

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA, PATOGÊNICA E
GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*
gloeosporioides, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM
MANGA (*Mangifera indica* L.).**

Adriano Alves Pimenta

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho - 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA, PATOGÊNICA E
GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum
gloeosporioides*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM
MANGA (*Mangifera indica* L.).**

Adriano Alves Pimenta

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho - 2009

Pimenta, Adriano Alves
P644c Caracterização morfológica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)/ Adriano Alves Pimenta. – – Jaboticabal, 2009
xi, 79 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Antonio de Goes
Banca examinadora: Nelson Sidnei Massola Junior, Jaime Maia dos Santos

Bibliografia

1. Manga-controle integrado. 2. Manga-resistência varietal. 3. Manga-incidência. 4. Manga-sobrevivência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 634.441

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Adriano Alves Pimenta- nascido em 03 de Junho de 1976, em Barretos - SP, filho de Antonio Jaime Pimenta e Maria do Carmo Alves Pimenta, é Engenheiro Agrônomo formado pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU – de Uberlândia - MG, em 17 de Janeiro de 2000. Durante sua estada como acadêmico foi bolsista de Iniciação Científica pelo Programa PIBIC/CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por três anos. De 2000 a 2003 foi Engenheiro Agrônomo regional da Sucocítrico Cutrale e, entre 2004 e 2006 atuou como consultor técnico. No ano de 2007 ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, no Departamento de Fitossanidade da UNESP (Universidade Estadual Paulista), Campus de Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

**A minha esposa Ivy
OFEREÇO COM
AMOR E ETERNA
GRATIDÃO**

**Aos meus pais “Maria do Carmo Alves Pimenta” e
“Antonio Jaime Pimenta” e aos meus irmãos
Andréia e Anderson
DEDICO COM CARINHO E AFETO**

**Ao professor
Antonio de Goes
A MINHA
ADMIRAÇÃO
E O MEU RESPEITO**

JESUS CRISTO: meu caminho, minha verdade e minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado oportunidade de vencer mais uma etapa importante em minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio de Goes, pela amizade, dedicação, perseverança e alegria no trabalho, refletidos sob forma de orientação, espírito de luta, fé e ensinamentos constantes, que, sobretudo, possibilitou a realização desta pesquisa e em mais um passo muito importante em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os colegas (Davi, Ester, Andressa, Marcelo, Elton, Fernanda, Roberta e André) do Departamento de Fitossanidade, que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos, atenção e auxílio nos trabalhos executados.

Aos produtores de manga do Estado de São Paulo que contribuíram com esta pesquisa.

À BR3 Tecnologia e Indústria, em especial ao diretor Rodrigo Perez, por contribuir com condições para a continuidade de minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, assim como à Rosângela pelo auxílio nos trabalhos executados.

OBRIGADO

SUMÁRIO

	Página
SUMMARY.....	x
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A manga no Brasil	4
2.2. A manga no Estado de São Paulo	5
2.3. Antracnose, a principal doença da mangueira	6
2.4. Caracterização morfológica, molecular e patogênica	11
2.5. Sobrevivência de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em restos culturais	15
2.6. Incidência de antracnose em frutos de mangueiras no Estado de São Paulo	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Obtenção e preservação dos isolados.....	19
3.2. Caracterização morfométrica dos conídios e dos apressórios de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose.....	23
3.2.1. Obtenção da cultura monospórica.....	23
3.2.2. Obtenção e avaliação dos conídios	24
3.2.3. Obtenção e avaliação dos apressórios	25

3.3. Efeito da temperatura no crescimento de colônias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , in vitro, obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose.....	27
3.4. Caracterização molecular de espécies de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	28
3.4.1. Extração de DNA e avaliação de sua quantidade e qualidade.....	28
3.4.2. Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2	29
3.4.3. Análise das sequências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2	30
3.4.4. Análise das relações filogenéticas e da diversidade genética entre as populações de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> através de sequenciamento de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2	31
3.4.5. RFLP da região ITS1-5.8S-ITS28jj	32
3.5. Caracterização patogênica de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em folhas de mangueira ‘Tommy Atkins’ e ‘Espada Vermelha’	33
3.6. Estudo da detecção de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em ramos terminais de mangueira ‘Palmer’.....	35
3.7. Determinação da incidência de antracnose em frutos de mangueiras no estado de São Paulo.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Caracterização morfométrica dos conídios e dos apressórios de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose.....	38

4.1.1. Morfometria dos conídios.....	38
4.1.2. Morfometria dos apressórios.....	42
4.1.3. Avaliação conjunta dos conídios e dos apressórios.....	44
4.1.4. Efeito da temperatura no crescimento de colônias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose	45
4.2. Caracterização molecular de espécies de <i>Colletotrichum</i>	55
4.2.1. Análise das relações filogenéticas estabelecidas entre as populações por meio de sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2	55
4.2.2. Análise dos fragmentos de restrição dos produtos amplificados.....	58
4.3. Caracterização patogênica de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> inoculados em folhas de mangueira ‘Tommy Atkins’ e ‘Espada Vermelha’	60
4.4. Detecção de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em ramos terminais de mangueira ‘Palmer’.....	62
4.5. Determinação da incidência de antracnose em frutos de mangueiras no estado de São Paulo	64
5. CONCLUSÕES	68
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA, PATOGÊNICA E GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM MANGA (*Mangifera indica* L.).

Resumo - Avaliou-se características morfológicas, patogênica e molecular de 33 isolados monospóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de tecidos de manga com sintomas de antracnose. Adicionalmente avaliou-se também a sobrevivência do fungo em panículas e sua incidência em frutos coletados de mangueiras de 24 propriedades rurais, de dois tipos de condução: BC (Baixo custo, com até 15 pulverizações anuais de fungicidas) e AC (Alto Custo acima de 15 pulverizações anuais). Com base na morfologia os 33 isolados foram identificados como *C. gloeosporioides*, com predominância de conídios cilíndricos e/ou obclavados e apressórios lobulados ou fracamente lobulados. O aspecto das colônias variou com o isolado, assim como a velocidade de crescimento, em diferentes temperaturas. Mediante inoculação em folhas de mangueiras das cultivares Tommy Atkins e Espada Vermelha foi verificado que todos os isolados foram patogênicos, com diferenças quanto aos níveis de patogenicidade. A incidência nas áreas de BC variou de 52,2% a 58,5%, enquanto que nas de AC essa foi de 26,00% a 39,8%. No estudo de sobrevivência, avaliado mediante a determinação da incidência de antracnose em ramos terminais, com e sem panículas, foi verificado que essa se deu na ordem de 3,6% a 10,2%, respectivamente. Mediante estudo molecular, com análise da região ITS1-5.8S-ITS2 amplificada, foi verificado que todos os isolados enquadraram-se na espécie *C. gloeosporioides*, com 100% de similaridade.

Palavras-chave: Controle integrado, resistência varietal, incidência, sobrevivência.

**Morphologic, Pathogenic and Genetic characterization of Isolated of
Colletotrichum gloeosporioides, Causal Agent of the Anthracnose in Mango
(*Mangifera indica*) L.**

SUMMARY - Morphological, pathogenic and molecular characteristics of 33 monosporic isolates of *Colletotrichum* spp. were evaluated in a greenhouse and laboratory. These were obtained from mango tissues which presented anthracnose symptoms. The fungus survival on panicles and its incidence in fruits on 24 farms were also evaluated under two types of management: LC (Low cost, up to 15 yearly fungicide sprays) and HC (High Cost, over 15 sprays per year). Based on the morphological characteristics, the 33 isolates were identified as *C. gloeosporioides*, presenting cylindrical and / or obclavated predominant forms of conidia and weak lobulate appressoria. The appearance of the colonies varied based on the isolate and growth rate at different temperatures. Upon inoculation in the cultivars mango leaves, Tommy Atkins and Espada Vermelha found that all isolates were pathogenic, having differences in pathogenicity levels. The incidence of the LC areas ranged from 52.2% to 58.5%, while in the HC was from 26.0% to 39.8%. In the survival study, which was measured by determining the incidence of anthracnose in the terminal branches with and without panicles, the ranges determined were from 3.6% to 10.2%, respectively. By molecular analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 amplified region, it was found that all isolates are framed in the species *C. gloeosporioides*, with 100% similarity.

Keywords: Integrated control, Varietal resistance, incidence, survival

1. INTRODUÇÃO

A mangueira (*Mangifera indica* L.), espécie originária da Ásia, atualmente é produzida em mais de 100 países. A maior parte é produzida em países em desenvolvimento, como Índia, Paquistão, México, Brasil e China (PIZZOL et al., 1998; PEROSA, 2002).

A produção de manga no Brasil vem apresentando tendência de grande expansão da área plantada, especialmente em razão das condições climáticas favoráveis e com adoção de tecnologias modernas nas fases de produção e pós-colheita, tendo em vista um amplo mercado internacional crescente (SIQUEIRA, 2003).

A cultura da manga conta com diversos problemas de ordem fitossanitária, destacando-se a antracnose ((*Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk; anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc)). Todos os órgãos da parte aérea da planta são atacados, com destaque às folhas e frutos. O fungo é capaz de sobreviver saprofiticamente em ramos mortos, lesões antigas, frutos e partes afetadas remanescentes no chão e na planta, sobre os quais esporula quando há umidade. A dispersão/disseminação dá-se principalmente por respingos de água. A umidade é o principal fator determinante da gravidade da doença, independente da sua forma de apresentação (CUNHA et al., 2000).

Espécies do gênero *Colletotrichum* podem ser diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais, embora tal procedimento encontre dificuldades em função da grande diversidade fenotípica e instabilidade destes caracteres em função do ambiente (ANDRADE et al., 2007).

Para a discriminação de espécies, de subpopulações ou mesmo de indivíduos de uma mesma espécie, utiliza-se o estudo das regiões espaçadoras ITS e IGS, por acumularem maior variabilidade genética (BACIARELLI-FALINI et al., 2006). Como

exemplo, em estudos recentes o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 permitiu com sucesso a caracterização em espécie isolados de *Guignardia* spp. obtidos de laranjeiras, goiabeiras e mangueiras (WICKERT et al., 2009).

A literatura mundial refere-se, quase que na sua totalidade, ao *C. gloeosporioides* como o responsável pela antracnose da mangueira. No Brasil, estudos realizados por PEREZ et al. (2002), com caracterização morfológica, patogênica e molecular apontaram esse fungo como o responsável pela antracnose da mangueira. Entretanto, dada às variações verificadas nos tipos de sintomas e nos níveis de controle obtidos, mesmo sob condições adequadas de manejo, suspeita-se do envolvimento de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada à doença.

No caso da Austrália, há um variante de *C. gloeosporioides*, denominado *C. gloeosporioides* var. *minor*, o qual é o responsável pela doença naquele país (FITZELL, 1979; PLOETZ, 1994). Por outro lado, no Brasil a espécie *C. acutatum* J.H. Simmonds mostra-se patogênica a diferentes espécies de plantas frutíferas, porém ainda não relatada em manga. Entretanto, tal espécie, obtida de pequizeiro, mostrou-se patogênica quando inoculada em frutos de diferentes espécies de plantas, incluindo-se mangueiras.

Dessa forma, considerando a possibilidade de um maior espectro dessas formas de *Colletotrichum gloeosporioides*, incluindo-se espécies não relatadas, e considerando que no Brasil as pesquisas mostram-se muito escassas, a busca de tais informações faz-se oportuna e imprescindível, com vistas a atender a demanda pelas informações que se fazem necessária.

Os objetivos deste trabalho foram: (i) obter coleção de isolados de *C. gloeosporioides*; (ii) analisar a composição populacional de isolados de *C. gloeosporioides* mediante estudos morfométricos, moleculares e patogênicos; (iii) estudar a dinâmica de crescimento micelial in vitro de isolados de *C. gloeosporioides* sob diferentes condições de temperatura; (iv) estudar a sobrevivência do fungo em

ramos secos e; (v) determinar a incidência da antracnose em mangueira em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A manga no Brasil

A manga é uma das frutas mais conhecidas e apreciadas em todo o mundo. O Brasil foi o primeiro país da América a cultivar a mangueira, que foi trazida pelos portugueses no século XVI e plantada no Rio de Janeiro, de onde se difundiu para todo o País, chegando em 1700 em Itamaracá, na Bahia, às Antilhas, em 1742, e depois ao México, juntamente com o cafeeiro (SIMÃO, 1971).

A produção mundial de manga em 2004 foi de 26,57 milhões de toneladas. O Brasil figura entre os oito maiores produtores mundiais de manga, com produção em 2004 de 850 mil toneladas do fruto, das quais 138 mil t foram exportadas, colocando o país em terceiro lugar em exportação da fruta, atrás apenas do México e Índia (AGRIANUAL, 2006). Já em 2006 o Brasil produziu 1,22 milhão de t e exportou 115 mil t (AGRIANUAL, 2009). Segundo SILVA (2004), 88% do que é colhido é vendido no mercado interno. O consumo per capita anual do produto no Brasil é de apenas 2,7kg, sendo, pois, muito baixo quando comparado com países como o México, onde cada habitante consome 13,5kg da fruta. Tal dado demonstra, assim, que as perspectivas de produção visando o mercado interno mostram-se também altamente promissoras.

A produção de manga no Brasil apresenta grande potencial de crescimento para exportação. Ela tem mostrado competitividade tanto em termos de preços, como em qualidade. A utilização de técnicas de indução floral e de pós-colheita tem permitido explorar espaços de mercado, no momento em que se reduz a oferta dos países concorrentes por causa da entressafra (PEROSA, 2002).

2.2. A manga no Estado de São Paulo

O Estado de São Paulo vem apresentando números crescentes na produção de manga, inclusive, ainda que contidamente, também com expansão do consumo interno. Também, segundo indicações de técnicos e empresas ligadas à atividade, esse aumento da produção no Estado de São Paulo também se encontra associado à melhoria na qualidade e ao aumento das exportações (PEROSA, 2002). Em 2001, a produção brasileira de manga foi de 782.348 t e a área cultivada alcançou 67.000 hectares. Os Estados da Bahia e Pernambuco responderam por 43,1% da produção, sendo as microrregiões de Juazeiro (BA) e Petrolina (PE), responsável por 26,8%; a participação paulista subiu para 29,5%, sendo a EDR (Escritórios de Desenvolvimento Rural) de Jaboticabal a maior do Estado, respondendo por 9,35% do total brasileiro (SIQUEIRA, 2003).

O Estado de São Paulo, em 2001, possuía 3,033 milhões de pés de manga, sendo que 15% eram pés novos, e a produção era de 215.395 t. Em 2002 o número de pés de manga passou para 3,112 milhões, com 12,5% de pés novos. A produção de manga situa-se nas regiões circunscritas pelos EDRs de Jaboticabal, São José do Rio Preto e General Salgado, as quais respondem por 83,7% dentre as dez EDRs do Estado de São Paulo (CAMARGO FILHO et al., 2004).

Em 2004, a Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) comercializou 94.075 t de manga. A principal variedade comercializada foi a Tommy Atkins, com 72%, a Haden, com 8,8%, enquanto as demais (Palmer, Keitt, Bourbon, Coquinho, Espada Extrema, Ouro, Rosa e Van Dick) corresponderam juntas, a 19,2% do total (AGRIANUAL, 2006).

Na CEAGESP, a principal praça de comercialização de mangas no Estado de São Paulo, o preço médio da variedade Tommy Atkins, no período 2001-2004, foi de

R\$1,16 por kg, enquanto que no ano de 2005, até o mês de junho, o preço médio foi de R\$1,30 por kg (AGRIANUAL, 2006).

Caracterizada pelo elevado nível tecnológico, como irrigação, indução floral e variedades melhoradas, as áreas de cultivo da manga chamada “tipo exportação” encontram-se em fase de franca expansão, tendo como base as cultivares Tommy Atkins, Haden e Palmer, entre outras (SILVA, 2004).

Na safra 2008/2009 a colheita da manga Palmer, no interior de São Paulo, começou em dez/08, e foi finalizada em março de 2009, ocorrendo pico de colheita em jan/09. Tal comportamento foi diferente do verificado na temporada 2007/2008, cujo pico de safra deu-se em fevereiro (HOTIFRUT, 2009).

2.3. Antracnose, a principal doença da mangueira

A cultura da manga pode ser afetada por diversos problemas de ordem fitossanitária, destacando-se as doenças, especialmente a Antracnose, causada por *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk (anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc), Morte descendente ou podridão seca da mangueira (*Physalospora rhodina* (Berk. & Curt.) Cooke (= *Botryodiplodia theobromae* Pat)), Oídio (*Erysiphe polygoni* D.C.; anamorfo: *Oidium mangiferae* Bert.), Malformação floral ou embonecamento (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*), Mancha de alternaria (*Alternaria alternata* e *A. solani*), Mancha angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae indica* Patel, Moniz & Kulkarni) Robbs, Ribeiro & Kimura) e Seca-da-mangueira ou mal-do-recife (*Ceratocystis fimbriata* Ell. et Halst) (RIBEIRO et al., 1997). Dentre tais doenças, a antracnose é a mais importante, dado aos grandes prejuízos e aos elevados custos de controle, chegando às vezes a mais de 20 pulverizações por ciclo de cultivo. Dessa forma, além de elevar o custo de produção, tal doença reduz a

competitividade, e muitas vezes os resultados de controle mostram-se aquém dos desejáveis.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esses fungos são considerados cosmopolitas, infectam centenas de espécies de plantas cultivadas (GOES & KIMATI, 1997; SUSSEL, 2005; TOZZE JÚNIOR et al., 2006; SILVA, 2006; CASTILHO et al., 2007), destacando-se dentre elas a manga (BAILEY & JEGER, 1992; ANJOS et al., 2002).

A antracnose é uma importante doença da mangueira em todas as regiões produtoras do mundo, exigindo cuidados especiais, principalmente quando se visa a exportação dos frutos (RIBEIRO et al., 1997).

As perdas quantitativas e qualitativas em frutos de manga resultantes das doenças de pré e pós-colheita representam um grande entrave à produtividade, além de limitar a possibilidade de exportação. Assim, dada à relevância da cultura e às perspectivas altamente promissoras ao incremento da produção e exportação, como apontado por CARRARO & CUNHA (1994), a busca de conhecimentos do patossistema *Mangifera-Colletotrichum* spp. faz-se imprescindível e urgente.

Períodos prolongados de chuvas, que coincidem com o florescimento, são as condições ideais para a ocorrência de epidemias. O período de umidade necessário para que ocorra a infecção é de 3 a 8 horas, em temperaturas entre 25°C e 30°C. Porém, este tempo aumenta com o decréscimo da temperatura. A infecção ocorre diretamente através da superfície íntegra dos órgãos do hospedeiro, não necessitando de ferimento. O fungo fixa-se através de apressório e lança-se para o interior da célula por meio de uma hifa mais fina, denominada *peg* de penetração, que perfura a cutícula, recuperando suas dimensões ao atingir o lúmen da célula, de onde retira seus nutrientes (JEFFRIES et al., 1990).

Infecções quiescentes em frutos imaturos são comuns, podendo o fungo permanecer por meses nos mesmos, sem que haja manifestação de sintomas. Tais

frutos podem apresentar aparência sadia na fase de colheita, porém os sintomas de antracnose se exteriorizam durante o amadurecimento. Após a colheita, a disseminação do fungo causal ocorre de fruto para fruto devido à sua proximidade, dentro das caixas de embalagens (PLOETZ, 1994).

ARAUZ (2000), estudando a interação patógeno/hospedeiro concernente ao complexo manga-*C. gloeosporioides* verificou que durante o desenvolvimento do fruto ele apresenta resistência ao patógeno e não permite o seu desenvolvimento. Entretanto, ao entrar na fase de maturação, por ser um fruto climatérico, há redução nos compostos antifúngicos, ocorrem alguns estímulos, como a produção de etileno, reativando o patógeno, seguindo a invasão e provocando a expressão dos sintomas da doença, conforme ilustrado na Figura 1.

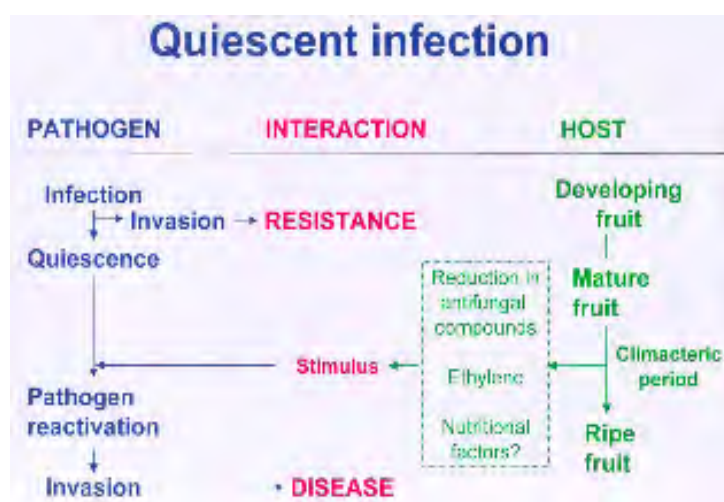


Figura 1. Processos desenvolvidos por *Colletotrichum gloeosporioides* a partir de uma infecção quiescente em frutos de manga. Fonte: (ARAUZ, 2000).

Os sintomas nos frutos, em pós-colheita, aparecem durante o amadurecimento. Manchas de coloração marrom-escuras, levemente deprimidas, inicialmente pequenas, podem coalescer, envolvendo grandes áreas do fruto. Às vezes, essas lesões causam rachaduras na casca. As manchas são predominantemente irregulares, mas algumas vezes arredondadas, e distribuem-se por toda a superfície do fruto. Porém, algumas vezes podem mostrar-se mais concentradas ao redor do pedúnculo, estendendo-se posteriormente para as regiões apicais do fruto, formando manchas escorridas, devido ao trajeto dos conídios, junto com a água da chuva (PLOETZ, 1994; SALES JUNIOR et al., 2004). Nessas circunstâncias o fruto torna totalmente inviável para comercialização. Em condições de elevada umidade ambiental e de níveis de temperatura superiores a 22°C, é possível observar no centro das lesões pontuações pardo-amareladas que são as frutificações do patógeno, como, por exemplo, a presença de massa de conídios de coloração rosada (DODD et al., 1997). Além de reduzir a produtividade e desqualificar comercialmente os frutos, a antracnose provoca ferimentos ou lesões nos frutos que beneficiam a infestação de fungos oportunistas e insetos (CUNHA et al., 2000; SALES JUNIOR et al., 2004).

Segundo RIBEIRO et al. (1997) os sintomas da antracnose em folhas novas caracterizam-se pela presença de numerosas manchas pequenas e salientes, arredondadas ou irregulares, de coloração marrom, de tamanho variável, as quais podem coalescer, deixando a folha necrosada e crestada. Na raque da inflorescência podem aparecer pequenas manchas de coloração marrom-escura, profundas e secas, alongadas no sentido longitudinal, destruindo grande número de flores e/ou causando a queda de frutos, antes da maturação fisiológica. Nos ramos novos observam-se manchas necróticas escuras, seguidas de seca da ponta para a base, acompanhada de desfolha.

Nas folhas velhas os sintomas da antracnose podem ser observados pelo aparecimento de manchas marrom, arredondadas ou irregulares, de tamanho variável (1 a 10 mm de diâmetro). As lesões podem surgir tanto no ápice e nas margens das folhas, como no centro do limbo foliar. Sob condições ambientais propícias, elas

aumentam de tamanho, chegam a coalescer, e podem causar o rompimento do limbo foliar, assumindo a aparência de queimadura. Nas brotações e ramos novos surgem lesões escuras e necróticas, que podem evoluir com o tempo, ocasionalmente apresentando exsudação de goma. Em consequência, os ramos secam e escurecem da ponta para a base, causando o desfolhamento (CUNHA et al., 2000).

Os frutos de manga são suscetíveis em qualquer estágio de desenvolvimento. Entretanto, se a infecção ocorrer no início da formação dos frutinhos, haverá a sua queda e/ou a sua mumificação. Em frutos maiores o patógeno pode ficar quiescente ou causar manchas negras, irregulares, deprimidas que podem coalescer e envolver todo o fruto, progredindo para a polpa.

O controle da doença baseia-se essencialmente no uso de fungicidas, destacando-se os cúpricos, ditiocarbamatos, triazóis e benzimidazóis (CUNHA et al., 2000). Entretanto, outras alternativas, de caráter cultural, fazem-se também necessárias, incluindo-se (i) o emprego de espaçamento adequado, considerando-se o tamanho da copa de cada variedade, de modo que não comprometa a ventilação e a insolação entre as plantas; (ii) adoção de podas leves e periódicas, para abrir a copa e aumentar a aeração e penetração dos raios solares; (iii) podas de limpeza, para eliminação dos galhos secos; (iv) remoção de frutos velhos remanescentes e; (v) retirada de materiais vegetais caídos no chão, a fim de reduzir as fontes de inóculo do fungo no pomar. Após a poda e nos períodos que antecedem a abertura das flores, durante o florescimento e na frutificação, faz-se necessário o uso de fungicidas, especialmente os de ação preventiva, empregando intervalos de acordo com as condições climáticas prevalecentes e histórico da doença em anos anteriores. Dada à possibilidade da ocorrência de resistência do fungo aos fungicidas sistêmicos, como já verificado em alguns países, faz-se necessário o seu emprego de forma alternada com os fungicidas protetores (TAVARES, 2004).

No tratamento de pós-colheita tem-se observado efeito positivo com a imersão dos frutos em tanques contendo suspensão de thiabendazole, ou ainda em tratamento

hidrotérmico (46,1°C/70 a 90 min), como o adotado para o controle da mosca-das-frutas nas mangas exportadas para os Estados Unidos da América (CUNHA, 1993).

A variedade Tommy Atkins, no caso particular do Estado de São Paulo, mostra-se moderadamente resistente, comportando de forma semelhante à observada em outros países (PLOETZ, 1994). Entretanto, outras variedades de grande importância econômica para o Estado, como Haden e Bourbon são extremamente suscetíveis (RIBEIRO et al., 1997). A variedade Palmer, igualmente de grande importância para o Estado de São Paulo, também se mostra suscetível. Algumas dessas variedades, em anos favoráveis ao patógeno, às vezes recebem cerca de 22 pulverizações, como é caso de Bourbon e Palmer (A. de Goes, informações pessoais, Julho de 2006).

2.4. Caracterização morfológica, molecular e patogênica

Colletotrichum gloeosporioides pertence à ordem Melanconiales, família Melanconiaceae. Tal fungo produz acérvulos subepidérmicos, dispostos em círculos. Os conídios são hialinos e gutulados, uninucleados, com 12-19µm de comprimento por 3,0-6,0µm de largura, arredondados nas extremidades e levemente curvos (DODD et al., 1997; Ribeiro et al., 1997). A fase teleomórfica corresponde ao fungo *Glomerella cingulata*, que pertence à subdivisão Ascomycotina, cujo papel no ciclo da doença não é conhecido (PLOETZ, 1994).

Os conídios ficam retidos em acérvulos, em uma massa mucilaginosa de coloração rosada, sendo a chuva importante para sua liberação e disseminação (DODD et al., 1997). A produção de conídios ocorre o ano todo, sendo maior em condições de umidade relativa acima de 95%, ou em água livre, em uma ampla faixa de temperatura, que vai de 10°C a 30°C, ideal para a formação de apressório (RIBEIRO et al., 1997).

A literatura mundial refere-se, quase que na sua totalidade, ao *C. gloeosporioides* como o responsável pela antracnose da manga. Inclusive, no Brasil, estudos realizados

por PEREZ et al. (2002), envolvendo caracterização morfológica, patogênica e molecular apontaram esse fungo como o único responsável pela antracnose da mangueira. Ressalta-se, no entanto, que nesse estudo foram utilizados apenas três isolados do fungo, sendo, portanto, um número pouco representativo para tais estudos.

No Brasil existe a espécie *C. acutatum*, a é patogênica a diferentes espécies de plantas frutíferas, porém ainda não relatada em manga. Entretanto, isolado dessa espécie, obtida de pequi, mostrou-se patogênico quando inoculado em folhas de diferentes espécies de plantas, incluindo-se de mangueiras (ANJOS, 2002). Além disso, em estudo similar feito por LIMA FILHO et al. (2003), verificou-se que frutos de mangueira inoculados com isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedeiros mostraram-se suscetíveis aos mesmos. Assim, de forma semelhante aos isolados provenientes de frutos de manga, os de cajueiros também o foram patogênicos. Dessa forma, considerando a possibilidade de que um maior espectro dessas formas de *Colletotrichum* spp., incluindo-se espécies não relatadas, sejam patogênicas e, considerando que no Brasil não foram realizados estudos mais completos e mais representativos, pesquisas nessa área fazem-se fundamentais. Além disso, tem-se verificado na prática que, às vezes, mesmo com adoção de todas as medidas preconizadas para o controle da antracnose em manga, os resultados de controle nem sempre atingem os níveis desejáveis.

Em termos gerais, espécies de *Colletotrichum* são diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Características como morfologia de conídios, presença de setas, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento, assim como a presença do teleomorfo têm sido usadas para diferenciar, in vitro, ou caracterizar espécies morfológicamente próximas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998).

SUTTON (1992) cita as características morfológicas, tamanho e forma de conídios e formato de apressórios, para uso na taxonomia de *Colletotrichum*. GOES & KIMATI (1997) diferenciaram três grupos de *Colletotrichum* associados à queda

prematura dos frutos cítricos. Segundo esses autores, o grupo denominado FGG (*C. gloeosporioides*) apresentava apressórios de formato predominante lobulado e conídios de maiores dimensões; o grupo KLA (*C. acutatum*), apresentava apressórios arredondados e conídios de dimensões intermediárias, enquanto o grupo SGO (*C. acutatum*) continha apressórios de formato clavado e conídios de menores dimensões.

TOZZE JÚNIOR et al. (2006) estudando o patossistema *Colletotrichum-solanáceas* verificaram que os isolados provenientes de dessa família, quando submetidos a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 °C), apresentaram maior taxa de crescimento a 25°C, com exceção de um deles, com maior desenvolvimento a 28°C. A velocidade de crescimento micelial de todos os isolados foi semelhante àquela de *C. acutatum* usado como padrão, diferindo de *C. gloeosporioides*, o qual apresentou maior velocidade de crescimento micelial que os demais isolados.

Entre os aspectos morfológicos e culturais, o crescimento micelial tem sido usado para caracterizar a variabilidade de isolados de fungos fitopatogênicos. SWART (1999), em seus estudos não observou diferença no diâmetro de colônias *C. gloeosporioides* obtidos da manga e de abacate (*Persea americana* Mill.), após sete dias de incubação. Entretanto segundo o autor foi verificado diferenças significativas nos isolados provenientes de diferentes regiões amostradas.

A espécie *C. gloeosporioides* exibe consideráveis variações morfológicas e patogênica que dificultam classificá-la baseando-se exclusivamente em caracteres morfológicos (MANNERS et al., 1992). Para ASSIS (2001), por exemplo, o conhecimento da produção de enzimas extracelulares produzidas por fungos fitopatogênicos constitui-se em uma ferramenta importante e adicional para estudos sobre taxonomia, permitindo a detecção de diferenças, mesmo entre isolados de uma mesma espécie. Segundo esse pesquisador, ao estudar *C. gloeosporioides* da manga observou que os isolados apresentaram atividade extracelular das enzimas amilolítica, lipolítica e proteolítica, mas não celulolítica. Entretanto, a diferenciação dos isolados deu-se apenas pelas atividades amilolítica e proteolítica.

Espécies de *Colletotrichum* são normalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais, porém esta identificação encontra dificuldades em função da grande diversidade fenotípica e instabilidade destes caracteres, em função do ambiente (ANDRADE et al., 2007). Para diferenciar espécies de *Colletotrichum* obtidos de diversos hospedeiros, os métodos tradicionais como forma e dimensão de conídios, coloração de colônia e taxa de crescimento micelial, entre outras características, não têm sido suficientes (FREEMAN et al., 1998). Dentre outros fatores que contribuem para as diferenças nos caracteres morfológicos incluem-se ainda a influência de fatores ambientais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998; LOPEZ, 2001). Dessa forma, não obstante tais características serem importantes nos estudos de caracterização das espécies, os mesmos devem ser complementados com técnicas que ampliem as chances de refinamento e segurança na classificação dos mesmos.

Para exemplificar, os marcadores molecular *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) têm como base o uso de um primer, pequeno oligonucleotídeo de 10 bases com seqüência arbitrária, que ao se emparelhar às seqüências complementares dispersas no genoma do fungo, é amplificado por ação de uma enzima, a Taq polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Esta técnica requer pequenas quantidades de DNA, é de rápida execução e permite trabalhar com um grande número de isolados, de uma população do patógeno (MANNERS et al., 1992).

Na discriminação de espécies, subpopulações ou mesmo de indivíduos de uma mesma espécie, utiliza-se o estudo das regiões espaçadoras ITS e IGS, por acumularem maior variabilidade genética (BACIARELLI-FALINI et al., 2006). Em estudos recentes, o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 permitiu com sucesso a caracterização em espécie de isolados de *Guignardia* spp. obtidos de folhas e frutos de laranjeiras, goiabeiras e mangueiras (WICKERT et al., 2009).

O polimorfismo observado na técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. Diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos podem também resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição. Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A base genética do polimorfismo observado resulta assim de mutações nos sítios de restrição ou de inserções, deleções e rearranjos entre estes sítios (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de digestão do produto amplificado de uma reação ITS-rDNA é rápida e mostrou-se confiável na distinção entre diferentes espécies de *Colletotrichum* obtidas de mesmo hospedeiro (MARTÍN & GARCÍA FIGUERES, 1999).

2.5. Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides* em restos culturais

O desenvolvimento dos sintomas de antracnose é bastante favorecido por chuvas, especialmente as que ocorrem no fim da tarde, uma vez que possibilitam o prolongamento da umidade durante toda a noite. Períodos chuvosos e encobertos ou orvalho pesado no período noturno, de ocorrência freqüente no inverno paulista, em algumas regiões, são favoráveis à ocorrência da antracnose (RIBEIRO et al., 1997).

Nos frutos, os períodos de maior suscetibilidade à antracnose são quando os mesmos são bem novos, ou em maturação. A suscetibilidade dos frutos novos vai diminuindo com a idade, até a 8ª semana. Dessa forma, para o controle do agente causal da antracnose recomenda-se maior atenção para os períodos críticos de incidência que são o de florescimento, e quando da presença de frutos novos (especialmente na fase de chumbinho) ou de frutos no estágio de maturação. O

patógeno pode ficar quiescente, vindo a se manifestar com sintoma visível apenas na fase de maturação dos frutos (ROSSETO, 2009).

ARAUZ (2000) resume bem o ciclo da doença (Figura 2), mostrando as principais fases de infecção das partes da planta. Segundo o autor, o ciclo da doença começa com uma lesão de uma folha mais velha, passando por folhas jovens, panícula e frutos mumificados, até chegar no fruto, permanecendo quiescente até a fase de maturação.

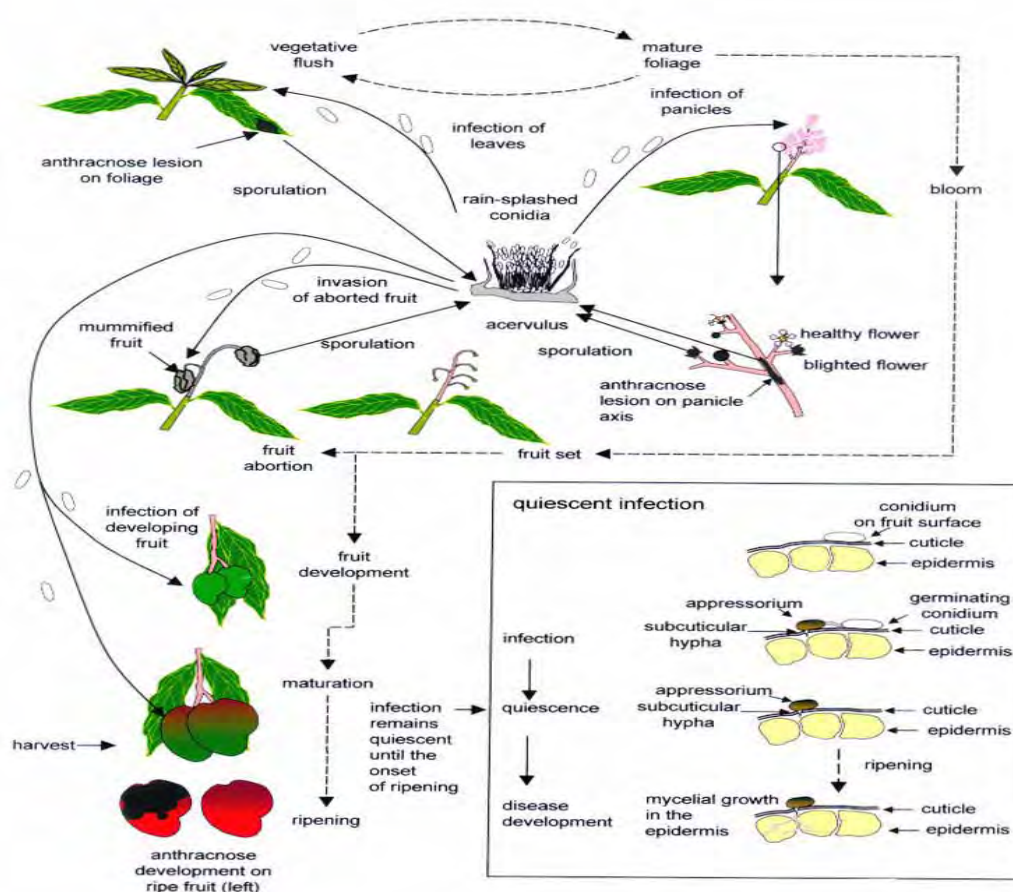


Figura 2. Ciclo da antracnose na manga. Linhas solidas, representam ciclo da doença. Linhas tracejadas representam fenologia da manga (ARAUZ, 2000).

O fungo *C. gloeosporides* sobrevive na forma saprofítica de um período ambiental favorável para outro, em ramos mortos, lesões antigas, frutos e partes afetadas remanescentes no chão e na planta, sobre os quais esporula quando há calor e umidade. A dispersão/disseminação dá-se principalmente por respingos de água. A umidade é o principal fator determinante da gravidade da doença, independente da sua forma de apresentação (CUNHA et al., 2000). A eliminação dos restos de cultura secos caídos ou remanescentes na planta vai propiciar à diminuição da densidade do inóculo primário da doença (ZAMBOLIM & JUNQUEIRA, 2004).

2.6. Incidência de antracnose em frutos de mangueiras no Estado de São Paulo

Para impulsionar as exportações em fruticultura, o Brasil vem intensificando as ações no que se refere à qualidade de frutas. De acordo com as exigências do mercado europeu, a implantação do Sistema Integrado de Frutas (PIF) passou a ser uma das principais diretrizes da estratégia para aumentar as exportações de frutas no Brasil.

A produção integrada é um sistema de exploração agrária que produz frutas de qualidade e sanidade, seguindo normas de sustentabilidade ambiental, de segurança alimentar e de viabilidade econômica, mediante o uso de tecnologias não agressivas ao meio ambiente e ao homem, não fazendo uso de práticas isoladas como ocorre na fruticultura convencional (MATTOS & FACHINELLO, 2002).

O monitoramento de doenças é uma prática de fundamental importância dentro do contexto de Produção Integrada de Frutas - PIF, que tem como objetivo a melhoria do processo de produção e da preservação ambiental, minimizando a poluição das águas, do ar e do solo, garantindo a qualidade do produto final e qualidade de vida dos consumidores. A realização das inspeções periódicas é essencial para a detecção de doenças e prevenção de sua disseminação pela adoção de medidas de manejo e de controle. Além disso, possibilita também a redução de prejuízos provocados por

patógenos, propicia à detecção de doenças em sua fase inicial de desenvolvimento e aumenta também as chances de sucesso das medidas de controle (TAVARES et al., 2001).

No Brasil, a distribuição de plantas com sintomas de antracnose é generalizada, ocorrendo em todas as regiões produtoras de manga, em épocas quentes e úmidas. Quando sob temperaturas amenas, assume menor importância. A doença manifesta-se nas folhas novas e nos frutos, depreciando-os para o comércio. A incidência da doença está intimamente relacionada com as condições climáticas e com o desenvolvimento fenológico da planta. De acordo com ZAMBOLIM & JUNQUEIRA (2004), a antracnose ocorre em regiões com temperatura oscilando entre 10°C a 30°C, sob condições de umidade acima de 90% por no mínimo 12h. Segundo tais pesquisadores o pleno conhecimento desses fatores na região de cultivo é fundamental para possibilitar o uso de medidas eficientes e seguras de controle. Também, deve-se tomar como referência, por exemplo, os períodos de floração, frutificação e colheita, de modo a estabelecer uma estratégia de controle adequada (ZAMBOLIM et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e preservação dos isolados

A obtenção de isolados de *Colletotrichum* deu-se a partir de tecidos lesionados de folhas, frutos e panículas de mangueiras apresentando sintomas típicos de antracnose (Figura 3). Tais materiais foram coletados em diversas regiões do Estado de São Paulo, a partir dos quais foram retirados pequenos fragmentos dos tecidos sintomáticos e, após assepsia dos mesmos procedeu-se a sua deposição em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), contido em placas de Petri.

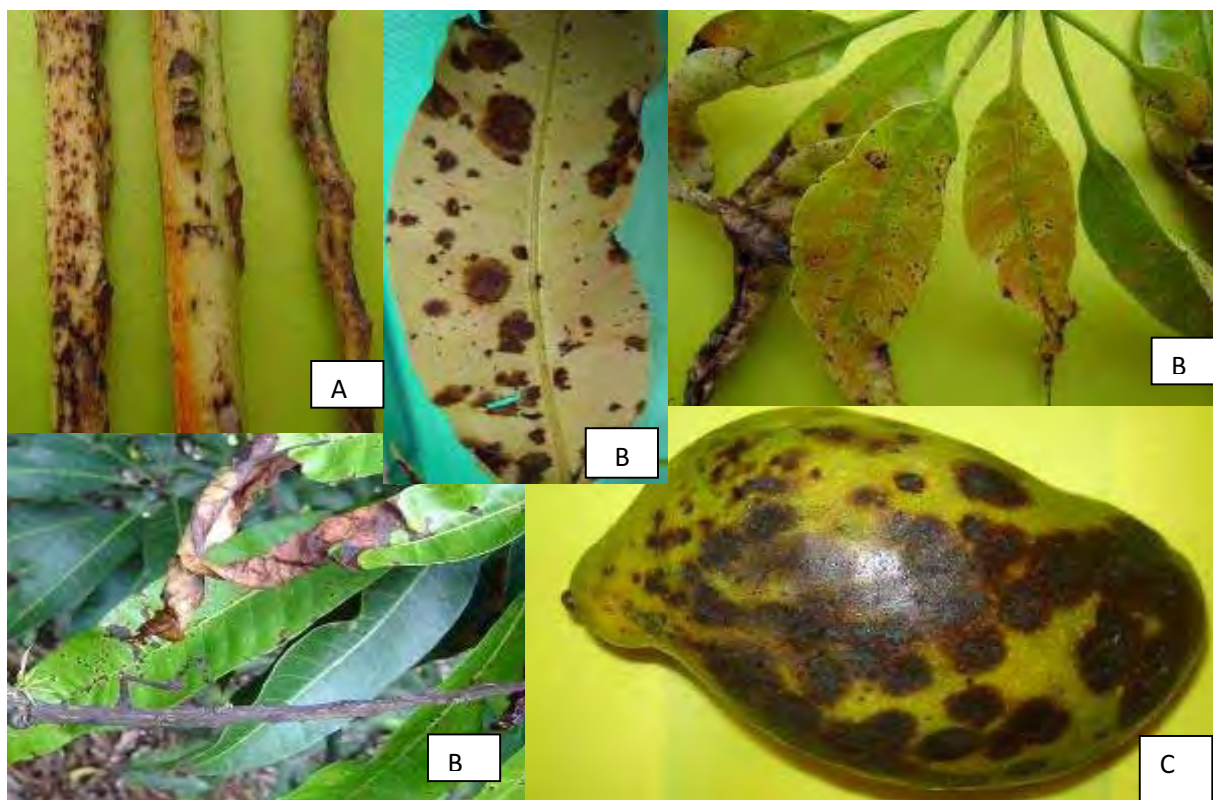


Figura 3 - Vista parcial de panículas, folhas e frutos apresentando sintomas típicos de antracnose. A - panículas; B - folhas e C - fruto.

As placas contendo o fungo foram posteriormente mantidas em estufas para B.O.D., com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob conjunto de lâmpadas fluorescentes e regime de alternância luminosa (12h claro/12h escuro), por um período de cinco dias. A partir de colônias típicas do fungo (Figura 4) procedeu-se a purificação dos isolados, os quais foram posteriormente transferidos para tubos de ensaio contendo BDA inclinado (Figura 4). Após o crescimento do fungo, as colônias foram recobertas com óleo mineral estéril, seguido de armazenamento no Laboratório de Fitopatologia, à temperatura ambiente, de $26^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. A relação de isolados obtidos encontra-se apresentada na Tabela 1.

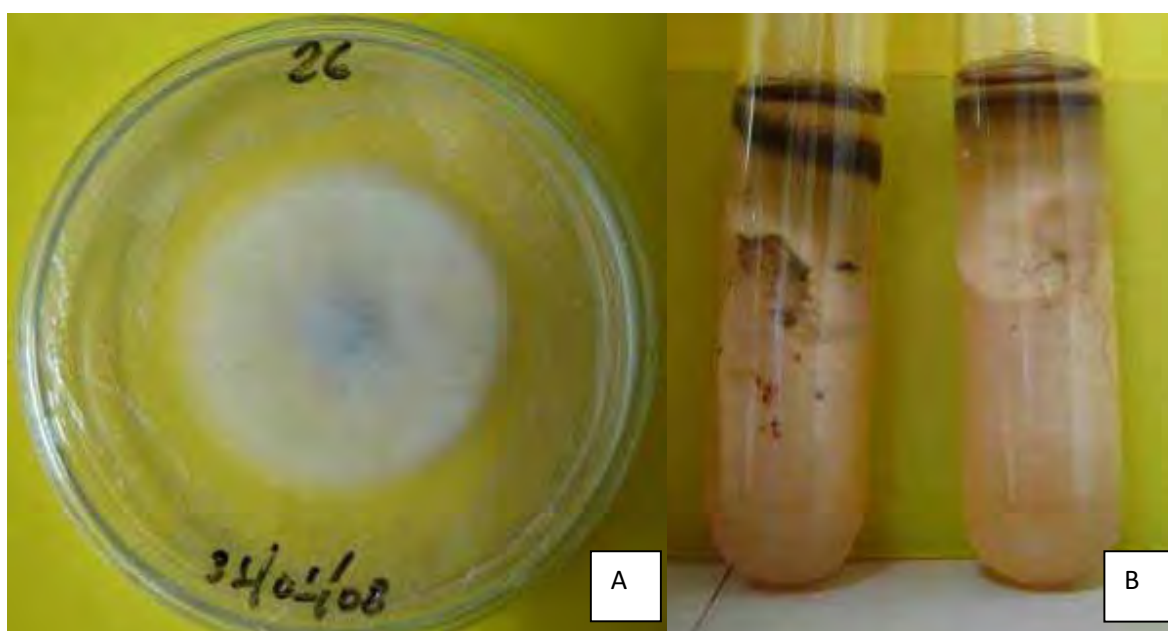


Figura 4 - Vista parcial de colônia típica de *Colletotrichum* em placa de Petri contendo BDA (A) e de tubos de ensaio contendo BDA inclinado após crescimento e formação de colônias recobertas com óleo mineral estéril, armazenadas no Laboratório de Fitopatologia, à temperatura ambiente, de $26^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ (B).

TABELA 1. Identificação, procedência, órgão da planta com sintomas de antracnose, cultivar e ano de coleta de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Jaboticabal/SP, 2009.

Identificação	Procedência	Órgão infectado	Cultivar	Ano de coleta
7	Monte Alto	Fruto	Tommy Atkins	2008
8	Bonfim Paulista	Inflorescência	Rosa	2007
13	Araçatuba	Fruto	Tommy Atkins	2008
14	Monte Alto	Inflorescência	Tommy Atkins	2008
15	Monte Alto	Folha	Tommy Atkins	2008
17	Jardinópolis	Fruto	Bourbon	2007
18	Bonfim Paulista	Inflorescência	Van Dyke	2007
21	Araçatuba	Fruto	Tommy Atkins	2008
22	Cândido Rodrigues	Folha	Palmer	2007
23	General Salgado	Inflorescência	Palmer	2007
24	Cândido Rodrigues	Fruto	Tommy Atkins	2007
25	Cândido Rodrigues	Inflorescência	Palmer	2007
27	General Salgado	Fruto	Palmer	2007

TABELA 1. Identificação, procedência, órgão da planta com sintomas de antracnose, cultivar e ano de coleta de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Jaboticabal/SP, 2009.

28	Votuporanga	Fruto	Espada vermelha	2007
29	General Salgado	Folha	Palmer	2007
31	Vista A. Alto	Fruto	Palmer	2007
32	Jardinópolis	Fruto	Bourbon	2008
34	Jardinópolis	Fruto	Bourbon	2008
35	Jales	Fruto	Tommy Atkins	2007
37	Vista A. Alto	Inflorescência	Palmer	2007
38	Vista A. Alto	Folha	Palmer	2007
39	Votuporanga	Fruto	Espada vermelha	2007
40	Jales	Fruto	Tommy Atkins	2007
41	Mogi – Mirim	Inflorescência	Tommy Atkins	2008
42	Mogi – Mirim	Inflorescência	Tommy Atkins	2008
43	Mogi – Mirim	Inflorescência	Tommy Atkins	2008
45	S.J. Rio Preto	Fruto	Palmer	2008
46	Jales	Fruto	Tommy Atkins	2007
47	Araçatuba	Fruto	Tommy Atkins	2008
49	S.J. Rio Preto	Fruto	Palmer	2008

54	Taquaritinga	Fruto	Palmer	2007
55	Bonfim Paulista	Inflorescência	Rosa	2007
58	Taquaritinga	Fruto	Palmer	2007

3.2. Caracterização morfológica dos conídios e dos apressórios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose

3.2.1. Obtenção da cultura monospórica

Inicialmente, para a obtenção da cultura monospórica, foi obtida suspensão conidial, seguida da sua diluição para concentrações de 10^3 conídios/mL. A seguir procedeu-se a deposição de alíquotas de 0,2 mL da suspensão em placas de Petri contendo meio ágar-água (1%), a qual foi espalhada com o emprego de alça de Drigalsky, seguido de incubação a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Depois de aproximadamente 12 horas, mediante lupa estereoscópica procedeu-se análise da germinação conidial e remoção de hifas, seguido da sua deposição em meio BDA contido em placas de Petri. Após crescimento micelial e assegurada a caracterização dos isolados procedeu-se a sua repicagem para tubos de ensaio contendo BDA inclinado. Seguido ao crescimento, as colônias foram recobertas com óleo mineral estéril e armazenadas em ambiente de Laboratório.

Para a caracterização morfológica foram utilizados isolados monospóricos representativos de cada uma das áreas amostradas (Tabela 1), determinado-se o formato e tamanho dos conídios e apressórios.

3.2.2. Obtenção e avaliação dos conídios

No estudo de caracterização morfológica, colônias monospóricas de cada um dos isolados foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA, seguido de incubação em estufas para B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e mantidas em fotoperíodo de 12/12 horas. Após sete dias, a partir de tais colônias foram tomados discos com 5 mm de diâmetro da zona de maior crescimento, seguido da sua deposição no centro de placas Petri contendo BDA, e incubação, conforme anteriormente mencionado. Para cada isolado foram utilizadas três repetições. Decorrido sete dias, em cada uma das placas foi depositado 10 mL de água destilada e esterilizada, seguido de raspagem superficial das colônias com um pincel de cerdas macias. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze, seguido da montagem de lâminas para leitura.

Para a avaliação do formato dos conídios realizou-se avaliação prévia para determinação dos formatos mais comuns encontrados. Cada formato encontrado recebeu uma denominação numérica (Figura 5), a qual foi utilizada para classificação dos conídios, cujas dimensões foram tomadas.

Para a caracterização quanto à forma dos conídios foram montadas três lâminas, sendo avaliados 50 conídios ao acaso, em cada uma delas. Concomitantemente à avaliação do formato dos conídios procedeu-se a mensuração de 50 conídios. Para as mensurações do comprimento e largura foi empregado o programa Image-Pro Plus[®] 6.3., onde, previamente, mediante ao emprego de câmera fotográfica (DP72 Olympus) acoplada a um microscópio óptico trilocular (BX50 – Olympus) foram registradas imagens dos mesmos.



Figura 5 – Formato de conídios utilizados para classificação: (1) reto, oblongo, com extremidade arredondada; (2) reto, com constrição; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e arredondado na outra.

Para análise de variância dos dados utilizou-se o programa AgroEstat® e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Quanto ao formato dos conídios foram avaliadas as formas das suas extremidades, a partir da qual se estabeleceu a frequência (%).

3.2.3. Obtenção e avaliação dos apressórios

Para a caracterização quanto ao tamanho dos apressórios, inicialmente promoveu-se a germinação dos conídios. Para tal, de cada um dos isolados foi preparada uma suspensão contendo 1×10^6 conídios/mL. A seguir, por meio de micropipeta foi depositada uma gota de suspensão conidial em três folhas de mangueira Tommy Atkins.

Para a indução da germinação dos conídios foram empregadas folhas com cerca de 20 dias de idade, previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial:água (1:1), enxugadas em ambiente de laboratório e arranjadas em bandejas de isopor medindo 30x40 cm, contendo chumaço de algodão umedecido em água. Em cada folha foram demarcados quatro pontos e, sobre esses foi depositada uma alíquota

de 70µL de suspensão conidial. Posteriormente as bandejas foram seladas para manutenção da umidade, e armazenadas em condições de ambiente de laboratório.

Após 14h horas de incubação (tempo esse determinado previamente como adequado para obtenção de pelo menos 50% de germinação dos conídios e formação dos apressórios), sobre as áreas demarcadas foram depositadas quatro gotas de solução esmalte incolor:acetona (1:1), conforme metodologia adotada por FITZELL (1984). Após secagem, a película formada foi retirada e justaposta numa lâmina com azul lático para visualização ao microscópio e classificação quanto à forma.

Para a avaliação do formato de cada apressório foi realizada avaliação prévia para determinação dos formatos mais comuns encontrados. Cada formato encontrado recebeu uma denominação numérica (Figura 6), a qual foi utilizada para classificação dos mesmos cujas dimensões foram determinadas.



Figura 6 – Formato de apressórios utilizados para classificação: (1) irregular e lobulado: com as margens onduladas; (2) irregular e fracamente lobulado: com as margens pouco onduladas; (3) arredondado e liso: com as margens sem ondulação.

Para a classificação das formas dos apressórios foram tomadas como referência as descrições de SUTTON (1992): (1) irregular e lobulado, com as margens onduladas; (2) irregular e fracamente lobulado, com as margens pouco onduladas; (3) circular e

liso, com as margens sem ondulação. Para cada isolado foram avaliados 25 apressórios em 3 lâminas, totalizando 75 avaliações. A avaliação foi realizada seguindo a mesma metodologia aplicada para a determinação do tamanho dos conídios. Para análise de variância dos dados e comparação de médias, adotou-se procedimento semelhante àquele aplicado para os conídios. As formas dos apressórios foram apresentadas de acordo com a frequência predominante, estabelecida em termos percentuais.

3.3. Efeito da temperatura no crescimento de colônias de *Colletotrichum gloeosporioides*, in vitro, obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose

No presente estudo foram empregados os isolados de *Colletotrichum* citados na Tabela 1. Para tal, discos com 5 mm de diâmetro obtidos de colônias do fungo, de região de ativo crescimento, foram colocados no centro de placas de Petri contendo meio BDA, e armazenadas em estufas para B.O.D. a 15, 20, 25 e 30° C $\pm$ 1°C, e fotoperíodo de 12 horas. Para cada isolado foram empregadas três placas, sendo cada uma delas uma unidade amostral.

As avaliações foram realizadas diariamente, sendo tomadas as medidas do tamanho das colônias em dois eixos perpendiculares entre si, estendendo-se até o 5º dia de incubação, quando um dos isolados atingiu a borda da placa. Também, no quinto dia, foram avaliadas as características culturais das colônias, notadamente quanto à pigmentação, presença de setores, textura e padrão de crescimento das mesmas. Os dados correspondentes à velocidade média de crescimento micelial, expressa em mm/dia, foram analisados estatisticamente mediante ao emprego do programa AgroEstat®, em análise bi-fatorial. As médias foram comparadas mediante a aplicação do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.4. Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum*

3.4.1. Extração de DNA e avaliação de sua quantidade e qualidade

Os isolados de *Colletotrichum* selecionados para a caracterização molecular foram cultivados em meio de cultura líquido contendo batata-dextrose (BD) a fim de possibilitar a obtenção de quantidades maiores de micélio e permitir a separação rápida do mesmo, do meio de cultura. Para tal, utilizaram-se peneiras de pequenas tramas, retendo o micélio e dispensando o meio restante. Ainda na peneira, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e colocado para secar em placas de Petri limpas, cobertas com papel de filtro, e mantida em temperatura ambiente, por cerca de 8 horas. Após a secagem, procedeu-se maceração do micélio empregando-se nitrogênio líquido, até a formação de um pó, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0mL. Tais tubos foram posteriormente estocados em freezer para extrações futuras.

As extrações de DNA foram baseadas no protocolo de KURAMAE-IZIOKA (1997), com ajustes, a fim de se otimizar a extração. A cada tubo eppendorf foram acrescentados 750µL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 100mM e SDS 0,5%). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 60-65 °C, durante 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Após serem retirados do banho-maria, foram acrescentados aos tubos 400µL de acetato de potássio 5M. Misturou-se a solução por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 15294 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para tubos novos, sendo acrescentado a este um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão durante dois minutos e centrifugou-se novamente a 15294 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e novamente tratado com clorofórmio:álcool isoamílico

(24:1), sob as mesmas condições. Posteriormente, a fase superior foi transferida para tubos novos, com cuidado para não tocar na interface inferior, e acrescentados 1000µL de etanol absoluto gelado. Misturou-se a solução vagarosamente e levou-se ao freezer -20°C 'overnight'. Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 20 minutos e descartou-se a fase líquida com cuidado para não dispensar o pellet de DNA. A seguir, o pellet foi lavado com 1000µL de etanol 70% e os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 10 minutos. A fase líquida foi novamente descartada e o pellet foi colocado para secar em câmara de fluxo laminar por cerca de uma hora. Posteriormente, o pellet foi ressuspendido em 80µL de Tampão TE (Tris-HCl 1M pH 8,0 e EDTA 0,5M pH 8,0) por 24 horas à temperatura de 4°C. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um biofotômetro, medindo-se a absorbância de cada amostra em contraste com uma outra de H₂O destilada, livre de DNA, nos comprimentos de onda de 260 e 280nm (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A relação da absorbância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que se estiver no intervalo de 1,8 a 2,0, caracteriza um DNA de boa qualidade.

3.4.2. Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

Para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 utilizou-se o par de oligonucleotídeos ITS1/ITS4 (White et al, 1990), para um fragmento esperado de cerca de 650 pb. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se tampão 1X (KCl 50mM, TRIS-HCl 200mM, pH 8,4); MgCl₂ 2mM; dNTP's 0,2mM, 1,5U de Taq DNA polimerase, oligonucleotídeos iniciadores ITS1/ITS4 5pmol, 90ng de DNA genômico e água pura estéril q.s.p. 30µL. Para a amplificação, as reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller - MJ Research, inc., sendo utilizados 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 39 ciclos a 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 60°C e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. As

amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0 %, contendo brometo de etídio (0,5µg/mL) e padrão de concentração pGEM, e após foram visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação (GEL DOC 1000 – BioRad).

O DNA do fragmento amplificado foi então submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. O programa de termociclagem foi o mesmo utilizado para a amplificação dos fragmentos desta região, sendo a temperatura de melting alterada apenas para a reação com o oligonucleotídeo ITS4 para 53°C.

As amostras foram precipitadas em 80µL de isopropanol 75% e deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após serem centrifugadas a 3220 x g, 15°C, por 45 minutos, as amostras foram lavadas com etanol 70% e ressuspensas em 9µL de 'loading buffer' padrão (5:1 formamida deionizada/ EDTA 50mM, pH 8.0) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. Para sequenciamento utilizou-se o sequenciador *ABI Prism 3700 DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, USA).

3.4.3. Análise das seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2

Os eletroferogramas obtidos foram visualizados e analisados por meio do *software ABI Analysis Data Collection* e posteriormente convertidos em seqüência de nucleotídeos por meio do *software DNA Sequencing Analysis Software* Versão 3.3. Os eletroferogramas gerados pelo processo de sequenciamento foram submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Gordon et al., 1998) e SequencherTM 4.05 (Gene Codes Corp, Ann Arbor, USA), para verificação da sua qualidade, alinhamento e corte das extremidades. As quatro seqüências obtidas dessa região para cada isolado foram alinhadas e a seqüência consenso exportada para um arquivo de seqüência destinado a análises posteriores. A montagem das seqüências consenso foi realizada

pelo software *Sequencher*. Manteve-se a exigência de pelo menos 200 pares de bases com qualidade maior do que 30 para que a sequência fosse utilizada nas análises.

A sequência consenso obtida de cada isolado foi definida como uma OTU (Operational Taxonomic Unit). As sequências de nucleotídeos obtidas para cada isolado foram comparadas com sequências do banco de dados GenBank (acessado através do NCBI - National Center for Biotechnology Information) utilizando o software BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Uma vez que a sequência de DNA apresentou homologia com as sequências da mesma região depositadas no GenBank e pertencentes a *Colletotrichum gloeosporioides*, realizou-se a montagem do arquivo de sequências para as análises de relações filogenéticas.

Os arquivos gerados para cada hospedeiro (variedade) e região geográfica foram alinhados em conjunto, para que todos tivessem o mesmo tamanho de arquivo e pudessem ser analisados conjuntamente e entre si, em diferentes combinações. Para tanto, as sequências foram preparadas no software Mega (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - Versão 4.0) (TAMURA et al., 2007), que realiza o alinhamento através da ferramenta Clustal W (THOMPSON et al., 1994), permitindo a exportação dos arquivos alinhados em formato reconhecido pelo softwares utilizados nas análises posteriores.

3.4.4. Análise das relações filogenéticas e da diversidade genética entre as populações de *Colletotrichum gloeosporioides* através de sequenciamento de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2

As sequências alinhadas foram utilizadas na construção de dendrogramas para inferirem as relações filogenéticas estabelecidas entre os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Os dendrogramas foram construídos pelo método da distância, com o algoritmo de agrupamento Neighbor Joining (SAITOU & NEI, 1987) e modelo de

substituição de Tamura-3-parameter (TAMURA, 1992), através do software Mega 4.0. Para assegurar a confiabilidade do agrupamento foi realizado o teste de bootstrap (Felsenstein, 1985) com 1000 repetições, utilizando o mesmo software. Em cada arquivo foram incluídas seqüências pertencentes a diferentes espécies de *Colletotrichum* e algumas outras pertencentes ao filo Ascomycota, cadastradas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov): *C. gloeosporioides* (ID: AB439815.1), *Colletotrichum dematium* (ID: AB455254.1), *Glomerella graminicola* (ID: AB439812.1); *Glomerella acutata* (ID: AB444085.1) e *Glomerella tucumanensis* (ID: AB462376.1), *Fusarium sambucinum* (ID: FSU38277), *Guignardia mangiferae* (ID: AB041241.1) e *Penicillium cecidicola* (ID: AB457008.1). Essas seqüências do GenBank foram selecionadas em detrimento de outras disponíveis, das mesmas espécies, por terem maior tamanho em pares de bases e por estarem melhor identificadas. Também foi realizada uma análise para verificar a similaridade da região ITS1-5.8S-ITS2 de cada um dos isolados com as seqüências pertencentes ao GenBank. Foi considerado como de mesma espécie todos os isolados que apresentaram similaridade igual ou superior a 97%. Com similaridade de 90 a 95%, considerou-se de mesmo gênero e, de diferentes espécies para similaridade menor que 90%. A diversidade genética também foi analisada através do cálculo das distâncias genéticas entre isolados de mesmo grupo e entre isolados de diferentes grupos, por meio do software Mega 4.0.

3.4.5. RFLP da região ITS1-5.8S-ITS28jj

Para estudos de polimorfismo da região ITS dos isolados foram utilizadas quatro enzimas de restrição, *AluI*, *HhaI*, *MspI*, *TaqI*. Para os tratamentos com as enzimas utilizaram-se alíquotas de 3µL do produto da reação ITS, tampão específico para cada enzima e, 1U das enzimas, com exceção da *MspI*, da qual foram usadas 2U. Os tubos eppendorf de 0,2mL contendo as enzimas *AluI*, *HhaI* e *MspI* foram incubados a 37°C, ao passo que os contendo a enzima *TaqI* foram incubados a 65°C, todos por 12 horas.

Os fragmentos de restrição gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.5. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de mangueira ‘Tommy Atkins’ e ‘Espada Vermelha’

Na caracterização patogênica foram empregados os mesmos isolados descritos e citados na Tabela 1. Todos os isolados foram previamente mantidos em placas de Petri contendo meio BDA e incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufas para B.O.D., por 7 dias. Posteriormente, para cada uma das placas contendo os isolados foram depositado 10 mL de água destilada e esterilizada, a partir das quais foi obtida suspensão conidial, a qual foi subsequente filtrada em camada dupla de gaze esterilizada e, mediante ao uso da câmara de Neubauer, procedeu-se a calibração da concentração, sendo padronizada para 10^6 conídios/mL.

No teste de patogenicidade foram empregadas folhas sadias e íntegras de mangueiras das variedades Tommy Atkins e Espada Vermelha, de maturação fisiologicamente semelhante e próximas ao seu enrijecimento, provenientes de plantas localizadas em pomar no município de Monte Alto/SP. Tais folhas foram inicialmente selecionadas quanto à sua conformidade, seguido de lavagem com água corrente e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v), por 2 min. Posteriormente, as folhas foram enxaguadas por duas vezes em água destilada e deixadas para enxugar sobre papel toalha, à temperatura ambiente.



Figura 7 – Folhas de mangueira utilizadas para o teste de patogenicidade: (1) Tommy Atkins; (2) Espada Vermelha.

Em cada folha, em área previamente demarcada na região próxima à nervura central, procedeu-se um microferimento com agulha, seguido da deposição de uma gota contendo 70 μ L da suspensão conidial. Após a inoculação as folhas foram colocadas em bandejas de isopor de 30x40 cm, revestidas com papel toalha umedecido. No pecíolo de cada uma das folhas foi colocado um chumaço de algodão embebido em água, visando à manutenção da sua turgidez. A seguir, as bandejas foram seladas com filme de PVC e armazenadas em ambiente de laboratório, com temperatura média de 25° C $\pm$ 4° C. A partir do segundo dia da inoculação foram realizadas avaliações diárias, em intervalos de 24h, estendendo-se até o 4° dia da inoculação.

A avaliação da patogenicidade consistiu na determinação quanto à presença de sintomas típicos da doença e na mensuração do tamanho das lesões, em dois sentidos diametralmente opostos.

Usou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de uma folha inoculada em quatro pontos. Como controle foram utilizadas folhas com microferimentos, mas que receberam apenas a deposição de 70µL de água esterilizada. Os dados correspondentes ao tamanho das lesões foram analisados mediante análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, considerando-se apenas os da última leitura.

3.6. Detecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em ramos terminais de mangueira ‘Palmer’

O estudo da detecção de *Colletotrichum gloeosporioides* deu-se em brotos formados em ramos contendo panículas secas de mangueiras da variedade Palmer pertencentes a um cultivo comercial, com cinco anos de idade, no município de Monte Alto/SP. A avaliação foi realizada em março de 2009, e consistiu na determinação da incidência de sintomas de antracnose em folhas dos órgãos mencionados, localizados terminalmente. Estes ramos correspondiam ao primeiro surto vegetativo após a colheita, e apresentavam-se com folhas jovens, de até 20 dias de idade, em suas extremidades. Neste levantamento foi avaliada a incidência de antracnose, tomando-se como referência apenas aspectos qualitativos. Os tratamentos foram constituídos de ramos terminais com panículas, sem frutos, e ramos terminais sem panículas.

A amostragem deu-se realizando um caminharmento em zigue-zague no pomar, avaliando-se as folhas com e sem sintomas (manchas necróticas irregulares ou circulares de tamanho variado). Foram avaliadas cinco folhas do último fluxo de brotação, contadas da base para o ápice (TAVARES et al. 2001, com modificação), de

oito ramos por planta, sendo dois por quadrante. O delineamento estatístico foi o de blocos casualizados, com dez repetições. Cada unidade amostral correspondeu à média de duas plantas avaliadas aleatoriamente, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Análise de variância foi realizada utilizando-se o programa AgroEstat®

3.7. Determinação da incidência de antracnose em frutos de mangueiras no Estado de São Paulo

A avaliação de incidência foi realizada a partir de frutos de manga da variedade Palmer, coletados em 24 propriedades rurais, duas em cada região, correspondente à safra 2008/2009, nos meses de janeiro e fevereiro de 2009. As regiões contempladas no estudo foram Jardinópolis, Monte Alto, Vista Alegre do Alto, Cândido Rodrigues, Araçatuba, São José do Rio Preto, General Salgado, Jales, Mogi-Mirim, Ribeirão Preto e Votuporanga, as quais representam as principais regiões produtoras do Estado de São Paulo. Todos os pomares amostrados apresentavam, no mínimo, cinco anos de plantio.

Os pomares avaliados foram divididos em duas categorias: (i) tratamento de Baixo custo (BC), com até 15 aplicações de fungicidas e, (ii) com tratamento de Alto custo (AC), com mais de 15 aplicações de fungicidas. Foram selecionados talhões com características uniformes quanto a idade, condução da lavoura e tratos culturais. Dentre os talhões avaliados, todos apresentavam área de no mínimo dois hectares, com densidade média de 220 plantas/ha. Por ocasião da colheita foram coletadas amostras de 0,5% do total de frutos colhidos nos talhões, em estágio de maturação comercial semelhantes (cerca de 33% do total de frutos em cada colheita), e, no mesmo dia, subdivididos em amostras de 0,1%, as quais representaram as cinco repetições. Cada amostra continha, no mínimo, 100 frutos com mesmo nível de maturação fisiológica.

Após a definição das amostras, os frutos foram colocados em caixas de plástico e mantidos em ambiente do packing-house de processamento, seleção e comercialização de frutas de manga, em Jardinópolis/SP, com temperatura média de 26°C, por 5 dias. Foram considerados positivos os frutos que apresentavam sintomas típicos de antracnose, tomando como critério as descrições feitas por SALES JUNIOR et al., (2004).

Os dados de incidência foram processados com o programa AgroEstat, com aplicação de análise bi fatorial. Para comparação das médias foi aplicado o teste de Tukey a 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização morfométrica dos conídios e dos apressórios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose

4.1.1. Morfometria dos conídios

Os dados referentes às características morfológicas, em termos de formato, comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de tecidos de mangueira com sintomas de antracnose encontram-se apresentados na Tabela 2. Observou-se, ao microscópio óptico, que os conídios são hialinos, unicelulares, retos, com presença de três formas predominantes: (i) oblongo, com extremidades arredondadas; (ii) com constrição na sua região mediana e extremidades arredondadas ; (iii) clavado, obtuso em uma das extremidades e arredondada na outra. Dos 33 isolados avaliados, 30 apresentaram formato oblongo e clavado; nove apresentaram formato apenas oblongo; quatro isolados apresentaram conídios predominantemente clavados e apenas um apresentou formato com constrição ao meio (Tabela 2).

TABELA 2. Frequência de formato (%), comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios (em μm), isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose. Jaboticabal/SP, 2009

Isolado	Formato* (%)			Comprimento (μm)			Largura (μm)			Relação (comp/larg)		
	1	2	3	Média ^x		Amplitude	Média ^x		Amplitude	Média ^x		
28	71	0	29	18,75	a	22,92 15,62	5,08	a	5,21 4,69	3,69	abcde	
45	10	0	90	18,00	ab	23,96 13,54	4,34	abcde	5,21 3,12	4,18	a	
47	100	0	0	17,56	abc	19,79 15,62	4,77	abc	5,21 4,17	3,68	abcde	
15	18	0	82	17,40	abcd	21,87 12,50	4,39	abcde	5,21 3,12	3,96	abc	
43	57	0	43	16,38	abcde	20,83 13,54	4,32	abcde	6,25 3,12	3,89	abcd	
39	0	0	100	15,86	bcdef	20,83 10,42	4,10	bcdefg	5,21 3,12	3,85	abcd	
49	39	0	61	15,45	cdefg	19,79 12,50	4,26	abcde	5,21 3,54	3,63	abcdef	
34	5	0	95	14,99	defgh	18,75 13,33	4,07	bcdefgh	4,37 3,65	3,68	abcde	
32	32	0	68	14,94	defgh	15,62 14,58	4,81	ab	5,21 4,17	3,11	cdefghi	
40	0	0	100	14,71	efghi	19,79 13,54	4,29	abcde	5,21 3,65	3,43	abcdefgh	
22	0	0	100	14,47	efghi	18,75 11,46	3,85	cdefgh	4,69 3,12	3,77	abcd	
23	40	0	60	14,44	efghi	15,62 13,54	3,90	bcdefgh	4,69 3,12	3,73	abcd	
38	75	0	25	14,43	efghi	15,62 12,50	4,27	abcde	4,69 4,17	3,38	abcdefgh	
37	40	0	60	14,38	efghi	17,71 13,54	4,03	bcdefgh	5,21 3,12	3,59	abcdefg	
35	12	0	88	13,95	efghij	15,62 12,50	3,32	fghi	4,17 2,92	4,21	a	
46	100	0	0	13,62	fghijk	15,10 12,50	4,14	bcdef	4,27 3,96	3,29	bcdefgh	
29	100	0	0	13,36	fghijkl	14,58 12,50	4,13	bcdef	4,90 3,12	3,24	bcdefgh	

24	20	0	80	13,05	ghijkl	14,58	11,46	3,15	hi	4,17	2,60	4,16	a
7	10	0	90	13,02	ghijkl	15,62	10,42	3,22	fghi	4,17	2,08	4,05	ab
18	60	0	40	12,99	ghijkl	14,58	11,46	3,26	fghi	3,65	2,60	4,00	ab
31	100	0	0	12,89	hijkl	14,06	11,46	3,92	bcdefgh	4,69	3,12	3,30	bcdefgh
54	100	0	0	12,82	hijkl	14,58	11,46	4,83	ab	5,21	4,17	2,66	hi
21	14	0	86	12,73	hijkl	14,58	11,46	3,96	bcdefgh	4,69	3,12	3,22	bcdefgh
41	100	0	0	12,64	hijkl	13,54	11,46	3,17	ghi	3,85	2,92	3,99	ab
14	9	0	91	12,59	hijkl	14,06	9,37	3,53	efghi	4,17	2,60	3,59	abcdefg
13	7	0	93	12,51	hijkl	14,58	10,42	3,46	efghi	4,17	3,12	3,61	abcdef
58	100	0	0	12,47	hijkl	14,58	11,46	3,87	cdefgh	4,17	3,12	3,23	bcdefgh
55	0	0	100	12,33	ijkl	14,58	10,42	3,25	fghi	4,17	2,71	3,79	abcd
27	100	0	0	12,26	ijkl	13,54	10,42	4,49	abcd	5,21	3,75	2,74	ghi
17	77	0	33	11,55	jklm	14,58	10,42	4,08	bcdefgh	4,69	3,33	2,83	efghi
8	93	0	7	11,31	klm	12,50	9,90	4,05	bcdefgh	4,69	3,12	2,80	fghi
42	100	0	0	11,05	lm	12,50	10,42	3,60	defghi	4,17	3,12	3,08	defghi
25	0	100	0	9,59	mn	10,42	8,33	4,08	bcdefgh	4,37	3,75	2,35	i
CV (%)				5,60			7,2				7,5		

*Formato dos conídios: (1) oblongo, com extremidade arredondada; (2) com leve constrição na região mediana; (3) clavado, obtuso em uma das extremidades e arredondada na outra. ^xMédias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \geq 0,05$)

O formato dos conídios observados mostra-se semelhante ao descrito por SUTTON (1992), para *C. gloeosporioides*. Os diferentes formatos de conídios em um mesmo isolado, como observado em alguns dos casos analisados, invariavelmente

pode dificultar a classificação taxonômica, quando tal critério é utilizado de forma isolada. Vários autores (SUSSEL, 2005; TOZZE JUNIOR et al., 2006; ANDRADE et al., 2007, TOZZE JUNIOR, 2007) ao avaliar isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de diversas plantas frutíferas e de hortaliças, também observaram a presença de polimorfismo em conídios de fungos desse gênero. Dentre alguns fatores que podem contribuir para esse polimorfismo inclui-se o ambiental, com destaque para o meio de cultura (SUSSEL, 2005). TOZZE JUNIOR et al. (2006), mediante estudos de caracterização morfológica realizados com isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de plantas solanáceas verificaram que diversos deles apresentaram comportamento semelhante ao verificado no presente estudo, ora se assemelhando a *C. gloeosporioides*, ora a *C. acutatum*, em diferentes métodos de avaliação. Entretanto, em que pese as dificuldades do emprego das características morfológicas na taxonomia, de acordo com SUTTON (1992) e CASTILHO et al. (2007) essas podem ser utilizadas na distinção das espécies desse gênero, incluindo *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Com relação ao comprimento dos conídios foram verificadas grandes variações quanto ao mesmo, situando-se numa faixa de 9,59µm a 18,75µm. O mesmo comportamento foi verificado em termos de largura e quanto à relação comprimento/largura, as quais variaram de 3,15µm a 5,08µm e 2,35 µm a 4,21µm, respectivamente (Tabela 2). Entretanto, baseando-se nesses dados e considerando as descrições apresentadas por SUTTON (1992), a maioria dos isolados analisados pode ser classificado como *C. gloeosporioides*. Segundo esse autor, *C. gloeosporioides* apresenta conídios retos, cilíndricos, de extremidade arredondada, com comprimento entre 12µm e 17 µm e largura entre 3,5µm e 6µm. Entretanto, diferenças marcantes foram observadas quanto à relação comprimento/largura em oito isolados (35, 45, 24, 7, 18, 41 e 15), os quais apresentaram valor superior a 3,9. ANDRADE et al. (2007), estudando isolados de *Colletotrichum* obtidos de tecidos de mamoeiros com sintomas de antracnose, também observaram que em alguns deles essa relação também divergiu entre os mesmos. Porém, conforme as demais características analisadas, esses ainda

se enquadraram em *C. gloeosporioides*. No presente estudo foi também observado que o isolado 25 continha conídios cilíndricos, porém com leve constrição na sua região mediana. A relação comprimento/largura neste isolado foi de 2,35, estando, pois, dentro dos limites atribuídos para *C. gloeosporioides*. Por outro lado, os isolados 28, 45 e 47 apresentaram conídios cujas medidas foram de tamanho superior à descrição apresentada por SUTTON (1992), necessitando, assim, de avaliações complementares para uma definição mais conclusiva.

Dificuldades na caracterização taxonômica de fungos do gênero *Colletotrichum*, quando do emprego de dados morfológicos, já foram apontadas por CASTILHO et al. (2007) quando do estudo de isolados obtidos de plantas solanáceas, os quais concluíram acerca da necessidade de estudos complementares visando uma caracterização taxonômica mais segura e de maior confiabilidade.

4.1.2. Morfometria dos apressórios

Dentre os isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de tecidos de mangueira com sintomas de antracnose foram encontrados apressórios de formato predominantemente lobulado, e outros de formato irregular ou arredondado (Tabela 3).

TABELA 3. Frequência de formato (%), comprimento, largura e relação comprimento/largura de apressórios (em μm), de conídios de isolados de *Colletotrichum* obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose. Jaboticabal/SP, 2009

										Relação (comp/larg)	
Formato*		Comprimento (µm)				Largura (µm)					
Isolado	Predominante	Média ^x		Amplitude		Média ^x		Amplitude		Média ^x	
55	Lobulado	12.47	a	14.58	11.46	3.87	d	4.17	3.12	3.23	a

54	Lobulado	10,24	b	13,54	8,33	5,99	abc	7,29	5,21	1,71	b
49	Lobulado	9,46	bc	10,42	7,29	6,68	ab	8,33	5,21	1,42	cdef
25	Lobulado	9,09	bcd	10,42	7,29	5,56	abc	6,25	4,17	1,64	bc
15	Lobulado	9,03	bcde	10,42	7,29	6,35	abc	8,33	4,90	1,42	cdef
8	Frac. Lobulado	8,88	bcdef	14,58	6,25	6,59	abc	10,42	5,10	1,34	def
28	Lobulado	8,80	bcdef	12,50	7,29	6,54	abc	8,33	5,21	1,34	def
23	Arredondado, liso	8,74	bcdef	10,42	6,25	6,89	a	8,33	5,21	1,27	ef
31	Lobulado	8,66	bcdef	9,37	7,29	6,57	abc	7,29	6,25	1,32	def
21	Lobulado	8,62	bcdef	10,42	7,29	6,31	abc	7,81	5,21	1,37	def
27	Lobulado	8,45	bcdef	10,42	1,04	6,48	abc	7,29	5,21	1,30	def
13	Lobulado	8,22	bcdef	9,37	7,29	5,38	abcd	6,46	4,17	1,53	bcd
47	Lobulado	8,16	bcdef	9,37	6,25	5,50	abc	7,29	5,21	1,48	bcde
38	Lobulado	8,16	bcdef	10,42	7,29	6,08	abc	8,33	4,17	1,35	def
35	Lobulado	7,99	cdef	9,37	6,25	5,24	bcd	7,29	4,17	1,53	bcd
39	Frac. Lobulado	7,96	cdef	10,42	6,25	6,34	abc	9,37	4,17	1,26	ef
43	Lobulado	7,87	cdef	9,37	6,25	5,84	abc	7,29	5,21	1,35	def
18	Frac. Lobulado	7,78	cdef	9,37	6,25	5,31	abcd	7,29	4,17	1,47	bcdef
29	Lobulado	7,58	cdef	9,37	6,25	5,79	abc	7,29	4,17	1,31	def
41	Lobulado	7,58	cdef	9,37	6,25	5,61	abc	7,29	4,69	1,35	def
40	Lobulado	7,58	cdef	9,37	6,25	5,70	abc	6,25	4,69	1,33	def
42	Lobulado	7,55	cdef	8,33	6,25	5,90	abc	7,29	4,17	1,28	def
34	Frac. Lobulado	7,52	cdef	9,37	6,25	6,19	abc	8,33	5,21	1,22	F
37	Lobulado	7,52	cdef	9,37	6,25	5,90	abc	7,29	5,21	1,28	Def
22	Arredondado, liso	7,47	cdef	8,33	1,04	5,35	abcd	6,25	4,17	1,40	Cdef

46	Lobulado	7,44	cdef	9,37	6,25	6,08	abc	7,29	5,21	1,22	F
17	Frac. Lobulado	7,41	cdef	9,37	1,04	5,50	abc	6,25	4,17	1,36	Def
24	Lobulado	7,41	cdef	10,42	6,25	4,98	cd	8,33	3,65	1,49	Bcde
58	Frac. Lobulado	7,35	cdef	9,37	6,25	5,73	abc	7,29	4,17	1,29	Def
32	Lobulado	7,29	def	8,33	6,25	5,61	abc	7,29	4,17	1,30	Def
45	Lobulado	7,06	def	8,33	6,25	5,61	abc	7,29	4,17	1,26	Ef
14	Lobulado	6,89	ef	10,42	4,48	5,27	bcd	8,33	4,06	1,30	Def
7	Arredondado, liso	6,85	f	7,60	6,25	5,17	bcd	5,31	5,00	1,32	Def
CV (%)		8,1				8,5				5,4	

*Formato: (1) irregular e lobulado: com as margens onduladas; (2) irregular e fracamente lobulado: com as margens pouco onduladas; (3) arredondado e liso: com as margens sem ondulação. ^XMédias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \geq 0,05$).

A literatura aponta a existência de variabilidade muito alta no formato de apressórios de *Colletotrichum* sp. (MAFACIOLI et al., 2006; TOZZE JUNIOR et al., 2006; ANDRADE et al. 2007). Segundo TOZZE JUNIOR et al. (2006), há casos em que um mesmo isolado apresenta diferentes formas de apressórios, assim como um mesmo conídio formar apressórios diferentes um do outro. Em vista disso, denota-se, para o caso dessa característica, uma grande dificuldade no estabelecimento de agrupamentos para a espécie.

4.1.3. Avaliação conjunta dos conídios e dos apressórios

Tomando-se como referência os dados obtidos e, segundo as descrições feitas por SUTTON (1992), assim como outras descrições fenotípicas observadas, como tamanho e comprimento de conídios, admite-se que dentre os 33 isolados de *C.*

gloeosporioides estudados, 31 deles se enquadraram na espécie *C. gloeosporioides* (Tabelas 2 e 3), com divergências apenas para os isolados 22 e 23, os quais apresentaram características morfológicas que não se enquadraram na espécie citada. Tais isolados apresentavam conídios predominantemente cilíndricos e clavados, com tamanho de 11µm a 17,5µm de comprimento e 3µm a 5µm de largura e apressórios predominantemente arredondados e de paredes lisas, com dimensões variando de 8µm a 9 µm de comprimento por 6µm a 6,5 µm largura. Tais características morfológicas se assemelham às descritas para *C. gloeosporioides* var. *minus*, conforme apresentado por SUTTON (1992).

Dentre os isolados de *C. gloeosporioides* avaliados nenhum deles apresentou conídios fusiformes, de extremidades obtusas, características essas típicas de *C. acutatum*. Embora a distinção entre espécies de *Colletotrichum* com base nas características de conídios e apressórios mostre-se dificultada dada à sobreposição dos valores, a maioria dos isolados de *C. gloeosporioides* avaliados apresentou dimensões que se enquadraram na faixa descrita por SUTTON (1992) para as espécies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* var. *minus*.

Estudos moleculares aliados aos estudos morfológicos mostram-se como um dos melhores procedimentos para a distinção de espécie, para diversas espécies de fungos, incluindo *Colletotrichum* spp.. As características morfológicas são muito importantes do ponto de vista operacional, já que se constituem em subsídios primários para a identificação. Conseqüentemente, outras ferramentas como marcadores moleculares devem ser empregadas para amparar a identificação de espécies cujas análises das características morfológicas não tenham proporcionado o nível de confiança necessário.

4.1.4. Efeito da temperatura no crescimento de colônias de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose

Observou-se diferença estatisticamente significativa no comportamento dos isolados de *C. gloeosporioides* quando expostos a diferentes temperaturas (Tabela 4). Em termos gerais, com exceção dos isolados 7, 13, 24, 25 e 27, os quais apresentaram maior desenvolvimento a 30°C (Figura 8), todos os isolados de *C. gloeosporioides* avaliados apresentaram maiores velocidades de crescimento a 25°C (Figura 9). O aspecto das colônias de *Colletotrichum* quando expostas às temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30°C encontram-se representado por meio da Figura 10.

TABELA 4. Efeito de diferentes temperaturas em meio de cultura BDA, no crescimento micelial diário de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, após incubação por cinco dias, com fotoperíodo de 12 horas.

Isolados	Médias de crescimento micelial diário (mm/dia)							
	15 ° C		20° C		25 °C		30 °C	
32	5,20	ab C	12,53	ab B	16,00	a A	16,00	a A
41	2,40	bcd C	10,13	abcdef B	16,00	a A	11,67	bcdefghi B
46	3,33	abcd C	10,73	abcde B	14,73	ab A	13,47	abcdef A
58	2,60	bcd C	9,80	abcdef B	14,60	abc A	13,53	abcde A
55	0,07	cd C	9,53	cdef B	14,47	Abcd A	11,07	defghi B
21	2,73	abcd D	9,20	cdef C	14,07	abcde A	11,60	cdefghi B
29	5,20	ab B	12,67	a A	13,67	abcdef A	13,33	abcdefg A
22	2,00	cd C	11,33	abcd B	13,47	abcdefg A	10,47	ghi B
34	1,60	d C	8,07	ef B	13,40	abcdefg A	9,67	hi B
13	4,27	abcd C	11,27	abcd B	13,40	abcdefg A	14,53	ab A
24	4,13	abcd C	10,80	abcde B	13,33	abcdefg A	14,47	abc A
54	1,73	d C	8,87	def B	13,33	abcdefg A	9,53	i B
35	2,93	abcd C	8,73	def B	13,33	abcdefg A	10,27	hi B
7	2,87	abcd C	9,87	abcdef B	13,27	abcdefg A	14,20	abc A

39	3,27	abcd	C	10,00	abcdef	B	13,20	abcdefg	A	9,87	hi	B
27	2,87	abcd	C	9,53	cdef	B	13,07	bcdefg	A	13,67	abcd	A
15	2,47	bcd	C	8,80	def	B	13,00	bcdefg	A	11,93	bcdefghi	A
47	2,60	bcd	C	8,27	ef	B	12,53	bcdefgh	A	10,13	hi	B
31	2,73	abcd	C	8,80	def	B	12,47	bcdefgh	A	10,53	ghiA	B
23	2,33	bcd	C	9,13	cdef	B	12,40	bcdefgh	A	9,67	hi	B
40	3,33	abcd	C	9,13	cdef	B	12,33	bcdefgh	A	10,13	hi	B
45	3,20	abcd	B	10,33	abcde	A	12,27	bcdefgh	A	10,47	ghi	A
42	4,73	abc	C	9,60	cdef	B	11,93	bcdefgh	A	10,67	efghi	AB
8	3,80	abcd	C	8,73	def	B	11,80	cdefgh	A	11,13	defghi	A
38	2,93	abcd	C	8,80	def	B	11,73	cdefgh	A	10,60	fghi	AB
25	4,27	abcd	C	9,20	cdef	B	11,60	defgh	A	12,47	bcdefgh	A
49	4,07	abcd	B	10,67	abcde	A	11,60	defgh	A	11,20	defghi	A
28	2,73	abcd	B	9,73	acdef	A	11,47	Efgh	A	9,73	hi	A
43	2,20	cd	C	8,13	ef	B	11,27	Efgh	A	9,93	hi	AB
17	3,20	abcd	C	8,13	ef	B	11,20	Efgh	A	10,20	hi	A
37	2,33	bcd	C	8,87	def	B	10,80	fgh	AB	10,87	defghi	A
18	1,80	d	C	8,27	ef	B	10,73	gh	A	9,80	hi	AB
14	2,13	cd	C	7,40	f	B	9,87	h	A	9,80	hi	A

Dados não transformados. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \geq 0,05$). CV=10%

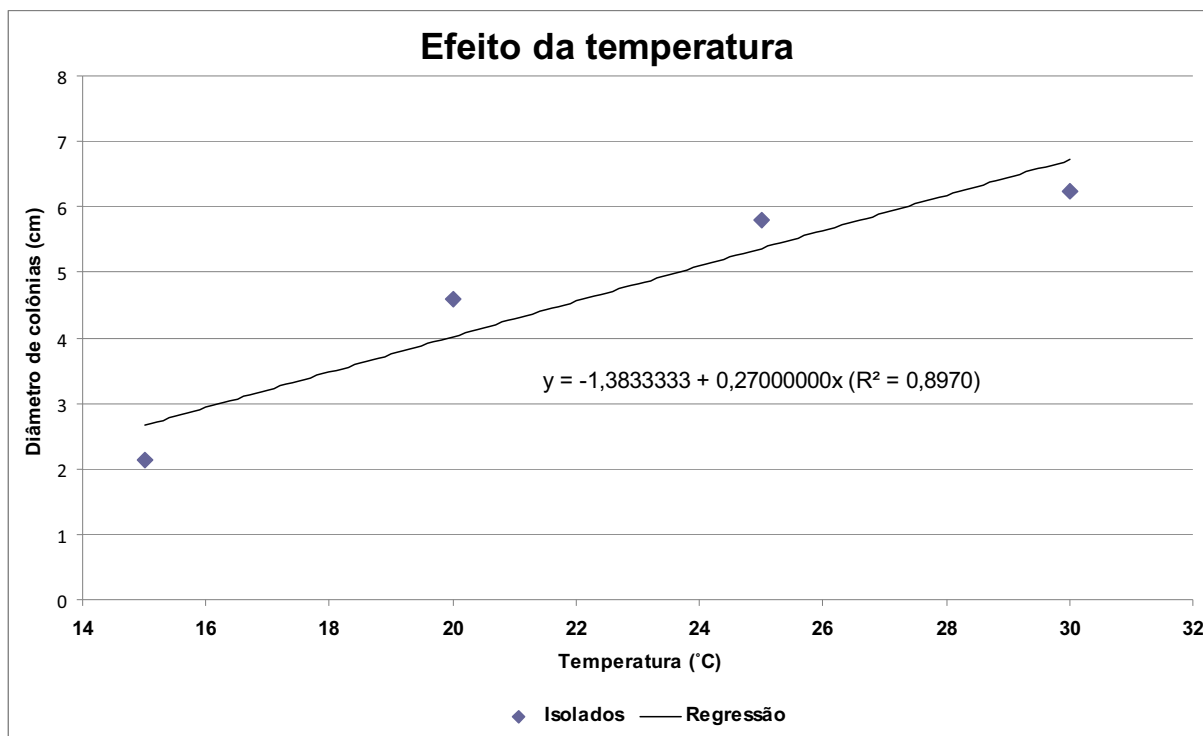


Figura 8 - Efeito de diferentes temperaturas em meio de cultura BDA no crescimento micelial médio dos isolados 7, 13, 24, 25 e 27, em cm/dia, de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, após incubação por cinco dias, com fotoperíodo de 12 horas.

De acordo com a literatura, para a maioria das espécies de *Colletotrichum* a temperatura ideal para o crescimento vegetativo é de 25° C a 30° C (SMITH & BLACK, 1990; GUNNEL & GUBLER, 1992; SUTTON, 1992). TOZZE JUNIOR et al. (2006), inclusive, comparando o padrão de crescimento das colônias de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de plantas solanáceas, observaram que o melhor desenvolvimento das colônias deu-se na faixa de temperatura entre 25° C e 28°C. VINNERE (2004), em seus estudos também verificou que a temperatura ótima para o crescimento das colônias de *C. gloeosporioides* situou-se entre 26 °C - 28,5°C, de tal forma que os resultados ora obtidos mostram-se convergentes àqueles contidos na literatura.

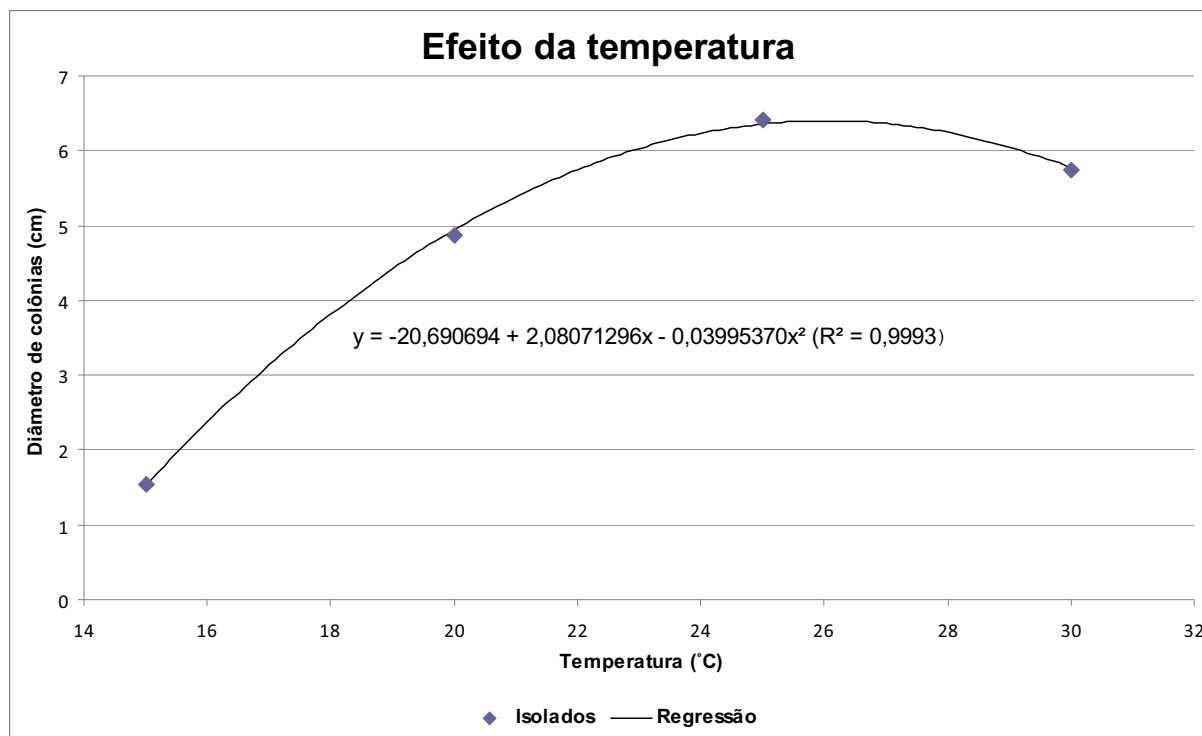


Figura 9 - Efeito de diferentes temperaturas em meio de cultura BDA no crescimento micelial médio, em cm/dia, de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, após incubação por cinco dias, com fotoperíodo de 12 horas.

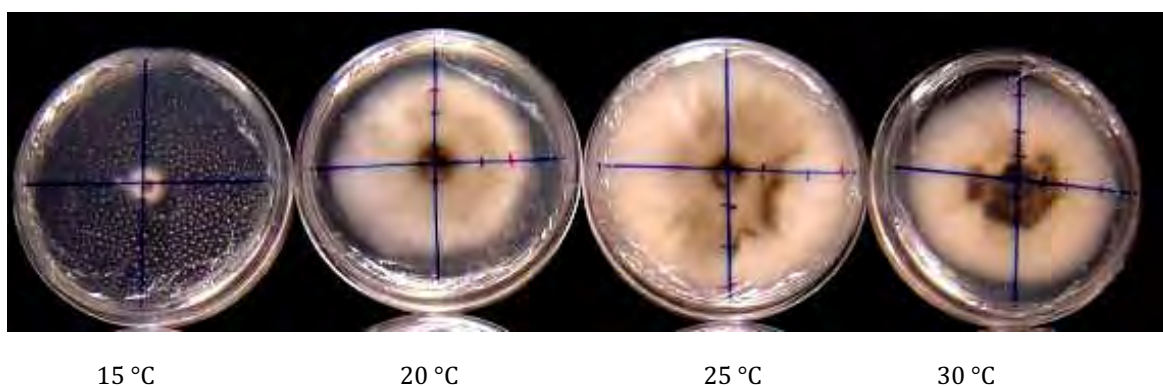


Figura 10 – Aspecto de colônias de isolados de *Colletotrichum* obtidos de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose e expostos a diferentes temperaturas, em meio de cultura BDA, após cinco dias de incubação e fotoperíodo de 12 horas.

Em termos de crescimento diário de colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, foi observado que a 25 °C praticamente todos os isolados apresentaram crescimento médio superior a 10 mm/dia. Entretanto, para o caso dos isolados 32 e 41 a velocidade média foi de 16 mm/dia. De acordo com TOZZE JUNIOR (2007), quando em meio BDA e à temperatura 25° C, *C. gloeosporioides* apresenta uma taxa de crescimento diário superior a 10 mm/dia, enquanto *C. acutatum* situa-se próximo a 8 mm/dia. Esse comportamento diferenciado de ambas as espécies também foi reportado por SUTTON (1992), segundo o qual a velocidade de desenvolvimento de *C. gloeosporioides* é maior, quando comparada à de *C. acutatum*. Depreende-se, assim, que em função da velocidade de crescimento observada para os isolados do presente estudo, que os mesmos pertencem à espécie *C. gloeosporioides*, confirmando os resultados obtidos pelas análises morfológicas dos 33 isolados avaliados, incluindo os três isolados adicionais que apresentaram características morfológicas divergentes dos demais.

Em termos de coloração e aspecto de colônias dos 33 isolados de *C. gloeosporioides* avaliados foi observado que esses mostraram-se muito heterogêneos, cuja coloração variou de branco a cinza-escuro, e colônias que exibiam aspecto ralo a denso. Nesse contexto, os isolados analisados foram enquadrados em sete grupos (Tabela 5). No grupo A, com 11 isolados, corresponderam à maioria dos isolados analisados (33%); dois isolados (39 e 38) foram classificados no grupo B, e outros dois (24 e 27) no grupo C; três isolados (23, 49 e 40) foram enquadrados no grupo D. O grupo E foi constituído por nove isolados (43, 15, 37, 42, 7, 13, 21, 34 e 31), enquanto que o 28 e 29 enquadraram-se no grupo F. No grupo G foram enquadrados os isolados 45, 46 e 55, e no ultimo grupo somente o isolado 32.

TABELA 5. Aspectos culturais dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de mangueira, desenvolvidos em meio BDA, após 7 dias de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

grupos	cor da colônia	micélio aéreo	reverso da colônia	borda
A	branca	denso, baixo ou alto, cotonoso ou floculoso	branco com centro: branco, cinza, castanho, verde claro e negro	branca regular e ou irregular
B	branca	ralo, baixo, floculoso	branco com centro castanho	branca regular
C	cinza claro	denso, baixo ou alto, cotonoso	salmão esverdeado com centro castanho	branca, irregular
D	cinza claro	denso, baixo, floculoso	branco com bordas e centro esverdeado e ou pontos negros	branca, regular
E	cinza claro	ralo, baixo, cotonoso	branco com centro: branco, cinza, castanho, verde, claro e negro	branca, regular
F	cinza claro com centro negro	denso, baixo ou alto, cotonoso ou floculoso	cinza ou castanho	branca, regular
H	cinza escuro	denso, baixo ou alto, cotonoso	cinza escuro com centro negro e ou salmon com anéis concêntricos	branca, regular
G	cinza escuro	ralo, baixo, cotonoso	cinza escuro e salmão com pontos negros e anéis concêntricos	cinza, regular

ANDRADE et al. (2007), quando da avaliação de 33 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de mamão com sintomas de antracnose, encontraram grupos que apresentaram coloração de colônias distintas, variando de branco a cinza-escuro, de características semelhantes às observadas no presente estudo. PERES et al. (2002) analisaram oito isolados de *C. gloeosporioides* de mamão, e também observaram tipos

distintos de colônias, além de mudança na sua coloração, de acordo com o meio de cultura utilizado. ADASKAVEG & HARTIN (1997) caracterizaram oito isolados de *C. gloeosporioides* de mamão. Segundo esses pesquisadores tais isolados apresentavam micélio aéreo de coloração cinza a cinza-claro a esverdeado, no reverso das colônias. Tal descrição coincide à observada para as colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de tecidos de mangueiras e avaliados no presente estudo, e que foram enquadrados nos grupos C, D e E (Tabela 5).

Os setores em culturas de fungos são caracterizados pela presença de colônias de coloração consistentemente alterada, diferentes daquelas usuais quando em um ambiente padronizado. Nesse contexto, setores foram consistentemente observados em culturas dos isolados 8, 13, 27, 37 e 45 (Tabela 6 e Figura 11 B). SUSSEL (2005) atribuiu o fato de poucos isolados apresentarem setores à utilização de culturas monospórica, o que reduz a variabilidade de cada isolado, fato esse observado no presente trabalho. Por outro lado, a presença de massa conidial, de cor consistentemente salmão, esteve presente apenas nas colônias dos isolados 13, 23, 27, 29, 32 e 46 (Tabela 6 e Figura 11 C). Entretanto, de acordo com SUTTON (1992), essa matriz conidial pode estar presente ou ausente em colônias de *C. gloeosporioides*, não sendo, pois, uma característica importante no estudo de caracterização taxonômica. Fato semelhante foi também observado por SUSSEL (2005), o qual trabalhando com 25 isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de cucurbitáceas com sintomas de antracnose observou que em 12 deles ocorreu a formação típica da massa conidial.

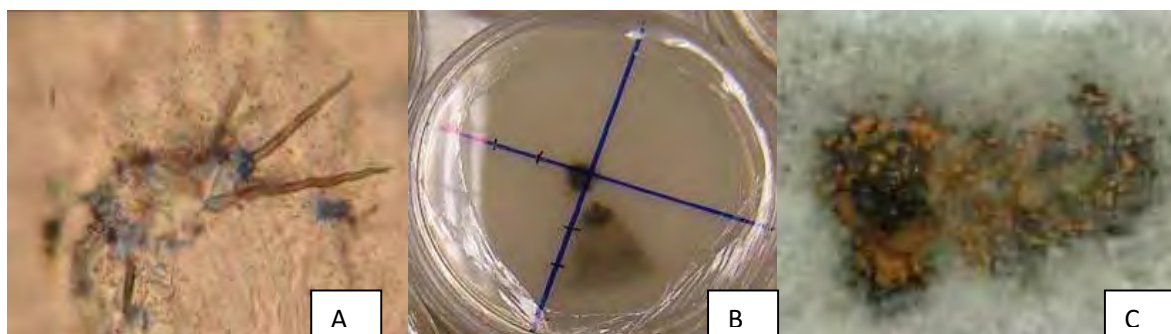


Figura 11 – Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* avaliados: (A) Presença de setas; (B) Formação de setores; (C) presença e coloração de massa conidial.

As setas foram observadas em colônias dos isolados 15, 17, 31, 32 e 39 (Tabela 6 e Figura 11 A), e mostravam-se morfollogicamente semelhantes entre si, em todos os isolados. Tal estrutura apresentava coloração cinza-escuro a negro, e com dimensões médias de 90 μm x 3,5 μm .

A produção de setas em *Colletotrichum* é uma característica variável entre isolados e mostra-se intimamente associada aos hospedeiros. ANDRADE et al. (2007), trabalhando com 33 isolados de mamão verificaram que apenas cinco deles apresentaram setas em meio de cultura PGA (peptona-glucose-ágar), enquanto que, em BDA, não foi observada a presença das mesmas. Dessa forma, denota-se que a presença ou ausência de setas em colônias de *C. gloeosporioides* pode estar associada à composição do meio de cultura, além de fatores ambientais, tais como níveis de aeração, umidade do ar, temperatura e fotoperíodo (ANDRADE et al., 2007).

TABELA 6. Formação de setores, presença e coloração de matriz conidial e presença de setas de isolados de *Colletotrichum* ssp. de mangueira.

Isolados	Setor	Massa conidial	Setas
7	0	ausente	ausente
8	1	ausente	ausente
13	1	salmão	ausente
14	0	ausente	ausente
15	0	ausente	presente
17	0	ausente	presente
18	0	ausente	ausente
21	0	ausente	ausente
22	0	ausente	ausente
23	0	salmão	ausente
24	0	ausente	ausente
25	0	ausente	ausente
27	1	salmão	ausente
28	0	ausente	ausente
29	0	salmão	ausente
31	0	ausente	presente
32	0	salmão	presente
34	0	ausente	ausente
35	0	ausente	ausente
37	1	ausente	ausente
38	0	ausente	ausente
39	0	ausente	presente

40	0	ausente	ausente
41	0	ausente	ausente
42	0	ausente	ausente
43	0	ausente	ausente
45	1	ausente	ausente
46	0	salmão	ausente
47	0	ausente	ausente
49	0	salmão	ausente
54	0	ausente	ausente
55	0	ausente	ausente
58	0	ausente	ausente

4.2. Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum* spp.

4.2.1. Análise das relações filogenéticas estabelecidas entre as populações por meio de sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

Mediante uso do par de oligonucleotídeos ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990) foi verificado que todos os isolados de *Colletotrichum* avaliados tiveram a região ITS1-5.8S-ITS2 amplificada, para um fragmento esperado de cerca de 650 pb. Após a amplificação e quantificação, o DNA dos isolados foi submetido ao sequenciamento utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos da amplificação, desta vez separados como F e R. Verificou-se que a maioria apresentou sequências de boa qualidade que, após

repetidas, foram alinhadas para obtenção da sequência consenso para início das análises.

Para comparação dos isolados foram utilizadas sequências ITS de outras espécies de *Colletotrichum* spp. e ainda outras pertencentes ao filo Ascomycota, já cadastradas no banco de dados GenBank. Ao analisar a similaridade das sequências obtidas com as depositadas nesse banco de dados verificou-se que todas enquadraram-se na espécie *C. gloeosporioides* e no seu teleomorfo *Glomerella cingulata*, com 100% de similaridade. O dendrograma baseado na análise das sequências amplificadas encontra-se na Figura 12.

Para análise da distância genética entre os isolados compararam-se os isolados de *C. gloeosporioides* do estudo, denominados Grupo A, com as demais sequências de DNA obtidas do banco de dados (Tabela 7).

Conforme evidenciado na Tabela 7 verificou-se que o Grupo A, composto por isolados de *C. gloeosporioides* do estudo, apresentou menor distância genética com a sequência de *C. gloeosporioides* obtida do banco de dados, e maior com *Guignardia mangiferae*. Já a distância genética entre os isolados do Grupo A foi de 0,0009.

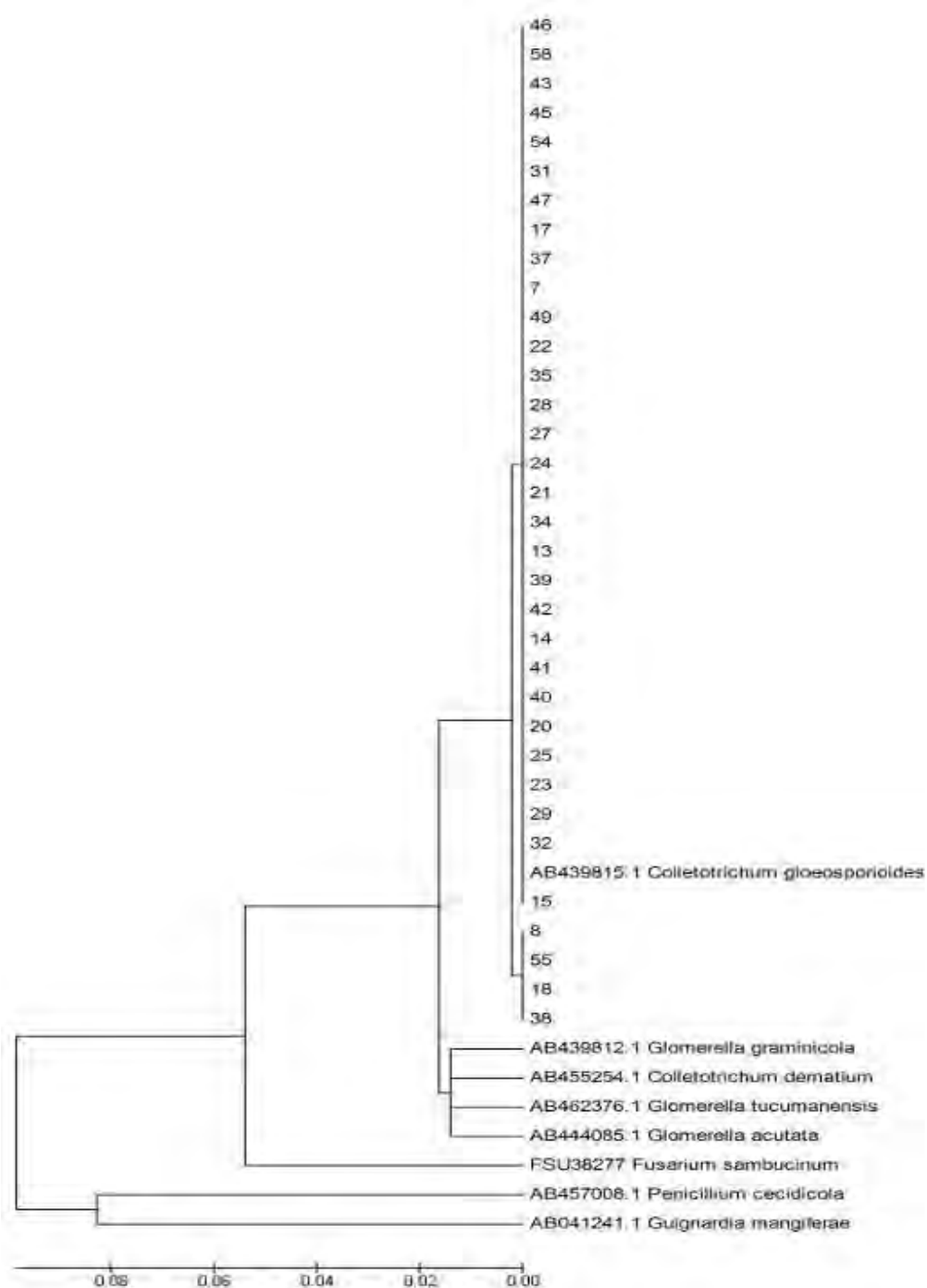


Figura 12. Dendrograma baseado na análise das sequências amplificadas do cístron ITS1-5.8S-ITS2 de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, mostrando o agrupamento dos isolados de acordo com sua similaridade genética.

TABELA 7. Distância genética entre os grupos de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, baseada na análise da região ITS1-5.8S-ITS2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Grupo A									
2. <i>Penicillium cecidicola</i>	0.2058								
3. <i>Guignardia mangiferae</i>	0.2113	0.1773							
4. <i>Glomerella tucumanensis</i>	0.0344	0.2376	0.2282						
5. <i>Glomerella acutata</i>	0.0618	0.2517	0.2472	0.0473					
6. <i>Fusarium sambucinum</i>	0.1128	0.2401	0.2548	0.1196	0.1458				
7. <i>Glomerella graminicola</i>	0.0171	0.2226	0.2228	0.0254	0.0435	0.1171			
8. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.0005	0.2065	0.2120	0.0339	0.0612	0.1122	0.0166		
9. <i>Colletotrichum dematium</i>	0.0173	0.2314	0.2179	0.0166	0.0428	0.1183	0.0168	0.0168	

4.2.2. Análise dos fragmentos de restrição dos produtos amplificados

Os produtos de PCR-ITS1-5.8S-ITS2 após serem submetidos à digestão com quatro enzimas de restrição, *Alul*, *HhaI*, *MspI*, *TaqI*, podem ser observados na Figura 13.

As enzimas *Alul*, *MspI* e *TaqI* foram capazes de digerir por completo o fragmento amplificado de cerca de 650 pb, ao passo que por meio da enzima *HhaI* a digestão foi parcial para alguns materiais do produto amplificado. Este fato pode estar relacionado a não purificação do produto de amplificação antecedendo a reação de restrição, que no caso desta enzima pode ter interferido na reação. O perfil dos isolados foi o mesmo para as enzimas *HhaI* e *TaqI*. Já na digestão com a enzima *Alul* é possível observar que apenas o isolado 32 apresentou um fragmento diferente dos demais. Tal situação também pôde ser observada na digestão com a enzima *MspI* para os isolados 29, 46 e 58. Isso se deve ao fato de que esses isolados têm um sítio de restrição em posição diferente dos demais isolados.

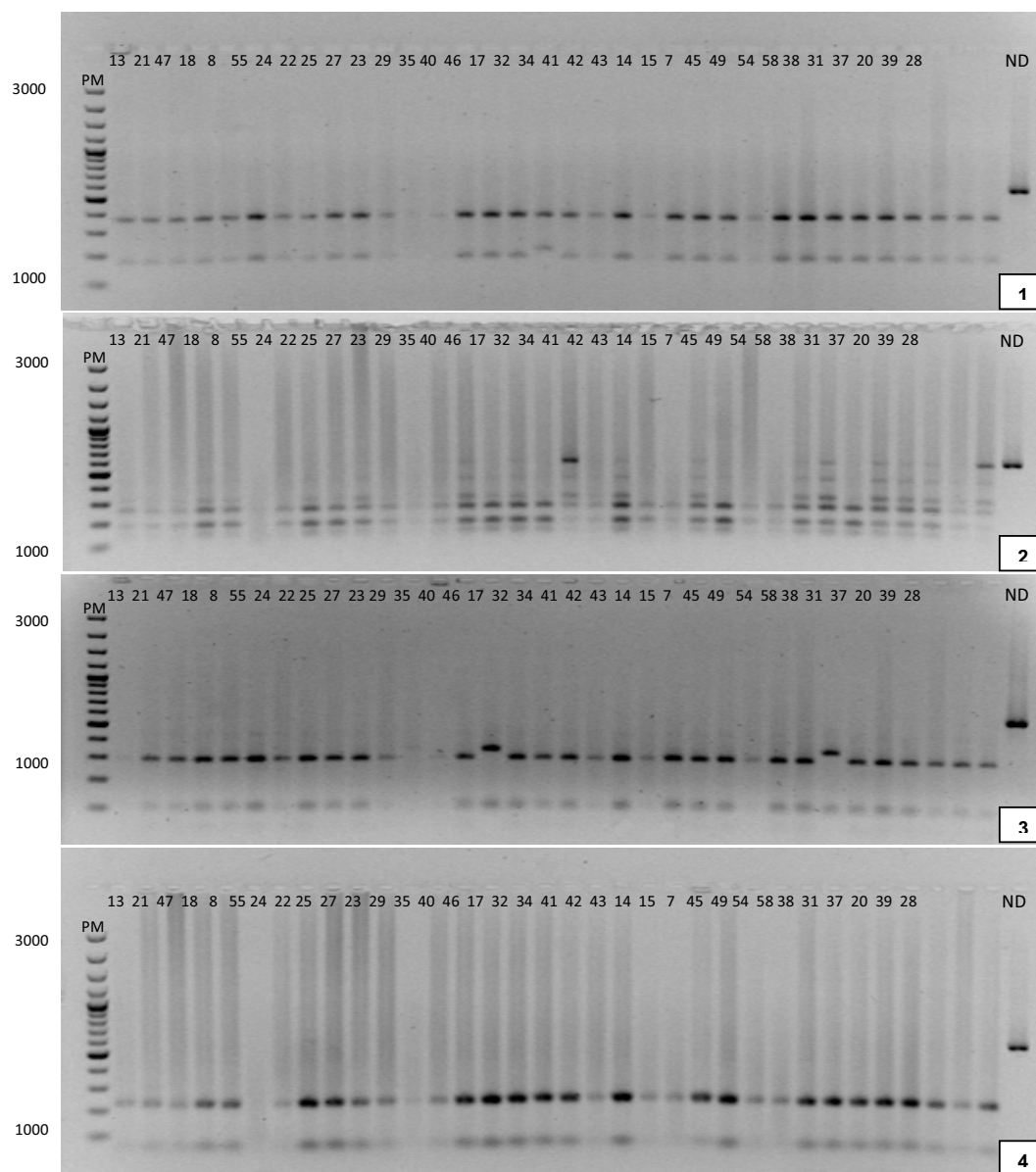


Figura 13. Fragmentos de restrição dos produtos amplificados da região ITS1-5.8S-ITS2 para as enzimas *Alul* (1), *HhaI*(2), *MspI*(3), *TaqI* (4). PM: padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas). ND: produto amplificado não digerido.

4.3. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de mangueira 'Tommy Atkins' e 'Espada Vermelha'

Todos os 33 isolados de *Colletotrichum* obtidos de lesões de tecidos de mangueiras com sintomas de antracnose mostraram-se patogênicos quando inoculados em folhas jovens de mangueiras das cultivares Tommy Atkins e Espada vermelha. Sintomas típicos de antracnose foram observados após quatro dias da inoculação. Inicialmente foram observados pequenos pontos de coloração marrom, evoluindo para manchas pretas, com halo de tecido aquoso, diferente da coloração observada no restante do tecido sintomático. No caso da testemunha as folhas mantiveram-se íntegras, sem apresentar tecido necrosado.

Em função dos resultados de patogenicidade, notadamente quanto ao tamanho médio das lesões, e tomando-se em conta a variedade em questão, os isolados foram enquadrados em quatro grupos designados A, B, C e D. Na Tabela 8 encontra-se apresentada a descrição de cada um dos grupos e o comportamento dos respectivos isolados.

TABELA 8. Comportamento patogênico de 33 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* após quatro dias da inoculação em folhas de mangueira Tommy Atkins.

Grau de patogenicidade *	Diâmetro (mm)	Isolados
A	17,6 - 18,6	8, 14, 15, 18, 21, 24, 29, 32, 34, 38, 45, 47, 54, 58, 55, 17, 35, 39, 41,
B	15,5 - 16,6	13, 23, 28, 31, 22, 27, 37
C	13,4 - 14,5	7, 42, 43, 40, 46,
D	9,3 - 10,4	25, 49

* - Agrupamento de médias através do teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$)

A - Altamente patogênico; B - Patogênico; C - Medianamente patogênico e; D - Patogenicidade baixa

Para o caso da inoculação em folhas de mangueira da cultivar Tommy Atkins, o grupo A foi o que apresentou maior número de isolados patogênicos, em número de 19, enquanto a menor frequência foi verificada no grupo D, com dois isolados (Tabela 8). Para o caso da variedade Espada Vermelha a distribuição dos isolados deu-se de forma menos desuniforme, com sete isolados no grupo A, 11 no grupo B, 14 no grupo C e, de forma semelhante ao observado em relação à variedade Tommy Atkins, apenas um no grupo D (Tabela 9).

TABELA 9. Comportamento patogênico de 33 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* após quatro dias da inoculação em folhas de mangueira Espada vermelha.

Grau de patogenicidade *	Diâmetro (mm)	Isolados
A	16,5 - 18,6	38, 54, 55, 17, 29, 15, 18
B	14,4 - 16,4	14, 21, 28, 37, 45, 47, 58, 22, 24, 31, 34
C	11,4 - 14,3	25, 40, 46, 7, 8, 13, 23, 27, 35, 39, 42, 43, 49, 32
D	9,3 - 11,3	41

* - Agrupamento de médias através do teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$)

A - Altamente patogênico; B - Patogênico; C - Medianamente patogênico e; D - Patogenicidade baixa

Pelos resultados obtidos, além da confirmação da patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* avaliados, tornou-se também evidente a suscetibilidade das variedades utilizadas. Em termos comparativos, ambas as variedades mostraram níveis de suscetibilidade semelhantes, dado esse que se mostra divergente com a literatura, onde, de acordo com CARVALHO et al. (2004), a variedade Tommy Atkins é resistente a *C. gloeosporioides*. É possível, entretanto, que tal divergência deva-se ao ambiente e circunstâncias as quais deram-se a realização dos testes de patogenicidade, muito embora, no presente caso essas tenham sido padronizadas.

Dada à similaridade das condições de ambiente e metodologia empregada na inoculação, as diferenças verificadas quanto ao tamanho das lesões são atribuídas às diferenças de patogenicidade dos isolados, com respostas diferenciadas em termos de quantidade de doença. Essa diferença, em termos de níveis de virulência, embora conceitualmente pode ser atribuída ao efeito da interação isolados x cultivar, com possibilidade de que tal resposta o seja do tipo vertical (FLOR, 1942; VANDERPLANK, 1968). Entretanto, os resultados ora apresentados não permitem estabelecer tal generalização. Em termos comparativos o isolado 41, o qual para folhas de mangueiras da variedade Tommy Atkins mostrou-se como altamente patogênico, para o caso da cultivar Espada Vermelha o foi fracamente patogênico. Também, em função das diferentes respostas observadas não se pode subestimar a possibilidade de melhor adaptação de alguns isolados, o que explicaria as respostas diferenciadas nos níveis de controle observados nos plantios de mangueiras do Estado de São Paulo, não obstante as diferenças bio-ecológicas existentes nesses agroecossistemas.

4.4. Detecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em ramos terminais de mangueira 'Palmer'

No estudo acerca de detecção de *C. gloeosporioides* foi observado que na ausência de panícula a incidência de antracnose foi de 3,64%, enquanto que, na sua presença, essa o foi de 10,24% (Tabela 10). Tal resultado torna evidente, portanto, a importância da presença de panícula infectadas e secas no ciclo da doença, sendo, pois, um dos fatores responsáveis pela presença de sintomas da doença nos ciclos vegetativo e reprodutivo subseqüentes.

TABELA 10. Incidência (%) de antracnose em folhas de mangueira da variedade Palmer, na presença e ausência de panícula. Monte Alto/SP, 2009

Ausência de panícula	3,64 ^{X,Y}	a
Presença de Panícula	10,24	b

^XDados não transformados. ^YMédias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \geq 0,05$)

CV: 13, 3%

A presença de panículas secas e sintomáticas, concomitantemente com a ocorrência de período chuvoso e período vegetativo da mangueira, são condições que predispõem à esporulação e conseqüente liberação dos conídios. Dessa forma, essa configuração espaço-temporal favorável faz com que haja infecções nas vegetações jovens. Esse resultado mostra-se convergente aos apontados por CUNHA et al. (1993), os quais descreveram os diferentes estádios de sobrevivência do fungo, notadamente em ramos mortos, lesões antigas, frutos, panículas e partes afetadas, remanescentes no chão e na planta que, subsequentemente, contribuem para um novo ciclo da doença, quando da presença de condições ambientais favoráveis.

As lesões nas folhas da planta afetada, dependendo do grau de incidência, podem coalescer provocando sua seca, seguido de sua queda. Subsequentemente, se as condições de ambiente não forem favoráveis ao desenvolvimento da doença, a lesão poderá permanecer estável, e o patógeno em estado quiescente. Quando do retorno de condições favoráveis, representadas por longos períodos de chuva e de dias encobertos, ou às vezes da simples ocorrência de intenso orvalho noturno (CUNHA et al., 2000), há a esporulação. Posteriormente ocorre a dispersão dos conídios que, em sendo coincidente com o florescimento e emissão da panícula, propicia à formação de um novo ciclo infeccioso da doença. Tal ciclo, incluindo as

principais fases de infecção das partes da plantas, é descrito por ARAUZ (2000), estando, pois, os dados ora obtidos coincidentes aos apresentados por esse investigador. Dessa forma, a comprovação da relação envolvendo panículas sintomáticas e sua contribuição no processo infeccioso comprova a necessidade do emprego da sanitização, incluindo a remoção das mesmas, visando a eliminação e/ou redução do inóculo primário da doença, como já mencionado por ZAMBOLIM & JUNQUEIRA (2004).

4.5. Determinação da incidência de antracnose em frutos de mangueiras no Estado de São Paulo

Os doze talhões onde se empregaram tecnologia de baixo custo (BC) apresentaram-se bastante homogêneos em termos de incidência de sintomas de antracnose em frutos de manga da variedade Palmer, não havendo diferença entre si. A incidência variou de 52% a 59% (Tabela 11), considerada muito alta do ponto de vista agrônomo. De acordo com recomendação de TAVARES et al. (2001), quando a incidência de sintomas em frutos atingir 5% há a necessidade da adoção de medidas reparadoras, com indicação, portanto, que os níveis de incidência observados superaram em muito os limites agrônômicos estabelecidos por esses investigadores. Provavelmente, esses níveis de incidência redundaram da presença de uma forte pressão de inóculo, ambiente altamente favorável e tratamento ineficiente. É provável, também, que os tratamentos tenham sido realizados de forma aquém dos níveis desejáveis, haja vista a descapitalização dos produtores. Por exemplo, em safras anteriores os preços do produto atingiram médias muito baixas, em trono de R\$0,35 pelo quilo pago nos pomares, enquanto que no presente ano, a média do produto foi de cerca de R\$0,70 por quilo, para a mesma variedade e mesma época (HORTIFRUT, 2009). Outro aspecto importante refere-se à baixa valorização do produto, mesmo quando esse encontra-se com excelente qualidade, quando comparado àqueles praticados para produtos de qualidade inferior. Os produtores de manga, em sua maioria, vendem suas produções para os chamados

“atravessadores”, que as adquirem e vendem às redes de supermercados, assim como para os comerciantes locais. Este tipo de comercialização não agrega a valorização necessária às frutas de qualidade superior, levando a um desbalanço nos itens despesas/receitas e a uma desmotivação do produtor com vistas à obtenção de produtos de melhor qualidade.

TABELA 11. Incidência de antracnose em frutos de manga da variedade Palmer coletados de pomares de 12 municípios do Estado de São Paulo, conduzidos sob condições de manejos de (i) Baixo Custo e (ii) de Alto Custo tecnológico.

Região	Incidência %			
	Baixo custo		Alto custo	
Jales	59,00	a A	28,50	b B
G. Salgado	57,75	a A	28,75	b B
Araçatuba	57,25	a A	31,25	ab B
Monte Alto	56,75	a A	40,00	a B
Vista A. Alto	56,25	a A	33,00	ab B
Taquaritinga	56,00	a A	39,25	a B
Moji - Mirim	55,75	a A	32,50	ab B
Jardinópolis	55,50	a A	33,25	ab B
B. Paulista	54,00	a A	34,00	ab B
Votuporanga	53,75	a A	26,00	b B
S. J. Rio Preto	53,25	a A	30,75	ab B
C. Rodrigues	52,00	a A	34,75	ab B

Dados não transformados. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \geq 0,05$). Pomar de Baixo custo tecnológico refere-se aos pomares que receberam menos de 15 pulverizações de fungicidas, enquanto que os de Alto custo tecnológico receberam acima de 15 pulverizações, além de mais tratamentos culturais.

CV: 9,8%

No caso dos pomares inseridos como os de Alto custo (AC), com mais de quinze pulverizações anuais, os níveis de incidência foram mais baixos que os

aplicados nos pomares de baixa tecnologia (Tabela 11). Os menores valores de incidência foram verificados em frutos oriundos das regiões de Jales, General Salgado e Votuporanga. Entretanto, em termos estatísticos não houve diferença quanto às médias de incidência da doença em frutos provenientes de Araçatuba, Vista Alegre do Alto, Mogi - Mirim, Jardinópolis, Bonfim Paulista, São José do Rio Preto e Cândido Rodrigues.

Os municípios de Votuporanga, General Salgado e Jales estão localizados em região cuja temperatura média, para o período de janeiro a março, é mais alta do que nos demais, situando-se em torno de 26,9° C, enquanto que, para o caso de Monte alto, por exemplo, essa é de 25° C. Tal fato provavelmente reflete no ciclo da cultura, com conseqüente antecipação do desenvolvimento e colheita dos frutos. Além disso, há também diferenças nos padrões pluviométricos, que variam em até 300 mm de chuva de uma região para outra, entre os meses mencionados. A colheita mais precoce dos frutos faz com que o tempo de exposição dos mesmos às infecções seja menor, refletindo nos índices de incidência. Tais municípios se constituem nos principais produtores de manga do Estado de São Paulo, com cerca de 30% da produção total (CAMARGO FILHO et al., 2004).

Houve diferença significativa entre os talhões tratados com diferentes tecnologias. A incidência nas áreas de baixo custo (BC) variou de 52% a 59%, enquanto que nas áreas de melhor nível tecnológico variou de 26% a 40%. Essas diferenças evidenciam a importância da adoção de estratégias de controle de *C. gloeosporioides*, donde se inclui o uso de tratamento químico. Entretanto, os elevados níveis de sintomas observados, mesmos nas áreas enquadradas como de alta tecnologia, são indicações do emprego de tecnologia inadequada no que tange ao controle do patógeno causal. E, nesse contexto, dentre os fatores que podem estar contribuindo para essa elevada incidência de sintomas estão a alta suscetibilidade da variedade Palmer, presença de elevada pressão de inóculo residual, condições ambientais altamente favoráveis para o desenvolvimento do patógeno e expressão dos sintomas, estratégias de controle deficientes e mal-gerenciamento na adoção do controle químico. No caso de elevados índices pluviométricos, em particular, o controle da antracnose fica comprometido dada à

dificuldade da realização das pulverizações, redução da eficiência das mesmas dada à lavagem dos defensivos aplicados, além do favorecimento à dispersão/disseminação do patógeno. Segundo CHOUDHURY et al., (2003), a incidência de antracnose, caso não seja adotado um bom programa de manejo integrado, pode chegar a 80% em período chuvoso. Adicionalmente, a possibilidade da existência de resistência do patógeno aos fungicidas sistêmicos regularmente utilizados no controle do mesmo também não pode ser descartada.

Os elevados níveis de incidência da doença, como ora verificado, evidenciam a importância do tratamento químico, aliado ao manejo adequado da cultura, no controle da antracnose da mangueira, como preconizado por ZAMBOLIM et al. (2002). Tais investigadores priorizam, como referência em vista de um melhor controle do patógeno, as condições climáticas prevalecentes e a intensidade e frequência com que a doença se manifesta. Segundo esses autores o controle do patógeno deve ser baseado em um sistema de acompanhamento da doença no campo e das condições climáticas, principalmente nos períodos de floração, frutificação e colheita, de modo a estabelecer uma estratégia de controle adequada. No caso do Estado de São Paulo, em apenas 20% das áreas plantadas com manga é adotado um nível de tecnologia mais elevado e, nesse grupo incluem-se as empresas exportadoras e/ou os produtores parceiros das mesmas.

CAMPOS (2009), ao realizar revisão bibliográfica e entrevistas com profissionais do agronegócio da manga na Região do Escritório de Desenvolvimento Rural de Jaboticabal mostrou que as condições tecnológicas, organizacionais e de comercialização dos mangicultores, principal produtora do Estado de São Paulo, ainda são muito precárias, necessitando de aprimoramento e novas tecnologias para alcançarem melhores condições de produção, além de melhorias no processo de comercialização, visando, por exemplo, atingir o mercado europeu e norte-americano.

Os resultados ora obtidos tornam evidente a necessidade em se priorizar metas como a redução dos custos de produção e do impacto ambiental e a elevação do rendimento do pomar e da qualidade dos produtos, sem perder de vista o caráter de sustentabilidade do modelo de produção adotado.

5. CONCLUSÕES

- Mediante estudos morfométricos, moleculares e patogênicos de isolados de *Colletotrichum* obtidos de folhas, panículas e frutos de manga com sintomas de antracnose, de diferentes variedades e locais do Estado de São Paulo conclue-se ser os mesmos, na sua totalidade, da espécie *C. gloeosporioides*;
- As variedades Tommy Atkins e Espada Vermelha são igualmente suscetíveis a *C. gloeosporioides*, embora os níveis de severidade sejam mais expressivos na primeira;
- A faixa de temperatura ideal para o crescimento de colônias de *C. gloeosporioides* situa-se entre 25 °C a 27 °C;
- As panículas velhas e sintomáticas existentes em plantas de mangueiras são locais que se constituem em importante fonte de inóculo residual de *C. gloeosporioides*;
- O controle químico é mais uma ferramenta a ser usada dentro do manejo integrado de doenças da mangueira e não deve ser usada de forma isolada é fundamental que o mesmo seja revisto com vistas à redução dos prejuízos e consequente obtenção de produtos de qualidade superior.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, J. E. & HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 979-987 1997.

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura**. Brasileira. São Paulo: FNP, p.364-370, 2009.

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura**. Brasileira. São Paulo: FNP, p.362-369, 2006.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

ANJOS, J. R. N., CHARCHAR, M. J. A. & AKIMOTO, A. K. Ocorrência de antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequizeiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.1, p. 96-98. 2002.

ANUÁRIO DE INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA: **Anuário IEA** 2002. São Paulo, (Sér. inf. estat. agric., v. 12, n. 1). 2003.

ARAUZ, L. F. Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options for Integrated Management, **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 6. p. 600-611, 2000.

ASSIS, T. C. de. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose da mangueira, quanto a utilização de carboidratos, patogenicidade, produção de enzimas e análise de RAPD**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2001.

BACIARELLEI-FALINI, L.; RUBINI, A.; RICCIONI, C.; PAOLOCCI, F. Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of a novel truffle-like morphotypes. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, n. 7, p. 474-484, 2006.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, p. 88-120, 1992.

BAXTER, A. P.; EICKER, A.; DIPPNAR, N. J. Multivariate analysis of some characteristics of South African isolates of *Colletotrichum*. **South African Journal of Botany**. Grahamstown, v. 59, p. 557-565, 1993.

CARRARO, A. F.; CUNHA, M. M. da. **Manual de exportação de frutas**. Brasília: MAARA, 252p. 1994.

CARVALHO, C. R. L, ROSSETTO, C. J.. MANTOVANI, D. M. B., MARCELO ANTÔNIO MORGANO, M. A., CASTRO, J. V. de., BORTOLETTO, N. Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo Instituto Agronômico de Campinas comparadas a outras de importância comercial. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, vol.26, n.2, p. 264-271, 2004.

CAMARGO FILHO, W. P. de; ALVES, H. S.; MAZZEI, A. R. Mercado de Manga no Brasil: contexto mundial, variedades e estacionalidade. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.34, n.5, p. 62-63, 2004.

CAMPOS E. M.: SQUINCA, A. R.: MARTINS M. I. E. G.: PALLA V. L., Análise Econômica da produção de Manga na Região do Escritório de Desenvolvimento Rural de Jaboticabal. Disponível em: www.sober.org.br/palestra/12/02O118.pdf. Acesso em: 20 Jun. 2009.

CASTILHO, L. B.; REIS, A.; HENZ, G. P. **Identificação Morfométrica de Isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose em solanáceas.** (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento) Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007.

CHOUDHURY, M. M.; COSTA T. S. da.; ANJOS, J. B. dos. **Controle da antracnose pós-colheita da manga causada por *Colletotrichum gloeosporioides*;** Comunicado técnico, Petrolina Embrapa semi árido, 2003.

CIRULLI, M.; ALEXANDER, L. J. A. Comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytochemistry**, Elmsford, v.56, n.11, p.1302-1304, 1966.

CUNHA, M. M., SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. do. (Org). **Manga** Fitossanidade. Brasília: EMBRAPA Mandioca Fruticultura, Cruz das Almas-BA. Brasília – EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, **Frutas do Brasil 6**, 104 p. 2000.

DICKMAN, M. B. **Anthraco**nose In: Ploetz, R. C., Zentmyer, G. A.; Nishijima, W. T., Rohrbach, K. G. & Ohr H. D. (Eds.) Compendium of tropical fruit diseases. Saint Paul MN. APS Press. p. 58- 59, 1994.

DODD, J. C.; PRUSKY, D.; JEFFRIES, P. Fruit Diseases. In: LITZ, r. e. (Ed.). **The Mango**: botany, production and uses. Wallingford: CAB Internacional, cap. 8, p. 357-280. 1997.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-391, 1985.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1998.

FITZELL, R. D. *Colletotrichum acutatum* as a cause of Anthracnose of mango in New South wales, **Plant Disease Reporter**, Department of Agriculture, Australia, v.63, n.12, p. 1067-1070, 1979.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p. 596-605, 1998.

GOES, A. de; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.23, n.1, p. 4-10, 1997.

GOES, A. de; Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Revista Técnico Científica de Citricultura**, Cordeirópolis, v. 19, n. 2, p. 305-320, 1998.

GOES, A. de; **Queda prematura de Citrus: Caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ [SENSU ARX, 1957 e controle da doença]**. 1995. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 1995.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

HORTIFRUT, Revista **Hortifruti Brasil**, CEPEA, USP/ESALQ Ano 7 - Nº 77 - Março de 2009.

INFORMATIVO: Agropecuário Coopercitrus, ano XXII, nº269, p. 45, março 2009.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEGER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v.39, p. 343-366, 1990.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, Marília, v. 19, p. 683-689, 1997.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.6, p.620-625, 2003.

LOPEZ, A.M.Q. **Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum***. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 9, p.291-337, 2001.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D. J.; SANTOS, A. F.; VIDA J. B. Caracterização morfo-fisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.32, p.113-117. 2006.

MANNERS, J. M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K. S.; IRWIN, J. A. G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Ed.) ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford. CABI. p.250-268, 1992.

MARTÍN, M. P.; GARCÍA FIGUERES, F. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, p.733–741, 1999.

MATTOS, M. L. T.; FACHINELLO, J. C. Resíduos de pesticida sem pêssegos de Produção Integrada. In: Seminário brasileiro de produção integrada de frutas 4,, Bento Gonçalves, RS. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 73, 2002.

PEROSA, J. M. Y. ; PIERRE, F. C. Técnicas de pós-colheita e expansão da cultura da manga no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 381-384, 2002.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, N. L. de. Identification and Characterization of *Colletotrichum* spp. Affecting Fruit after Harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p.128-134, 2002.

PLOETZ, R.C. Mango Diseases Caused by Fungi: Antracnose. In: Ploetz, R. C., Zentmeyer, G. A.; Nishijima, N.T.; Rohrbasch, K.G.; Ohr, H.D. (Eds.). **Compendium of Tropical Fruit Diseases**. APS Press. St. Paul, American Phytopathological Society, p.35-36, 1994.

PIZZOL, S. J.; FILHO MARTINES, J. G.; SILVA, T. H. S.; GONÇALVES, G. O mercado da manga no Brasil: aspectos gerais. **Preços Agrícolas**, Piracicaba, v.12, n.142, p. 34, 1998.

ROSSETTO, C. J. **Doenças da Mangueira - Antracnose**. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://www.infobibos.com/Artigos /AntracnoseManga/Antracnose.htm>>. Acesso em: 24/4/2009

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da Mangueira In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed., São Paulo. Ed. Agron. Ceres, v.2, cap. 49, p. 511-524, 1997.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALES JÚNIOR, R; COSTA, F. M.; MARINHO, R. E. M.; NUNES, G. H. S.; MARO FILHO, J.; MIRANDA, V. S. Utilização de azoxistrobina no controle da antracnose da mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29 p.193-196, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Sprig Harbor, 2001.

SAMBROOK, J. T.; MANIATIS, E.; F. Fritsh. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Sprig Harbor Laboratory, **Cold spring Harbor 2^a ed.** 1989.

SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, S. E.; PIÑA, A. V.; ATAÍDE, E. M. Incidence and severity of mango flower malformation in Bahia state, Brazil. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF MANGO**, 60, Pattaya City, Thailand. Proceedings, v.2, n.1, p.765 – 768, 1999.

SHILLITO, R. D.; SAUL, M. W. Protoplast isolation and transformation. In: **Plant Molecular Biology: A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, pp 161-186, 1988.

SILVA, P. C. G. da; CORREIA, R. C., **Cultivo da Mangueira**, Embrapa Semi-Árido, Sistema de Produção, 2. ISSN 1807-0027, versão eletrônica, 2004. www.cpatas.embrapa.br/, Acesso em: 19/09/2006.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; LEMOS, O. L.; BOMFIM, M. P.; BOMFIM, A. A.; ESQUIVEL, G. L.; BARRETO, A. P.; JOSÉ A. R.; N. O. DIAS; TAVARES, G. M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, vol.28, n. 1, p.131-133, 2006.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 530 p,1971.

SIQUEIRA, T. V. A cultura da manga: desempenho no período 1961/2001 **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 17, p. 3-67, 2003.

SUSSEL, A. A. B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium* agente causal da antracnose em cucurbitáceas**. 2005. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SUTTON, B. C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J.) ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, p. 1-26, 1992.

SWART, G. M. **Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango**. 1999. 193 f. Tese (Ph.D. em Fitopatologia) – University of Pretoria, Pretoria, 1999.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.9, p. 678–687, 1992.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAVARES, S. C. C. H. **Cultivo da Mangueira**, Embrapa Semi-Árido, Manejo integrado de Doenças, 2. ISSN 1807-0027, versão eletrônica, 2004. www.cpatia.embrapa.br/, Acesso em: 19/09/2006.

TAVARES S. C. C. de H.; COSTA V. S. de O.; SANTOS C. A. P.; MOREIRA W. A.; LIMA M. F.; LOPES D. B. **Monitoramento de doenças na cultura da mangueira**. Embrapa Semi-Árido. Petrolina, n. 158 p.22, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA-JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.

TOZZE JÚNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP, 2007.

Vinnere, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology**, Uppsala, v.917, 72p., 2004. Disponível em: <http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn_se_uu_diva-3902.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELGARD, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WICKERT, E.; GOES, A., LEMOS, E. G. M., SOUZA, A., SILVEIRA, E. L., DIAS, F. P., RINALDO, D. Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31. n.2, p. 360-380, 2009.

ZAMBOLIM, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Manejo integrado de doenças da mangueira. IN: ROZANE, D. E.; DAREZZO, R. J.; AGUIAR, R. L.; AGUILERA, G. H. A.; ZAMBOLIM, L. **Manga, produção integrada, industrialização e comercialização**. Viçosa: UFV. p. 391-395, 2004.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; VALE, F. X. R. Controle de doenças em pós-colheita de frutas tropicais. In: **Manejo integrado de doenças e pragas de fruteiras tropicais**. ZAMBOLIM, L. (ed.), cap. 12, v. 2, p. 443-500. 2002.