 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos e alongação final a 72 °C por 5 minutos.

Os fragmentos gênicos amplificados por PCR foram purificados com o *GenElute PCR Clean-Up Kit* (Sigma, São Paulo, Brasil) e analisados em gel de agarose 1% para estimar a concentração. O seqüenciamento dos fragmentos foi realizado nos sentidos senso e antisense com os primers ITS4 e ITS5 para a região ITS e os primers Bt2a e Bt2b para beta tubulina, utilizando o kit *Big Dye terminator* versão 3 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil) em seqüenciador automático ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER, no Laboratório de Genética Molecular, ESALQ - USP. O programa de PCR para o seqüenciamento constituiu-se de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 96 °C por 10 segundos; anelamento a 55 °C por 5 segundos para a região ITS ou 61 °C por 5 segundos para a beta tubulina e extensão a 60 °C por 4 minutos.

As seqüências geradas foram analisadas com o programa *Sample Manager* e visualizadas com o *Sequence Analysis*. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa *BioEdit* (Hall, 1999) e as seqüências, comparadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio de

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As novas seqüências obtidas no presente estudo foram depositadas no GenBank, EMBL, NCBI.

Foram obtidas, do NCBI, seqüências de DNA de  $\beta$ -tubulina e da região ITS de espécies de *Phoma* e de *Ascochyta* e de seus teleomorfos para realizar os alinhamentos múltiplos no programa CLUSTAL W, juntamente com as seqüências dos isolados de *Phoma* spp. recuperados neste estudo (Tabela 2).

Os alinhamentos foram corrigidos manualmente no programa BioEdit e submetidos à análise de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0 b10. Utilizou-se a opção *default* do programa com os *gaps* considerados como um quinto caractere. As espécies *Botryosphaeria dothidea* e *B. rodhina* foram utilizadas como *outgroup* em todas as análises. Foram geradas árvores filogenéticas para cada região do genoma estudado e para a combinação das duas regiões. As arvores filogenéticas gerada foram visualizadas no programa TreeView.

## 2.4 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado com isolados identificados como *P. tarda*, *P. exigua* var *exigua*, *P. exigua* var *noackiana*, *P. costarricensis*, *P. leveillei* e *P. jolyana* (Tabela 1). Mudanças de cafeeiro, cultivar Mundo Novo 376/4, com três pares de folhas foram pulverizadas com suspensão de  $3,5 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> de cada isolado. O inóculo foi obtido em MA 2% após 12 dias de cultivo a 22°C. As mudas inoculadas foram cobertas com sacos plásticos transparentes e colocadas em câmara de crescimento vegetal a 15°C e fotoperíodo de 12 horas. Para *P. costarricensis* foram realizadas inoculações com e sem fermento nas folhas. As mudas inoculadas ficaram sob câmara úmida durante o experimento e as avaliações dos sintomas e o reisolamento dos fungos foram realizados duas semanas após a inoculação.

TABELA 2 - Sequências adicionais obtidas do GenBank.

| Número isolado <sup>1</sup> | Espécie  | Hospedeiro                                       | tubulina  | ITS      |
|-----------------------------|--|--|-----------|----------|
| UCD 1156Me                  | <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.) Ces. & De Not.                          | <i>Vitis vinifera</i> L.                         | DQ233623  |          |
| UCD 1962SB                  | <i>Botryosphaeria rhodina</i> (Berk. & M.A. Curtis) Arx                        | <i>Vitis vinifera</i> L.                         |           | DQ233597 |
| UCD 1962SB                  | <i>Botryosphaeria rhodina</i> (Berk. & M.A. Curtis) Arx                        | <i>Vitis vinifera</i> L.                         | DQ233618  |          |
| CBS 102634                  | <i>Didymella applanata</i> (Niessl) Sacc                                       | <i>Rubus idaeus</i> L.                           |           | AJ428534 |
| ATCC 96418                  | <i>Didymella fabae</i> G.J. Jellis & Punith.                                   | <i>Vicia faba</i> L.                             |           | DQ383952 |
| ATCC 96419                  | <i>Didymella lentis</i> Kaiser, Wang & Roger                                   | <i>Lens culinaris</i> Medikus.                   |           | DQ383953 |
| CBS 235.55                  | <i>Didymella pinodes</i> Berk & Bloxam) Petr                                   |  |           | AY152551 |
| Y15                         | <i>Didymella rabiei</i> (Kovatsch.) Arx  | <i>Cicer judaicum</i> Boiss                      |           | DQ822479 |
| CBS 527.66                  | <i>P. eupyrena</i> Sacc  | solo   | AY749024  |          |
| WAC 9988                    | <i>P. exigua</i> Sacc  | <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.               | AY831509  |          |
| AR 3722                     | <i>P. exigua</i> Sacc  | <i>Centaurea solstitialis</i> L.                 |           | AY089978 |
| CBS 101156                  | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i> Sacc                                       | <i>Solanum tuberosum</i> L.                      |           | AF268182 |
| CBS 101205                  | <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i> Sacc                                       | <i>Vinca major</i> L.                            |           | AF268185 |
| CBS 443.94                  | <i>P. exigua</i> var. <i>heteromorpha</i> (Schulzer & Sacc) Noordel. & Boerema | <i>Nerium oleander</i> L.                        |           | AY268184 |
|                             | <i>P. exigua</i> var. <i>heteromorpha</i>                                      | <i>Nerium oleander</i> L.                        |           | AY899262 |
| CBS 101215                  | <i>P. exigua</i> var. <i>noackiana</i> (Allerch.) Aa, Boerema & Gruyter        | <i>Phaseolus vulgaris</i> L.                     |           | AF268188 |
| CBS 293.36                  | <i>P. glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel                               | <i>Solanum tuberosum</i> L.                      |           | AJ428530 |
|                             | <i>P. herbarum</i> Westend.  | salmão   |           | AY337712 |
| CBS 276.37                  | <i>P. herbarum</i> Westend.  |  | AY 749025 |          |
| 1-A-2-1                     | <i>P. macrostoma</i> Mont.   | <i>Pinus sylvestris</i> L.                       |           | AJ310556 |
| CBS 316.90                  | <i>P. medicaginis</i> Malbr. & Roum  | <i>Medicago sativa</i> L.                        | AY 831518 |          |
| P3                          | <i>P. medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i> Malbr. & Roum                    | <i>Medicago sativa</i> L.                        | DQ109962  |          |
| CBS 740.96                  | <i>P. nigrificans</i> (P. Karst.) Boerema, Loer & Wittern                      | <i>Armoracia rusticana</i> Gaertn., Mey & Scherb | AY 749031 |          |
| CBS 318.90                  | <i>P. pinodella</i> (L.K. Jones) Morgan Jones & K.B. Burch                     | <i>Pisum sativum</i> L.                          | AY 831517 |          |

<sup>1</sup>AR: Amy Rossman; ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraal Bureau voor Schimmelcultures; UCD: University of California, Davis; WAC: Plant Pathology Culture Collection.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Caracterização Morfológica

Foram estudados aproximadamente 60 isolados de diferentes espécies de *Phoma* (Tabela 1). Com base nas características morfológicas dos isolados estudados foram identificadas 6 espécies de *Phoma*: *P. tarda*, *P. exigua* var. *exigua*, *P. exigua* var. *noackiana*, *P. costarricensis*, *P. herbarum*, *P. jolyana* var. *jolyana* e *P. leveillei* var. *microspora* (Tabela 3, Figura 1, 2 e 3).

*Phoma tarda* foi isolada apenas de tecidos com sintoma de mancha de phoma, apresentando ocorrência generalizada em todas as lavouras cafeeiras estudadas. Possui como principal característica a formação de septos no conídio *in vivo* e *in vitro*, o que é característica chave para a Seção *Phyllostictoides*.

*In vivo*, os picnídios de *P. tarda* são castanho-claros com células escuras ao redor do ostíolo, imersos a erupente no tecido do hospedeiro. Os conídios apresentam de 5 a 95% de septação.

*Phoma exigua* var. *exigua*, *P. herbarum*, *P. jolyana* var. *jolyana*, *P. leveillei* var. *microspora* foram obtidas de hastes e folhas de plantas assintomáticas. Entretanto, *P. exigua* var. *noackiana* e *P. costarricensis* foram isoladas de folhas com sintomas de mancha de phoma.

### 3.2 Caracterização Molecular

#### 3.2.1 Análise das seqüências

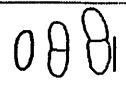
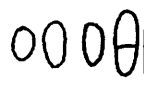
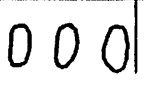
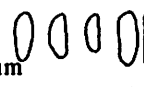

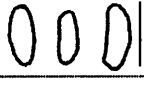
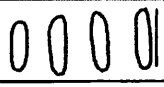
Fragmentos do gene que codifica a  $\beta$ -tubulina e região ITS do rDNA foram amplificados e seqüenciados para *P. tarda*, *P. exigua* var. *noackiana*, *P. exigua* var. *exigua* e *P. costarricensis* (Tabela 1). As mesmas regiões do DNA foram amplificadas e seqüenciadas para isolados de referência das espécies *P. tarda*, *P. exigua* var. *noackiana*, *P. exigua* var. *exigua*, *P. jolyana*, *P. herbarum*

e *P. costarricensis* obtidos da coleção de culturas do CBS. Sequências representativas das espécies do gênero *Phoma* foram obtidas do GenBank (Tabela 1).



**FIGURA 1** - A-B Sintomas de mancha de phoma em folhas coletadas no campo, C Sintomas de macha foliar e queda de folhas em mudas causadas por *P. tarda*, D-E Pícnidios de *P. tarda* em haste e folha de café, F Colônia de *P. tarda* em meio de aveia e malte, e G *P. exigua* var. *exigua* em malte com mancha resultante da reação com NaOH.

TABELA 3 - Características de espécies de *Phoma* associadas ao cafeeiro.

| Seção/Espécie                             | Patogenicidade | Picnídio | Colônia  | Diâmetro em 7 dias | Teste NaOH | Clamidósporo   | Conídios  |
|---|----------------|----------|--|--------------------|------------|--|---|
| <b>Seção <i>Phyllostictoides</i></b>      |                |          |  |                    |            |  |   |
| <i>P. tarda</i>                           | +              | liso     | cinza escuro variável  | 75 - 80 mm         | -          | ausente  | oblongos; uni e bicelular<br>(4-)5-7(-10) x 2-3 μm   |
| <i>P. exigua</i><br>var. <i>noackiana</i> | +              | piloso   | cinza escuro flocoso   | 70 - 85 mm         | -          | ausente  | oblongo uni e bicelular<br>(3-)5-7(-8) x 2-3 μm      |
| <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>       | -              | liso     | verde oliva a cinza com tufos de micélio branco esparsos na colônia, margem lobada | 60 - 70 mm         | +          | ausente  | elipsóide; uni e bicelular<br>6-8 x 3-4 μm  |
| <b>Seção <i>Phoma</i></b>                 |                |          |  |                    |            |  |   |
| <i>P. costarricensis</i>                  | +              | liso     | cinza claro-escuro cottonoso   | 70 - 80 mm         | -          | ausente  | oval; unicelular<br>3-5 x 2-3 μm                     |
| <i>P. herbarum</i>                        | -              | liso     | salmão - branca  | 50 - 65 mm         | +          | ausente  | cilíndrico; unicelular<br>(3-)5-7(-10) x 1,5-2,0 μm  |
| <b>Seção <i>Peyronellaea</i></b>          |                |          |  |                    |            |  |   |
| <i>P. jolyana</i> var. <i>jolyana</i>     | -              | liso     | marrom   | 30 - 50 mm         | -          | multicelular  | cilíndrico; unicelular<br>3-6 x 1-2 μm               |
| <b>Seção <i>Paraphoma</i></b>             |                |          |  |                    |            |  |   |
| <i>P. leveillei</i>                       | -              | setoso   | verde acinzentado  | 20 - 25 mm         | -          | ausente  | fusiforme; unicelular<br>4-5 x 1,0-1,5 μm           |

\* barra conídios = 5 μm; barra clamidósporo = 10 μm



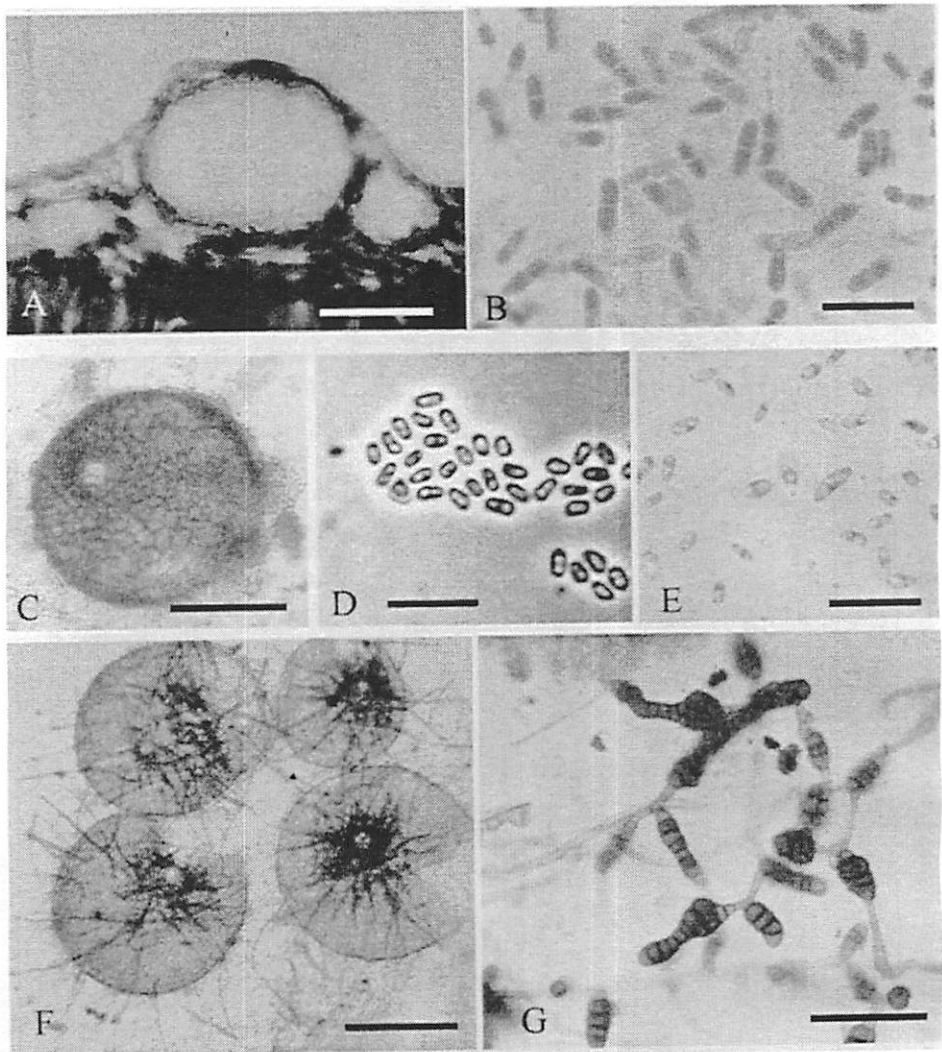


FIGURA 2 - A Corte transversal de picnídio com células conidiogênicas, *in vivo*; B Conídios *P. tarda* *in vitro* uni ou bicelulares; C picnídio característico de *P. costarricensis*, *in vitro*; D conídios de *P. costarricensis*, *in vitro*; E conídios de *P. exigua* var. *exigua*, *in vitro*; F picnídios setosos de *P. leveillei* var. *microspora*, *in vitro*; e G Clamidósporos típicos de *P. jolyana* var. *jolyana*, *in vitro*. Barra picnídios 100  $\mu$ m; barra conídios 10  $\mu$ m; barra clamidósporos 20  $\mu$ m.

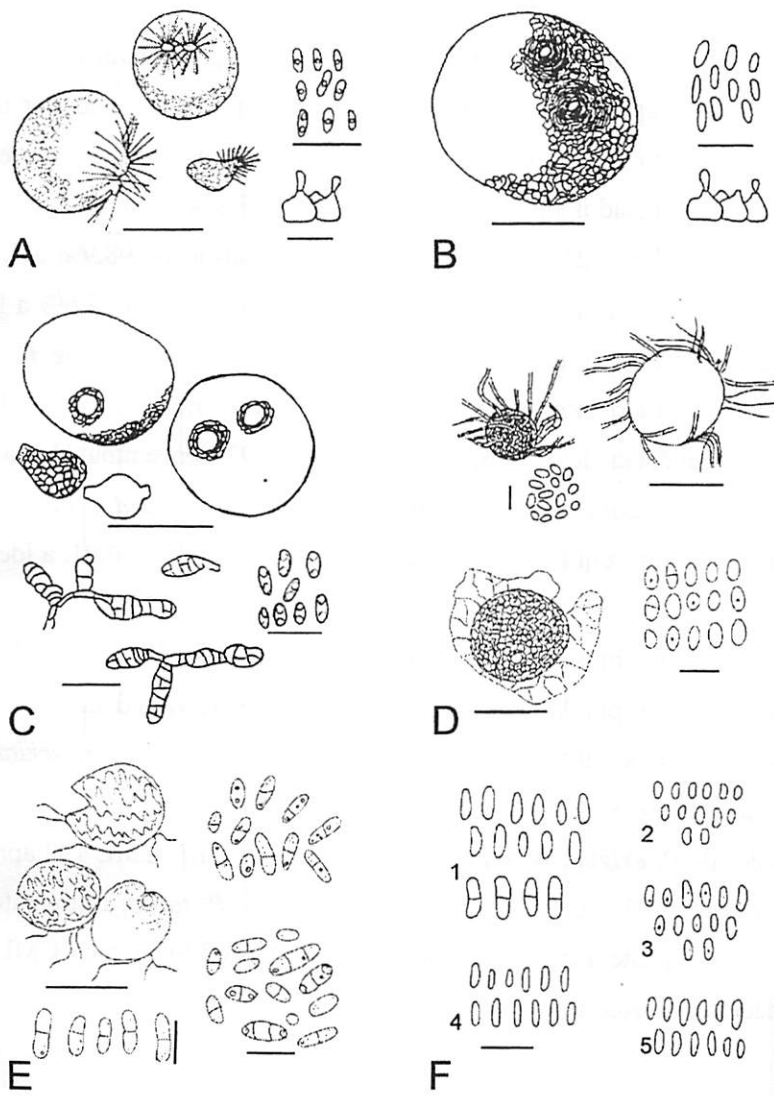


FIGURA 3 - A *Phoma leveillei* var. *microspora*, picnídio com setas, barra 40  $\mu$ m; conídios e célula conidiogênica; B. *P. herbarum*, picnídio, barra 40  $\mu$ m; conídios e célula conidiogênica; C. *P. jolyana* var. *jolyana*, picnídio, barra 50  $\mu$ m, dictioclamidósporos e conídios; D. *P. exigua* var. *noackiana*, picnídios erupcentes envolvidos por micélio, barra 5 e 50  $\mu$ m, conídios uni- ou bicelulares; E. *P. tarda*, picnídios barra 50  $\mu$ m, conídios com um ou mais septos; e F. Forma dos conídios. 1 *P. tarda*, 2 *P. costarricensis*, 3 *P. jolyana* var. *jolyana*, 4 *P. leveillei*, 5 *P. herbarum*. Barra conídios e célula conidiogênica 10  $\mu$ m. Desenhos: Mirian Salgado.

Os fragmentos seqüenciados de *β-tubulina* apresentaram ~340 pb. As seqüências das espécies de *Phoma* do cafeeiro foram comparadas por meio de BLAST no banco de dados do NCBI. A identidade de nucleotídeos entre as seqüências dos isolados de *P. exigua* CML 324, CBS 431.74 e *P. tarda* CML 193, 326, 334, 716, 721, CBS 119730 e 109183 variou de 98,9% a 100%. O isolado de *P. exigua* var. *noackiana* CBS 101203 apresentou 98,6% a 99% de identidade em relação às seqüências de *P. tarda* e variedades de *P. exigua*, enquanto *P. costarricensis* CBS 506.91 apresentou menor identidade, 95,8% a 96,5%. A seqüência de *P. costarricensis* CML 192 apresentou identidade de 98,9% a 100% com variedades de *P. exigua* e *P. tarda*, enquanto, na comparação com a seqüência do isolado de referência CBS 506.91, a identidade foi de 96,5%.

Os fragmentos seqüenciados da região ITS do DNA ribossomal apresentaram ~510 pb. A identidade de seqüências entre variedades de *P. exigua* e *P. tarda* variou de 99,5% a 100%. O isolado de *P. exigua* var. *noackiana* CBS 101203 apresentou 99,5% de identidade em relação às seqüências de *P. tarda* e variedades de *P. exigua*. A seqüência de *P. costarricensis* CML 192 apresentou identidade de 100% com variedades de *P. exigua* e *P. tarda*. Entretanto, ao se comparar a seqüência do isolado de referência CBS 506.91 com CML 192, a identidade foi de 96,6%.

### 3.2.2 Filogenia

As seqüências obtidas no presente estudo foram inseridas em um alinhamento para *β-tubulina* e outro para ITS, com seqüências de espécies de *Phoma* recuperadas no Genbank. Seqüências de *Botryosphaeria* spp. foram utilizadas para enraizar as árvores.

Após a análise de máxima parcimônia foram obtidas árvores para as duas regiões (Figuras 4 e 5). Foram obtidas 10 árvores para a *β-tubulina* e 4

árvores para ITS. Os agrupamentos observados para ambas as regiões foram similares. De modo geral, a árvore de  $\beta$ -tubulina apresentou maior resolução do que a árvore de ITS. Em ambas as árvores os isolados de *P. tarda* agruparam juntamente com *P. exigua*. Para  $\beta$ -tubulina, o grupo formado por isolados de *P. tarda* e variedades de *P. exigua* teve suporte de 52% na análise de *bootstrap*, enquanto, para ITS, o suporte foi de 80%.

O isolado de *P. exigua* var. *noackiana* CBS 101203 agrupou próximo ao grupo formado por variedades de *P. exigua* e *P. tarda*, com suporte de 77% na árvore de  $\beta$ -tubulina. Por outro lado, na árvore de ITS esta variedade formou um grupo com *P. tarda* e as outras variedades de *P. exigua*. O isolado de *P. costarricensis* CBS 506.91 formou, também, um grupo único próximo a variedades de *P. exigua*, tendo 57% de suporte na análise de *bootstrap*. O isolado de *P. jolyana* CBS 463.69 formou um agrupamento distinto, 77% de suporte, próximo a *P. pinodella* na árvore de  $\beta$ -tubulina, e um grupo próximo a *Didymella pinodes* e *D. applanata* para a região ITS. Por outro lado, a *P. herbarum* CBS 615.75 formou um grupo único com *P. herbarum* obtido do Genbank para  $\beta$ -tubulina, com 98% de suporte para  $\beta$ -tubulina e 73% para região ITS.

### 3.3 Patogenicidade

Os isolados de *Phoma tarda* utilizados no teste de patogenicidade causaram manchas foliares, queda de folhas e podridão de haste (Figura 1C). Entretanto, os isolados de *P. exigua* var. *exigua*, *P. exigua* var. *noackiana*, *P. herbarum*, *P. costarricensis*, *P. jolyana* não foram patogênicos. O reisolamento dos fungos foi realizado a partir de picnídios presentes nas lesões foliares.

## Árvore de MP para $\beta$ -tubulina

304 caracteres  
1 de 10 árvores  
Comprimento 188  
CI 0,835  
RI 0,847  
HI 0,165

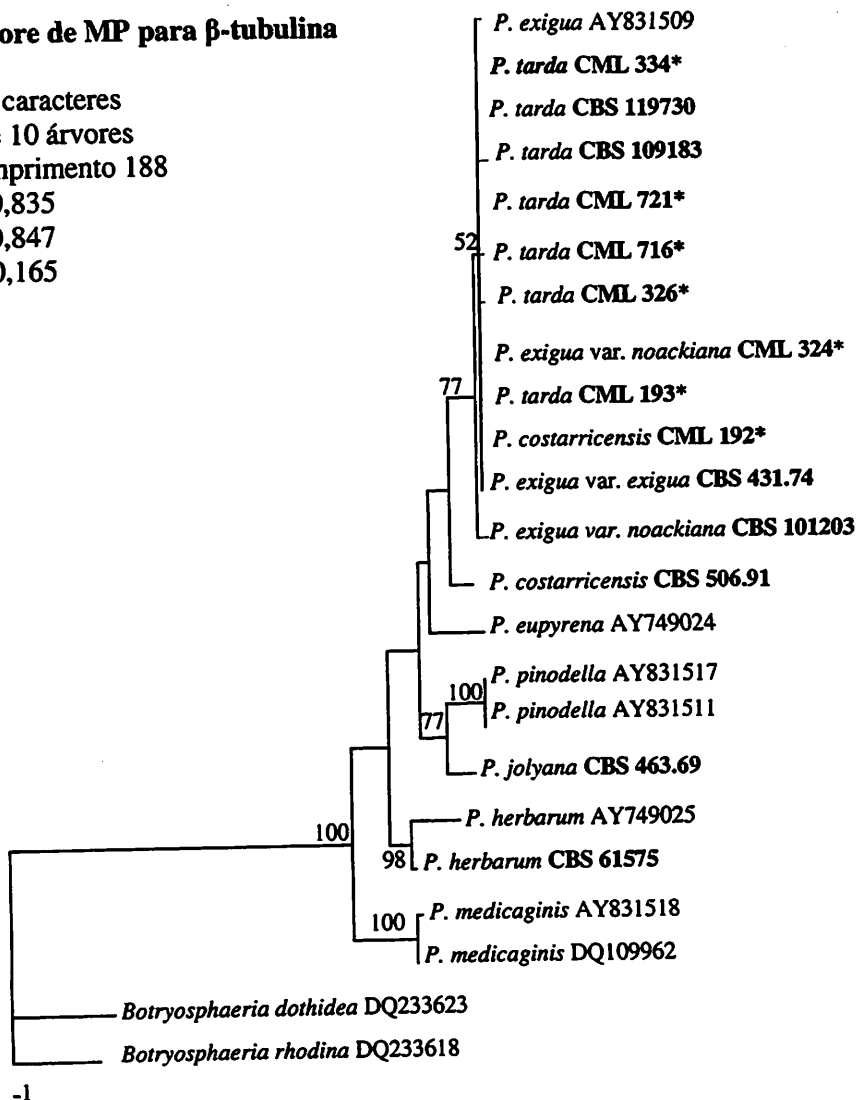


FIGURA 4 - Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene da  $\beta$ -tubulina de espécies de *Phoma*, incluindo isolados de mancha de phoma do cafeeiro do Brasil (\*). O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *Botryosphaeria rhodina* e *B. dothidea*. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; CBS = *Centraalbureau voor Schimmelcultures*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

**Árvore de MP para a região  
ITS do DNA ribossomal**

460 caracteres  
1 de 4 árvores  
Comprimento 204  
CI 0,902  
RI 0,873  
HI 0,098

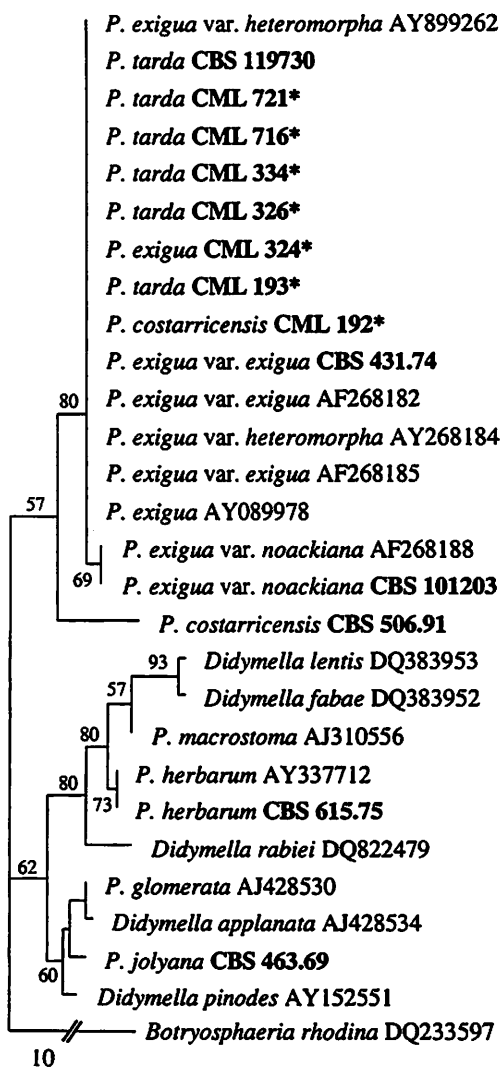


FIGURA 5 - Árvore filogenética de máxima parcimônia para a região ITS do DNA ribossomal de espécies de *Phoma*, incluindo isolados de mancha de phoma do cafeeiro do Brasil (\*). O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem nos internódios. Esta árvore tem como raiz *Botryosphaeria rhodina*. Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras; CBS = *Centraalbureau voor Schimmelcultures*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

## 4 DISCUSSÃO

Este é, no entanto, o primeiro estudo da filogenia dos fungos do complexo *Phoma/Ascochyta* associado ao cafeeiro. Este trabalho teve o mérito de confirmar que *Ascochyta coffeae* e *Phoma tarda* correspondem à mesma espécie responsável pela mancha de phoma do cafeeiro.

*Ascochyta coffeae* foi descrita por Henning, em 1902, associada a folhas de cafeeiros coletadas no município de São Paulo. Em 1957, Stewart descreveu o agente etiológico da mancha de folha (*leaf blight*) e seca dos ponteiros (*stem dieback*) do cafeeiro na Etiópia como *Ascochyta tarda*. Mais tarde, Firman (1965) e Vermeulen (1979) identificaram *A. tarda* como o mesmo agente etiológico da doença em cafezais no Quênia.

Figueiredo et al. (1976) compararam caracteres morfológicos, fisiológicos e sorológicos de culturas de *A. coffeae* isoladas em São Paulo com uma cultura de *A. tarda* isolada por Firman, no Quênia, e concluíram que se tratava de *A. coffeae*.

Diversas contribuições ao gênero *Phoma* foram publicadas nas últimas quatro décadas, o que culminou com a publicação do “Manual de Identificação de *Phoma*” (Boerema et al., 2004). Nesta publicação, os autores indicam *A. tarda*, *A. coffeae*, *Phoma coffeae* e *Macrophoma coffea* como sinônimos de *P. tarda*, o agente etiológico da mancha *Phoma* do cafeeiro.

No presente estudo observou-se que *P. tarda* tem ocorrência generalizada nas lavouras cafeeiras do sul de Minas e do sudoeste da Bahia, e que as espécies *P. exigua* var. *exigua*, *P. herbarum*, *P. jolyana* var. *jolyana* e *P. leveillei* var. *microspora* também ocorrem, mas em menor frequência. Os postulados de Koch foram completados com sucesso, mas apenas para isolados de *P. tarda* com a reprodução dos sintomas da mancha de phoma do cafeeiro.

Devido à alta frequência com que esta espécie foi recuperada de lesões de mancha de phoma, postula-se que este é o principal agente etiológico da mancha de phoma do cafeeiro.

As características morfológicas dos isolados de *P. tarda* estudados são semelhantes às descritas por Stewart (1957), sendo a principal característica a formação tardia de septo no conídio, o que levou anteriormente à identificação dos isolados dessa espécie no Brasil como pertencentes ao gênero *Ascochyta*.

Atualmente, o seqüenciamento de regiões conservadas do DNA que contém informações sobre a história evolutiva dos organismos contribui consideravelmente na caracterização de populações que apresentam poucos marcadores morfológicos e na detecção de sua relação de parentesco. As análises das seqüências permitem, ainda, a reconstrução da filogenia. Neste estudo foram utilizados fragmentos de beta tubulina e DNA ribossômico para determinar a filogenia do agente etiológico da mancha de phoma do cafeeiro, *P. tarda* e de outras espécies de *Phoma* associadas ao cafeeiro.

Os isolados identificados morfológicamente como *P. tarda*, e que causaram sintomas típicos de mancha de phoma em mudas de cafeeiro, e os isolados identificados como *P. exigua* var. *exigua* agruparam-se juntamente com isolados de referência desta variedade nas árvores de beta tubulina e da região ITS do rDNA. Este agrupamento mostra a relação estreita entre *P. tarda* e *P. exigua*, que não puderam ser diferenciadas com estas duas regiões do genoma. Provavelmente, a distância genética entre *P. tarda* e variedades de *P. exigua* é muito pequena e regiões mais variáveis do genoma devem ser utilizadas para a separação dessas espécies. Outra hipótese é de que *P. tarda* e *P. exigua* correspondem à mesma espécie filogenética. A análise de seqüências das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 não permitiu a discriminação entre diferentes variedades de *P. exigua* e nem entre *Didymella lycopersici* e *P. foveata* (Abeln et al., 2002). Mais



uma vez observa-se que essa região não apresenta resolução para espécies muito próximas. *Phoma exigua* apresenta distribuição cosmopolita e ocorre em mais de 200 hospedeiros. O fungo pode ocorrer como patógeno de plantas causando necrose em folhas e hastes, podridão de raízes e tubérculos ou como saprófita.

*Phoma costarricensis* foi descrita inicialmente a partir de isolados associados à queima da parte aérea do cafeeiro na Costa Rica, sendo posteriormente relatada na Colômbia, Nicarágua e Índia. O isolado CML 192, coletado em Minas Gerais, apesar de apresentar características morfológicas semelhantes a esta espécie, não agrupou na análise filogenética utilizando beta tubulina e ITS com o isolado de referência de *P. costarricensis* CBS 506.91 coletado na Nicarágua, evidenciando que este isolado não pertence a esta espécie. Por outro lado, o isolado CML 192 parece pertencer à espécie *P. exigua* com a qual agrupou. De acordo com Boerema et al. (2004), a espécie *P. exigua* apresenta grande variação na morfologia, o que pode explicar o fato de este isolado não apresentar septo, uma das características chave de *P. exigua*. Portanto, é necessária uma avaliação mais criteriosa da sobre a real ocorrência de *P. costarricensis* em outras regiões cafeeiras do Brasil.

Espécies do gênero *Phoma* compreendem importantes fitopatógenos em várias espécies cultivadas em todo o mundo. Algumas são saprófitos e oportunistas, podendo também ser encontradas como endófitos. Durante muitos anos a caracterização de espécies nesse gênero foi realizada com base em marcadores morfológicos e fisiológicos. Estudos da conidiogênese foram fundamentais para estabelecer as diferenças entre os gêneros *Phoma* e *Ascochyta*. Atualmente, a sistemática filogenética tem sido de grande valia na determinação das relações de parentesco entre os organismos e para a definição de espécies em fungos. Através do conhecimento do parentesco entre os fungos, novas fronteiras são abertas nos estudos das relações entre patógenos e hospedeiros. Neste estudo provou-se que *P. tarda* é o principal agente etiológico

da mancha *Phoma* do cafeeiro no Brasil, e que esta espécie traz estreita relação com *P. exigua*. Outras regiões do genoma devem ser seqüenciadas e utilizadas em estudos filogenéticos para determinar se *P. tarda* e *P. exigua* correspondem à mesma espécie filogenética. Adicionalmente, estudos de inoculação cruzada com isolados de *P. exigua* de vários hospedeiros devem ser realizados. Finalmente, estudos de compatibilidade sexual serão de grande importância para determinar se existe isolamento reprodutivo entre *P. exigua* e *P. tarda* e se este é o principal mecanismo de geração de variabilidade para o agente causal de uma das principais doenças do cafeeiro no Brasil.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELN, E. C. A.; STAX, A. M.; GRUYTER J. de; AA, H. A. van der. Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 4, p. 419–427, Apr. 2002.
- BALMAS, V.; SCHERM, B.; GHIGNONE, S.; SALEM, A. O. M.; CACCIOLA, S. O.; MIGHELI, Q. Characterization of *Phoma tracheiphila* by RAPD-PCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of specific primers for in planta PCR detection. **European Journal of Plant Pathology**, v. 111, n. , p. 235–247, Mar. 2005.
- BOEREMA, G. H.; BOLLEN G. J. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. **Persoonia**, Leiden, v. 8. n. 2, p. 111-144, 1975.
- BOEREMA, G. H.; GRUYTER, J. de; NOORDELOOS, M. E.; HAMERS, M. E. C. ***Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture**. Wallingford: CAB International, 2004. 470 p.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. **Journal of Tropical Medicine and Higiene**, Oxford, v. 70, n. 8, p. 181-184, Aug. 1967.
- CARVALHO, V. L. de; SOUZA, S. M. C. de; SALGADO, M. **Alguns aspectos da *Phoma* e *Ascochyta* do cafeeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. (EPAMIG. Circular Técnica, n. 84).
- ECHANDI, E. La quema de los cafetos causada por *Phoma costarricensis* n. sp. **Revista de Biologia Tropicale**, San Jose, v. 5, n. 1, p. 81-102, 1957.
- FERNANDEZ, B. O. Muerte descendentes de los brotos del cafeto causado por espécies de *Phoma* e *Colletoreichum*. **Cenicafé**, Caldas, n. 3, p. 127-140, jul./sept. 1961.
- FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P. R.; FIGUEIREDO, M. B. *Ascochyta coffeae* P. Henn. agente causal de uma nova doença dos viveiros de café no Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 211-213, jul./ago. 1975/1976.

- FIRMAN, I. D. Some investigations on disease of *Coffea arabica* caused by *Ascochyta tarda*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 48, n. 2, p. 161-166, 1965.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. D. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, Apr. 1995.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/Me/XP/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 95-98, 1999.
- HENNINGS P. Fungi S. Paulenses II. a cl. Puttemans collecti. **Hedwigia**, Desdren, v. 41, p. 295-311, 1902.
- IRINYI, L.; KÖVICS, G. J.; RAI, M. K.; SÁNDOR, E. Studies of evolutionary relationships of *Phoma* species based on phylogenetic markers. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION SYMPOSIUM AT DEBRECEN UNIVERSITY, 4., 2006, Hungary. **Proceedings...** Hungary, 2006.
- MACDONALD, J. E.; WHITE, G. P.; CÔTÉ, M. J. Differentiation of *Phoma foveata* from *P. exigua* using a RAPD generated PCR-RFLP marker. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 67-75, Jan. 2000.
- MÖLLER, E. M.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, Nov. 1992.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 465-493, May/June 1998.
- PFENNING, L. H.; SALGADO, M.; ALMEIDA, A. R.; PEREIRA, R. T. G. Estação Perigo - *Phoma* do cafeeiro. **Cultivar: Grandes Culturas**, Pelotas RS, v. 6, n. 79, p. 12-16, nov. 2005.
- RAJENDRAN, C.; AHMED, A.; RAO, M. Coffee Blight - A new disease of coffee in India. **Journal of Coffee Research**, Balehonnur, v. 13, n. 2, p. 35-39, 1983.

RAMIRO GÓMES, Q.; ELKIN BUSTAMANTE, A. Influencia de la luz y la temperatura em el desarrollo de la muerte descendente del cafeto causado por *Phoma* sp. **Fitopatología Colombiana**, Santa Fe de Bogota, v. 6, n. 1, p. 7380, 1977.

REDDY, P. V.; PATEL, R.; WHITE JUNIOR, J. F. Phylogenetic and developmental evidence supporting reclassification of cruciferous pathogens *Phoma lingam* and *P. wasabiae* in genus *Plenodomus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 11, p. 1916-1922, Nov. 1998.

STEWART, R. B. Leaf blight and stem dieback of Coffee caused by undescribed species of *Ascochyta*. **Mycologia**, New York, v. 49, n. 3, p. 430-433, 1957.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. (eds.) **PCR protocols: A guide to methods and application**. Academic Press, New York, p. 315-322. 1990.

VERMEULEN, H. **Coffee Berry disease in Kenya**. 1979. 113 p. (Thesis Agric) - University of Wageningen, Netherland.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho consta de levantamento da comunidade de fungos endófitos e de espécies de *Phoma* associadas ao cafeeiro. Comprovou-se que existe grande diversidade de fungos associados a este hospedeiro. O sistema de cultivo orgânico mostrou-se mais rico em espécies e apresentou maior taxa de colonização dos tecidos comparado com o sistema convencional. Possivelmente, os endófitos desempenham importante função na proteção do cafeeiro contra patógenos, a exemplo do cacauzeiro (Arnold et al., 2003). Entretanto, estudos sobre a natureza da interação ainda precisam ser realizados.

*Pseudohalonectria lutea* e *Staninwardia* sp. são relatados pela primeira vez associados ao cafeeiro. *Staninwardia* sp. é uma espécie nova que ainda precisa ser caracterizada e identificada.

Três morfotipos de *Colletotrichum gloeosporioides* foram descritos e provavelmente representam espécies biológicas distintas. Portanto, deve-se recorrer à caracterização molecular e a cruzamentos na tentativa de esclarecer esse complexo de morfoespécies dentro do gênero. Para o estudo da interação fungo-planta, o uso de isolados geneticamente modificados com marcadores fluorescentes pode fornecer novas informações a respeito dessa intrigante associação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e cafeeiro.

Neste estudo, provou-se que *P. tarda* é o principal agente etiológico da mancha phoma do cafeeiro no Brasil, e que esta espécie traz estreita relação com *P. exigua*. Outras regiões do genoma devem ser sequenciadas e utilizadas em estudos filogenéticos para determinar se *P. tarda* e *P. exigua* correspondem à mesma espécie filogenética. Adicionalmente, estudos de inoculação cruzada com isolados de *P. tarda* e *P. exigua* em vários hospedeiros devem ser realizados. Estudos de compatibilidade sexual serão de grande importância para

determinar se existe isolamento reprodutivo entre *P. exigua* e *P. tarda* e se este é o principal mecanismo de geração de variabilidade para o agente causal de uma das principais doenças do cafeeiro no Brasil.

Deve-se ainda fazer levantamento mais abrangente para verificar se *P. costarricensis* ocorre no Brasil e se *P. exigua* var. *naockiana* ocorre em lavouras de café consorciadas com feijoeiro.

