

ASPECTOS BIOLÓGICOS E TAXONÔMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Colletotrichum*

MARIA MENEZES

Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, Pernambuco

RESUMO

ASPECTOS BIOLÓGICOS E TAXONÔMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Colletotrichum*

Os fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* e seu teleomorfo *Glomerella* são considerados importantes fitopatógenos, amplamente disseminados, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Eles causam doenças, economicamente importantes, comumente conhecidas como antracnoses. Para identificação das espécies têm sido usados critérios clássicos, baseados principalmente na morfologia dos conídios. Critérios adicionais têm incluídos danos causados e a identidade do próprio hospedeiro. Deste modo, foram descritas inúmeras espécies de *Colletotrichum*. O sistema de identificação baseado, exclusivamente, em critérios morfológicos ou cultural, ou uma combinação de ambos, apresenta limitações por não permitir a identificação de raças fisiológicas. Também, apresenta valor limitado, quando se trata da diferenciação de isolados pertencentes a uma espécie complexa, como *C. gloeosporioides*, principalmente quando é exigido grau de certeza, para uso nos programas de melhoramento de plantas visando resistência de plantas e, também, procedimentos de quarentena. Portanto, o conceito de espécies em *Colletotrichum* é de considerável importância prática, sendo desejável a integração de métodos morfológicos e não morfológicos para identificação correta de espécies e subespécies.

Termos para indexação: taxonomia, *Colletotrichum*, biologia, morfologia, antracnose, fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

BIOLOGICAL AND TAXONOMICAL ASPECTS ON SPECIES OF *Colletotrichum* GENUS

Filamentous fungi from the genus *Colletotrichum* and its teleomorph *Glomerella* are considered important plant pathogens worldwide, especially in tropical and subtropical regions. They cause economically significant diseases

commonly known as anthracnoses. To identify the species has been used classical criteria based mostly on morphology, especially conidial shape and size. Additional criteria have included type of damage and the identity of the host itself. On this basis several hundred species have been described in *Colletotrichum*. The identification systems based exclusively on morphological or cultural criteria, or a combination of both, have many limitations because do not allow to identify the races at the physiological level. Also, to identify an isolate as belonging to a species complex, such as *C. gloeosporioides*, is of limited value, when breeding plants resistant programmes and quarantine procedures require this type of accuracy. However, the species concepts in *Colletotrichum* is a matter of considerable importance, and it is desirable the integration of morphological and non-morphological methods to identify species and strains below the species level.

Index terms: taxonomy, *Colletotrichum*, biology, morphology, anthracnose, phytopathogenic fungi.

1. O GÊNERO *COLLETOTRICHUM*

O gênero *Colletotrichum* Corda (Teleomorfo: *Glomerella* Stonem.) apresenta um amplo “Curriculum” envolvendo a sua história taxonômica e biológica. Foi estabelecido por Corda, em 1831, sendo caracterizado por frutificações setosas, denominadas acérvulos, nas quais conídios hialinos são produzidos em massa alaranjada ou creme. Inicialmente, houve confusão entre *Colletotrichum* e *Vermicularia* Tode, descrito em 1790. Este último gênero, muito mais antigo, havia sido revalidado por Fries, em 1825, cuja característica principal era a presença de corpos de frutificação semelhantes a estroma. Em 1884, Saccardo considerou os corpos de frutificação de *Vermicularia* como sendo uma fase de desenvolvimento do acérvulo de *Colletotrichum*. Por outro lado, em 1849, já havia sido descrito o gênero *Gloeosporium* Desm. & Mont., também muito semelhante a *Colletotrichum*, porém não produzia setas no acérvulo. Assim, por conta desta característica, o agente da antracnose da banana, durante muito tempo, foi colocado no gênero *Gloeosporium*, sendo então denominado *Gloeosporium musarum* Cooke & Massie. Entretanto, como a formação de setas não é uma característica estável, variando de acordo com as condições do ambiente físico e nutricional, deixou de ser um critério de valor taxonômico, para separação dos gêneros *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. Deve ser ressaltado que em isolados de *Colletotrichum*, particularmente, *C. gloeosporioides*, a produção de setas no acérvulo pode

variar de abundante, rara ou ausente, em meio de BDA (batata–dextrose–ágar), sob temperatura de 25 °C (Menezes & Hanlin, 1996 a).

Numa tentativa de elucidar a incerteza taxonômica de *Colletotrichum*, von Arx (1957 a,b), em suas revisões, concluiu que muitas espécies fúngicas incluídas nos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium* pertenciam a um mesmo gênero, tendo então decidido conservar o nome *Colletotrichum* contra *Vermicularia*, rejeitando o nome *Gloeosporium*. Desse modo, o conceito genérico de *Colletotrichum* foi ampliado, porém o número de espécies, em torno de 750, naquela época, ficou reduzido para 11, com base em caracteres morfológicos, sendo as formas especiais ou variedades denominadas com base no hospedeiro. Dentre as 11 espécies, merece destaque *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Sacc. com mais de 600 sinonímias, sendo então selecionada para representar a fase anamórfica de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk, por ser amplamente conhecida e bastante disseminada na natureza.

Com a realização de estudos mais detalhados sobre morfologia, caracteres culturais, patogenicidade, além de outros, o número de espécies de *Colletotrichum* foi gradualmente aumentando. Sutton (1980) apresentou uma chave de 22 espécies com excelente sumário sobre suas características morfológicas e sinonímias. Posteriormente, Sutton (1992) baseado em estudos mais detalhados envolvendo morfologia, caracteres culturais e capacidade patogênica, esse número foi elevado para cerca de 40 espécies aceitas. Algumas delas são mais específicas a determinados hospedeiros, citando-se como exemplo, *C. lindemuthianum* (Sacc.& Magnus) Briosi & Cavara, a leguminosas, principalmente a feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), *C. musae* (Berk. & Curt) von Arx, a frutos de bananeira (*Musa* spp.), enquanto que outras, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* Simmonds, podem ocorrer em diferentes famílias de hospedeiros. Neste sentido, é importante dizer que uma simples espécie pode causar doença em vários hospedeiros, como também, um único hospedeiro pode ser atacado por várias espécies de *Colletotrichum*, as quais induzem sintomas semelhantes aos da antracnose. Neste último caso, a identificação da espécie e/ou espécies, somente com base morfológica, torna-se um tanto difícil, devido a variabilidade na expressão dos caracteres adotados, exigindo, portanto, a aplicação conjunta de outros métodos que possibilitem uma diferenciação correta.

2. CONSIDERAÇÕES BIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS

Nas espécies de *Colletotrichum* são encontradas formas saprofíticas e patogênicas, sendo estas últimas, responsáveis por doenças economicamente importantes, comumente denominadas de **antracnoses**, que ocorrem em extensa gama de hospedeiros. As plantas estão sujeitas a essa doença em todas as fases de desenvolvimento, e o patógeno pode ser disseminado de uma planta para outra por meio de vários agentes do ambiente aéreo. As sementes infectadas também podem disseminar o patógeno de uma área para outra e, quando semeadas, poderão transmiti-lo para plântulas, induzindo sintomas de damping-off de pré e pós-emergência. Para invadir o tecido hospedeiro, as espécies de *Colletotrichum* utilizam estratégias que variam de hemibiotróficos intracelular a necrotróficos subcuticular, desenvolvendo estruturas especializadas para penetrar no hospedeiro, como por exemplo, os apressórios. Com o processo de colonização do patógeno, nos tecidos da planta afetada, surgem os sintomas de antracnose, visíveis em folhas, inflorescências e frutos, sendo a doença mais severa em regiões tropicais e subtropicais.

As células conidiogênicas das espécies de *Colletotrichum*, geralmente são agregadas em conidiomata (acérvulos), como também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio. As setas e células conidiogênicas parecem ser homólogas. Em determinadas condições do ambiente, as setas podem produzir conídios na sua extremidade, como já observado em *C. gloeosporioides* e *C. gossypii* South. A presença de setas férteis e, portanto, com função semelhante a de um conidióforo fialídico, já foi relatada por alguns pesquisadores (Lenné *et al.*, 1984; Menezes & Hanlin, 1996 a).

Os conídios produzidos nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz, provavelmente, protege os conídios da dissecação, aumentando a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro. Segundo Mishra & Siradhana (1979), os conídios não constituem estruturas de sobrevivência, porque sua viabilidade diminui rapidamente. Entretanto, o micélio pode permanecer viável por longo período, em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda, em infecções latentes, aquelas onde as plantas não mostram sintomas. Contudo, a formação de microesclerócios por algumas espécies, como exemplo, *C. coccoades*, desempenha um importante papel na sobrevivência (Blakeman & Hornby, 1966).

A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa (>90%). Na extremidade do tubo germinativo do conídio

há formação de um apressório, estrutura esta, que pode também ser produzida na extremidade de hifas do micélio. Durante a formação do apressório há síntese de proteínas requerida para a produção de melanina que confere a cor escura (castanha) da estrutura, tornando-o infectivo. Há relatos de que os apressórios hialinos (sem cor) não são infectivos. Em geral, os apressórios são resistentes as condições adversas do ambiente, atuando como órgão de sobrevivência. No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia, ou ainda, um simples tubo germinativo, com potencial para produção de conídios fialídicos na sua extremidade, fato este já observado por Menezes & Hanlin (1996b), em *C. gloeosporioides*.

3. VARIABILIDADE E CONCEITO DE ESPÉCIES

Sabe-se que a variabilidade em fungos pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como, mutação, processo sexual, heterocariose e parassexualidade. Nelson (1963) discute a hibridização inter-específica como o mais significativo fenômeno biológico condicionando a variação e dirigindo a evolução de fungos, bem documentado entre linhagens de determinadas espécies, na produção de genótipos superiores em patogenicidade e fisiologia. Nos estudos tradicionais, a ocorrência de variabilidade fenotípica e genotípica em fungos pode ser detectada através da análise experimental, usando o método de cultivo monospórico, o que permite estabelecer os limites da variação morfológica. Neste sentido, a estabilidade de caracteres morfológicos, em condições variáveis de ambiente, é de fundamental importância na taxonomia. Em geral, há três passos envolvidos na delimitação morfológica de espécies: a análise, a designação ou julgamento e a síntese. A análise consiste na observação comparativa das diferenças e similaridades existentes entre espécies ou isolados de uma mesma espécie, em relação a características típicas. Nesta análise, é interessante o cultivo do fungo em diferentes substratos e condições padronizadas de ambiente, o que permite a detecção dos vários tipos culturais e morfológicos, possibilitando o estabelecimento dos limites de variação. Com base nas diferenças observadas na análise, o investigador faz o julgamento criterioso da espécie, permitindo a síntese, selecionar os tipos morfológicos comuns, separando-os de modo prático das demais espécies do gênero.

O conceito morfológico de *Colletotrichum* é difícil de definir e as espécies são delimitadas usando poucos caracteres, como tamanho e forma de conídios e tipos de apressórios (Cannon *et al.*, 2000). As formas intermediárias são comuns, devido a influência do ambiente na expressão dos caracteres. Na conidiogênese, os conídios produzidos em acérvulos são mais uniformes em tamanho, do que aqueles produzidos em conidióforos fialídicos, os quais apresentam formas mais variadas. Em geral, no processo de germinação, os conídios de *Colletotrichum*, originalmente unicelulares, podem formar um septo transversal, tornando-se bicelulares, após o núcleo sofrer uma divisão mitótica. Entretanto, Correl *et al.* (2000) observaram a ausência desse septo em conídios germinados de *C. orbiculare* (Berk. & Mont.) v. Arx [= *C. lagenarium* (Pass.) Ell & Halst.], de cucurbitáceas, *C. trifolii* Bain & Essary, de alfafa e *C. malvarum* (Braun & Casp.) Southw., de *Cida spinosa*. Com base na análise molecular, as espécies mencionadas mostraram estreita relação, tendo sido proposto por Sherriff *et al.* (1994) a designação de uma única espécie, ou seja, *C. orbiculare*, sendo as demais classificadas como “formas especiais” desta espécie. Por sua vez, semelhanças e diferenças também foram detectadas em isolados de uma mesma espécie de *Colletotrichum*, como exemplo, *C. gloeosporioides* (Menezes & Hanlin, 1996a), *C. graminicola* (Lima & Menezes, 2002), através de estudos morfológicos e isoenzimáticos.

Sabendo-se que uma espécie é constituída por uma população de biótipos e considerando a possibilidade desses biótipos apresentarem constituição genética diferente, envolvendo formas homozigotas ou heterozigotas, como também, haplóides ou diplóides, acredita-se que esta variabilidade será sempre exibida nos métodos adotados, dificultando em alguns casos, a interpretação correta de dados obtidos.

O conceito biológico de espécies envolve o cruzamento entre elas e a observação sobre a fertilidade. Segundo Nelson (1963), quando a progênie resultante do pareamento de populações com mecanismos reprodutivos semelhantes, mostra fertilidade normal, os isolados devem ser considerados da mesma espécie. Por outro lado, resultados de pareamentos estéreis indicam que as espécies envolvidas são distintas.

Conforme citado por Vaillancourt *et al.* (2000), as espécies de *Colletotrichum* que se reproduzem através do processo sexual, podem ser homotáticas (auto-fértil) ou heterotáticas (auto-estéril). Em *C. graminicola*, de milho, Vaillancourt & Hanau (1991) já haviam observado que um isolado homotático dessa espécie, pode originar progênies homotática e heterotática, mostrando assim o seu potencial de variabilidade.

No gênero *Glomerella* (teleomorfo de *Colletotrichum*), dentro de uma mesma espécie, alguns isolados podem ser de ambos tipos: auto-fértil e de fertilização cruzada, enquanto que outros, são de fertilização cruzada e auto-estéril. Também, um isolado auto-fértil pode originar progênie auto-estéril, com frequência relativamente elevada.

Devido a alta variabilidade das espécies de *Colletotrichum*, manifestada pela morfologia da colônia, forma dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características, a diferenciação de espécies de *Colletotrichum*, inter e intra-específica, pode ser feita por outros métodos não morfológicos, os quais ampliam a faixa de caracteres usados para identificá-las, devendo prover uma forma de estimar a diversidade genética e entender melhor a estrutura da população, notadamente a nível subespecífico.

A identificação taxonômica de espécies pelo método de compatibilidade vegetativa (VCG) é aplicável quando os isolados são compatíveis vegetativamente com linhagens bem definidas. O termo compatibilidade vegetativa refere-se a habilidade de espécies fúngicas sofrerem anastomose mútua, resultando numa fusão viável de células com núcleos de ambos os isolados em um citoplasma comum. Este termo contrasta com compatibilidade sexual. A anastomose de hifas é um fenômeno comum e o “status genético” da célula anastomosada reflete a relação genética dos núcleos componentes. Quando os núcleos são geneticamente idênticos, a fusão entre duas hifas da mesma cultura monoconidial, resulta numa célula homocariótica. Por outro lado, quando há anastomose de hifas dotadas de núcleos geneticamente diferentes, a célula resultante é heterocariótica.

Os trabalhos experimentais de compatibilidade vegetativa, aplicados ao gênero *Colletotrichum* (Katan, 2000), têm sido derivados de estudos similares realizados por diferentes pesquisadores (Puhalla, 1979; Puhalla & Hummel, 1983; Correll *et al.*, 1987; Leslie, 1993), envolvendo principalmente, *Fusarium* e *Verticillium*. Nestes estudos foram usados mutantes **nit**, caracterizados por não utilizarem nitrato (como única fonte de nitrogênio), mostrando também resistência a clorato. Os mutantes **nit** têm várias vantagens nos estudos de compatibilidade vegetativa, porque aparecem espontaneamente, podendo ser selecionados quando formam setores resistentes a clorato; podem crescer em meio mínimo, e os heterocários complementares são facilmente detectados, pelo crescimento do tipo selvagem (vigoroso). Já nos mutantes que não anastomosam, não haverá a formação do heterocário e, portanto, não será observado nenhum crescimento do tipo selvagem.

Os estudos com mutantes **nit** têm sido de grande valor para observação da ocorrência de compatibilidade entre espécies de *Colletotrichum*, e se essa compatibilidade for demonstrada com o uso de um isolado bem definido taxonomicamente, a espécie alvo será facilmente identificada.

Modernamente, várias técnicas têm sido postas em prática, como uma ferramenta auxiliar da taxonomia clássica de fungos. Dentre elas podem ser citadas: o uso de marcadores moleculares, principalmente, PCR, RAPD, RFLP (Williams *et al.*, 1990); padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas; atividade enzimática em substratos sólidos específicos ou líquidos (Paterson & Bridge, 1994). O desenvolvimento de métodos analíticos e de biologia molecular são também enfatizados por Frisvad *et al.* (1998) como importantes na quimiotaxonomia de fungos. Assim, além da análise de DNA e RNA, lipídios, carboidratos e proteínas, são também considerados os componentes da parede celular e, ainda, metabólitos primários e secundários. Atualmente, dentro dos fungos mitospóricos, onde estão incluídas as espécies de *Colletotrichum*, vários estudos quimiotaxonômicos têm sido realizados, objetivando a identificação correta das espécies.

Portanto, devido a plasticidade fenotípica apresentada pelas espécies do gênero *Colletotrichum*, a identificação e classificação, tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos, apresentam limitações. Para minimizar o problema, esforços devem ser aumentados para o uso integrado de métodos morfológicos e bioquímicos, visando estudos taxonômicos desse importante grupo de fungos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARX, J.A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Z.* 29:413–468. 1957a.

ARX, J.A. von. Revision der zu *Gloeosporium* Gestellten Pilze. *Verh. K. Ned. Akademie Wetenschappen Amst.* 51:1–153. 1957b.

BAILEY, J.A. & JEGER, M.J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford. C.A.B. International. 1992.

BLAKEMAN, J.P. & HORNBY, D. The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia and conidia. *Trans. British Mycol. Society* 49:227–240. 1966.

CANNON, P.F., BRIDGE, P.D. & MONTE, E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* Systematics. In: Prusky, D., Freeman, S. & Dickman, M.B. (Eds.). *Colletotrichum:*

Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction. St. Paul. APS Press. 2000. pp.1-19.

CORREL, J.C., KLITTICH, C.J.R. & LESLIE, J.F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646. 1987.

CORRELL, J.C., GUERBER, J.C., WASILWA, L.A., SHERRILL, J.F. & MORELOCK, T.E. Inter- and intra-species variation in *Colletotrichum* and mechanisms which affect population structure. In: Prusky, D., Freeman, S. & Dickman, M.B. (Eds.). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. St. Paul. APS Press. 2000. pp.145-178.

FRISVAD, J.C., BRIDGE, P.D. & ARORA, D.K. *Chemical Fungal Taxonomy*. New York. Marcel Dekker Inc. 1998. 398 p.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: Prusky, D., Freeman, S. & Dickman, M.B. (Eds.). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. St. Paul. APS Press. 2000. pp.45-56.

LENNÉ, J. M., THOMAS, D., ANDRADE, R.P. & VARGAS, A. Anthracnose of *Stylosanthes capitata*: Implications for future disease evaluations of indigenous Tropical pasture legumes. *Phytopathology* 74: 1070-1073. 1984.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. *Annual Rev. Phytopathology* 31:127-150. 1993.

LIMA, M.L.F. & MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos. *Fitopatologia Brasileira* 27:12-16. 2002.

MENEZES, M. & HANLIN, R.T. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from Northeastern Brazil. *Revista de Microbiologia* 27:228-236. 1996b.

MENEZES, M. & HANLIN, R.T. Apressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnoses diseases. *Revista de Microbiologia* 27:247-251. 1996a.

MISHRA, A. & SIRADHANA, B.S. Studies on the survival of sorghum anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) pathogen. *Phillippine Agriculture* 62:149-152. 1979.

NELSON, R.R. Interspecific hybridization in the fungi. *Mycologia* 55:104-123. 1963.

PATERSON, R.R.M. & BRIDGE, P.D. *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. Wallingford. C.A.C. International. 1994. 125 p.

- PUHALLA, J.E. Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterokarion incompatibility. *Phytopathology* 69:1186–1189. 1979.
- PUHALLA, J.E. & HUMMEL, M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 73:1305–1308. 1983.
- SHERRIFF, C., WHELAN, M.J., ARNOLD, G.M., LAFAY, J., BRYGOO, Y. & BAILEY, J.A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Exp. Mycol.* 18:121–138. 1994.
- SUTTON, B.C. *The Coelomycetes*. London. Commonwealth Mycological Institute. 1980. 696p.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Baile, J.A. & Jeger, M.J. (eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford. CAB International. 1992. pp.1–26.
- VAILLANCOURT, L.J. & HANAU, R.M. A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* from maize. *Phytopathology* 81:530–534. 1991.
- VAILLANCOURT, L.J., WANG, J. & HANAU, R.M. Genetic regulation of sexual compatibility in *Glomerella graminicola*. In: Prusky, D., Freeman, S. & Dickman, M.B. (Eds.). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host–Pathogen Interaction*. St. Paul. APS Press. 2000. p.29–44.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531–6535. 1990.