

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS A GOIABEIRA**

Helen Karine Araújo Pereira

Licenciatura plena em Biologia

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS A GOIABEIRA**

Helen Karine Araújo Pereira

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Coorientadora: Dra. Fernanda Dias Pereira

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).

2018

Pereira, Helen Karine Araujo Pereira

P436c Caracterização morfológica, molecular e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a goiabeira / Helen Karine Araújo Pereira. -- Jaboticabal, 2018
iii, 38p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Antonio de Goes

Coorientadora: Fernanda Dias Pereira

Banca examinadora: Gabriela Souza Cintra, Rita de Cássia Panizzi
Bibliografia

1. *Psidium guajava*. 2. Apressórios. 3. Morfologia. 4. Controle químico. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.952:634.42

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

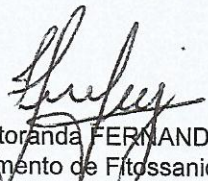
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A GOIABEIRA

AUTORA: HELEN KARINE ARAUJO PEREIRA

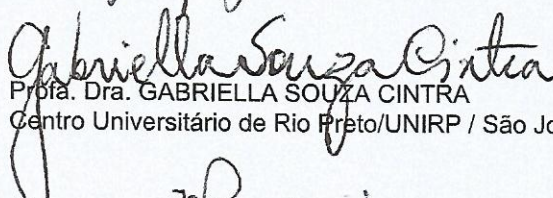
ORIENTADOR: ANTONIO DE GÓES

COORIENTADORA: FERNANDA DIAS PEREIRA

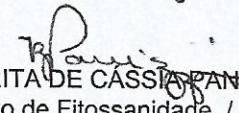
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Pós-doutoranda FERNANDA DIAS PEREIRA
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. GABRIELLA SOUZA CINTRA
Centro Universitário de Rio Preto/UNIRP / São José do Rio Preto/SP



Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA PANIZZI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 27 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HELEN KARINE ARAÚJO PEREIRA – Nascida em São Luís, MA, no dia 29 de janeiro de 1985. Filha de Antônio Luis Abreu Pereira e Ângela Lucy Araújo Pereira. Iniciou o curso de Licenciatura Plena em Biologia no ano de 2004, no Centro Federal de Educação Tecnológica do Maranhão – CEFET/MA. Foi bolsista de Iniciação científica (2006-2009) da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), participou de atividades direcionadas a educação de Jovens e Adultos por meio do Programa Nacional de Educação na Reforma Agrária promovido pelo IFMA nos anos de 2008 a 2011 além de projetos de extensão na área de educação ambiental vinculados à mesma instituição. Em 2013 assumiu o cargo de Professora EBTT do IFMA, por meio de aprovação em concurso público. Em 2014 ingressou no curso de especialização (Ensino da Genética) pela Universidade Estadual do Maranhão, recebendo o título de Especialista em 2016 e neste mesmo ano ingressou no Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Dêem graças ao Senhor, clamem pelo seu nome, divulguem entre as nações o que ele tem feito.

1 Crônicas 16:8

Aos meus pais, Antonio Luis "*in memorian*" e Ângela Lucy, ambos, por suas dedicações e empenho para todo meu desenvolvimento, abdicando muitas das vezes de suas necessidades para manter as minhas. E sem eles, principalmente minha mãe que tanto me ajudou e me ajuda eu não teria como ter obtido tantas conquistas.

A minha avó Gracildes pelo total empenho e dedicação dada a mim. Devo a ela parte de quem sou. Muito Obrigada minha querida avó.

Ofereço

A minha querida filha, Hellena Gabriely a quem tenho um imensurável amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo seu imensurável amor e misericórdia por mim e por permitir mais essa realização em minha vida.

À minha família pelo apoio, cooperação sem deixar de destacar a minha mãe Ângela e minha irmã Aline, pela disponibilidade em ficar com minha filha Hellena Gabriely A. F. P. da Silva para eu poder desenvolver todo este trabalho.

Aos meus queridos amigos Paulo e Karina Veloso, principalmente, pela extraordinária amizade, incentivo sempre, apoio nos momentos difíceis e alegres. Agradeço ao bom Deus pelas suas vidas e lhes dêem forças e sabedoria, para a mais linda fase que é de ser pais. Eternamente grata...

Ao meu querido orientador professor Dr. Antonio de Goes e minha querida coorientadora Dra. Fernanda Dias Pereira, pela paciência, apoio, ensinamentos e pelas pessoas admiráveis que são.

Aos meus amigos Nadia Poloni (Laboratório de Fitopatologia da UNESP, Jaboticabal) e João Fischer; em especial a Nadia por sua disponibilidade, dedicação em sempre me ajudar, sua calma e amizade.

À professora Dra. Rita de Cássia Panizzi por seu exemplo de ser humano, atenção, conselhos e cuidado.

À Roberta Carboni por sua disponibilidade em auxiliar em uma etapa do projeto, atenção e colaboração. Muito obrigada.

À Andressa de Sousa pela disponibilização de isolados e colaboração.

Aos técnicos do laboratório do Departamento de Fitopatologia da Unesp, Câmpus Jaboticabal, Rosangela e Luís por seus auxílios, atenção e amizade.

Ao professor Dr. Eduardo do departamento de Biologia da UNESP, Jaboticabal, por sua disponibilidade e auxílio no uso de equipamentos específicos para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Aos meus amigos de departamento, Mariana, Zé Paulo, João e Ana os quais compartilhei momentos inesquecíveis.

Aos amigos Roberta, Lívia, Alcides, Francisco, Isabela, Zénobio, Júlio, Aycon, Jânio e Arilson do Instituto Federal do Maranhão, em especial a Roberta e Lívia pela companhia, momentos de desabafo, compreensão e amizade.

Ao professor Dr. Arthur Bernardes, pela sutileza nas palavras e destreza em suas ações.

Ao meu amigo Elder, que muitas das vezes no “tamo junto” me dava um bom ânimo.

À professora Virginia Maria Freire por seu incentivo, compreensão e apoio, a quem eu tenho eterna admiração.

Às professoras Maria Hellena S. Sales por todo apoio e Simone Maranhão por sua dedicação e auxílio, em disponibilizar seu tempo para aulas de inglês. Obrigada.

À Tatiana Abreu pela sua colaboração e amizade.

Ao Instituto Federal do Maranhão - IFMA (Reitoria) por direta ou indiretamente favorecer mais essa etapa profissional.

Às professoras Georgiana, Clenilma, Kiany e Weline pela amizade, compreensão e disponibilidade sempre. Em especial à professora Georgiana a quem serei eternamente grata.

À Célia Antonino por sua confiança, colaboração e amizade, a quem me acolheu no seu lar com muito carinho, minha gratidão sempre, minha irmã.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Goiabeira (<i>Psidium guajava</i>) X Antracnose.....	4
2.2. <i>Colletotrichum</i> : agente etiológico de antracnose e controle.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i>	8
3.2. Caracterização morfológica de conídios e apressórios.....	11
3.3. Caracterização molecular	12
3.3.1. Extração de DNA.....	12
3.3.2. Identificação molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. por PCR espécie-específico.....	13
3.4. Sensibilidade a fungicidas.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Caracterização morfológica e molecular dos isolados de <i>Colletotrichum</i>	15
4.2. Sensibilidade a fungicidas.....	22
5. CONCLUSÕES.....	31
5. REFERÊNCIAS.....	32

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A GOIABEIRA

RESUMO - Fungos do gênero *Colletotrichum* causam infecções em pré e pós-colheita em frutos de goiabeiras, causando prejuízos significativos. Neste estudo foram avaliados 26 isolados de *Colletotrichum* oriundo de frutos de goiabeiras com sintomas de antracnose, de diversos municípios do estado de São Paulo, com caracterização morfológica de conídios e apressórios, caracterização molecular com PCR espécie-específica e avaliação *in vitro* quanto à sua sensibilidade aos fungicidas tiofanato-metílico, trifloxistrobina e tebuconazole. Os resultados foram submetidos a análise de variância e teste de Scott-Knott, Tukey, a 5% de probabilidade e IC50. Os isolados avaliados apresentaram alto polimorfismo, sendo *C. gloeosporioides* a espécie predominante. Outras espécies foram também encontradas. Os isolados, na sua maioria foram altamente sensíveis a tebuconazole e insensíveis a trifloxistrobina e tiofanato-metílico, *in vitro*. Revisão das estratégias de controle da doença fazem-se necessárias, sendo discutidas no presente trabalho.

Palavras-chave: *Psidium guajava*, apressório, morfologia, controle químico

MORPHOLOGICAL, MOLECULAR CHARACTERISATION AND SENSITIVITY TO FUNGICIDES OF *Colletotrichum* spp. ISOLATES ASSOCIATED WITH GUAVA

ABSTRACT: Fungi of the genus *Colletotrichum* cause infections in pre and post harvest in fruits of guava trees, causing significant losses. This study evaluated 26 isolates of *Colletotrichum* from guava fruits with symptoms of anthracnose from several municipalities in the state of São Paulo, with morphological characterization of conidia and apressoris, molecular characterization with species-specific PCR and in vitro evaluation of their sensitivity to the thiophanate-methyl fungicides, trifloxystrobin and tebuconazole. The results were submitted to analysis of variance and Scott-Knott's test, Tukey, at 5% probability and IC50. The evaluated isolates showed a high polymorphism, being *C. gloeosporioides* the predominant species. Other species were also found. The isolates were mostly highly sensitive to tebuconazole and insensitive to trifloxystrobin and thiophanate-methyl in vitro. Review of disease control strategies are necessary, being discussed in the present work.

Key words: *Psidium guajava*, appressory, morphology, chemical control

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas, superado apenas por China e Índia (Reetz, 2015). Dentre essas frutas destaca-se a goiaba, cujo país constitui-se no oitavo maior produtor mundial (Gill, 2016). No Brasil, as maiores produções concentram-se nas regiões sudeste (47%) e nordeste (42%), com destaque para os Estados de São Paulo e Pernambuco, responsáveis por 67,3% da produção nacional (Rozane, 2017).

O crescimento da comercialização de frutos de goiabeira está intrinsecamente ligado à qualidade destes e ao aumento de sua vida pós-colheita. Entretanto, por ser um fruto perecível e de casca muito fina e sensível, enfrenta vários problemas fitossanitários, especialmente na fase de pós-colheita. Muitos microorganismos, como fungos, são capazes de causar infecções nessa fase e também em pré-colheita. Tais infecções mantêm-se, na maioria das vezes, como quiescentes, com os sintomas aparecendo nos dias subsequentes à colheita, às vezes já nas prateleiras.

Dentre as doenças que têm ocasionado impacto negativo à produção e a comercialização dos frutos de goiabeira, destaca-se a antracnose, causada pelo fungo do gênero *Colletotrichum*, com a espécie *C. gloeosporioides*, predominante no Estado de São Paulo (Pereira, 2009; Pereira, 2016). Frutos infectados, quando sintomáticos, exibem manchas marrom escuras, levemente circulares e deprimidas, cujo centro pode apresentar massa de coloração alaranjada contendo esporos fúngicos, que, também, podem progredir para o interior da polpa, causando o seu apodrecimento (Hernández e Mendes, 2003; Pereira, 2016). Entretanto, outras espécies como *C. asiaticum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. karstii* e *C. musae* já foram descritas causando sintomas de antracnose em frutos de goiabeira e outras frutíferas (Lima et al. , 2015 e Pereira, 2016).

Vale ressaltar, que vários estudos de avaliações morfológicas já foram desenvolvidos para o melhor conhecimento do agente etiológico de antracnose em goiabeira, como os de Pereira (2009) e Pereira (2016), e mesmo o desenvolvido por

Stracieri (2015), onde foram contempladas apenas a determinação das dimensões dos conídios, porém não de apressórios, uma estrutura de grande importância no processo de infecção.

A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro, devido diferenças epidemiológicas intrínsecas, pode dificultar o controle da antracnose. Dessa forma, estudos de caracterização baseados na integração de métodos taxonômicos são fundamentais para a identificação dos possíveis agentes causais (Tozze Junior et al. ,2015).

Sintomas de antracnose são rotineiramente constatados em todas as variedades de goiabas. Em vista disso, o controle da doença é baseado no manejo cultural, com podas de limpeza, eliminação de frutos doentes e aplicação de fungicidas protetores e mesostêmicos/sistêmicos, visando a proteção ou a erradicação de infecções recém-estabelecidas (Hernández e Mendes, 2003).

Nos últimos anos, tem-se verificado que o controle aplicado não tem proporcionado o nível desejável, especialmente em áreas de elevado nível de inóculo e de condições muito favoráveis aos patógenos, como elevada umidade, temperaturas moderadas e chuvas prolongadas (Lopes et al. , 2015).

Devido à suscetibilidade dos frutos e condições ambientais favoráveis ao patógeno, por longo período do ano, frequentemente, são usados de forma recorrente e repetidamente, fungicidas mesostêmicos/sistêmicos, ampliando as chances de seleção de isolados de *Colletotrichum* resistentes aos grupos químicos utilizados. Essa condição apontada constitui-se em fator que leva à vulnerabilidade das moléculas químicas, tornando menos eficientes com o uso contínuo e repetido (Brent e Hollomon, 2007).

Em vista disso, os objetivos desse estudo foram: (i) caracterizar morfológica e fisiologicamente conídios e apressórios de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em frutos de goiabeira, no Estado de São Paulo, (ii) identificar, por meios de marcadores específicos, as espécies de *Colletotrichum* spp. associadas aos sintomas de antracnose em frutos de goiabeira no Estado de São Paulo e, (iii) avaliar a sensibilidade “*in vitro*” de isolados de *Colletotrichum* spp.

associados a sintomas de antracnose em goiabeira aos fungicidas tebuconazole, trifloxistrobina e tiofanato-metílico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Goiabeira (*Psidium guajava*) X Antracnose

A goiabeira é uma planta originária de regiões de clima tropical da América Central, bem adaptada ao clima tropical e subtropical de altitudes de até 1.600 metros, de porte arbóreo, podendo crescer até 10 metros. Possui sistema radicular profundo, seu tronco é delgado com uma casca do tipo escamosa, de coloração marrom, e seus ramos possuem a forma quadrangular. Suas folhas são simples, opostas, 7–15 cm de comprimento e 3–5 cm de largura, que variam em formas ovais a oblongo-elípticas com pecíolos curto e liso e flores do tipo perfeita. O período de floração varia com as condições climáticas; em regiões tropicais podem florescer e frutificar durante o ano todo (Almeida et al. , 2015; Gill, 2016).

A goiabeira origina um fruto muito apreciado e de grande valor nutricional, a goiaba, rica em vitaminas A, B, C e E, minerais como cálcio, fósforo e ferro, os quais são de extrema importância para quem a consome, seja *in natura*, como também em alimentos processados como sucos, geleias e doces (Silva et al. , 2016). Pertencente a família Myrtaceae, a goiaba assim como noz moscada, cravo da Índia, eucalipto que fazem parte dessa família, são de grande importância comercial (Gill, 2016).

Além das vitaminas e minerais, a goiaba possui aplicações medicinais com ação antibacteriana, anti-inflamatória, anti-malária, antidiarreico e anti-reumático, ademais compostos bioativos como compostos fenólicos e carotenoides com ação antioxidantes. Contudo, ressaltam-se que características químicas, físicas e organolépticas podem variar com a cultivar, condições adafoclimática, práticas de manejo, estágio de maturação, da conservação pós-colheita, dentre outras (Silva et al. , 2016).

Atualmente, as variedades mais cultivadas no Brasil, como a Paluma, Tailândesa, Cortibel e Kumagai, são destinadas para a mesa e processamento industrial, tanto na produção de polpas quanto nas famosas goiabadas, tão clássicas e de grande importância aos saberes e tradições populares brasileiros. Parte desta

produção tem sido exportada, com indicações claras da importância pela demanda internacional (Belarmino, 2015; Flori, 2016; Gill, 2016).

O Brasil está entre os países de maior produção de frutas, considerado o terceiro maior produtor, excedido apenas por China e Índia (Reetz et al. ,2015). Em frutíferas como goiabeira, equivale ao oitavo produtor, com produção em 2016 de 414.960t, tendo as regiões do sudeste (47%) e nordeste (42%) as mais produtoras do país. Os Estados de São Paulo e Pernambuco são responsáveis por 67,3% da produção nacional, com área colhida de 4.808 ha e 4.047 ha, respectivamente (IBGE, 2016; Rozane, 2017).

No contexto de exportação, a goiaba ocupa o décimo sexto lugar, cujo volume ainda é muito baixo, limitado por problemas fitossanitários nas fases de pós-colheita (Reetz et al. , 2015). Essas problemas advêm das podridões ocasionadas por microrganismos em estado quiescente, nas fases de desenvolvimento dos frutos, ou subsequentemente nas etapas de colheita, transporte, armazenamento e comercialização (De Silva et al. , 2017; Oliveira et al. , 2018).

Antracnose é a denominação genérica dos sintomas causados por fungos do gênero *Colletotrichum*. Quase sempre os sintomas oriundos pelas cerca de 600 espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* que resultam em sintomas típicos da doença em folhas, flores, caules e frutos, com presença ou sem a presença de massa conidial de cor alaranjada (Cannon et al. , 2012; Bragança 2016).

2.2. *Colletotrichum*: agente etiológico de antracnose e controle

Colletotrichum é o agente etiológico de antracnose, que frequentemente causa infecções em pré e pós-colheita (Sutton,1992). As espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, ou o Complexo dessas duas espécies (Bragança et al. , 2016), no contexto *strictu senso*, são os principais responsáveis pelos sintomas de antracnose em goiaba (Nachtigal et al. , 2015). Contudo, outras espécies como *C. asiaticum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. karstii* podem apresentam a mesma capacidade de causar infecção (Lima et al. , 2015; Pereira, 2016).

Espécies de *Colletotrichum* possuem comportamentos únicos e estratégias de infecção que provavelmente podem ser assumidas por diferentes espécies dentro de

um mesmo complexo. No entanto, geralmente, em uma pré-infecção ocorre a germinação de conídio e formação de estruturas especializadas em infecção, como apressórios, que facilitam o acesso na cutícula e parede celular epidérmica do hospedeiro (De Silva et al. , 2017). Tal mecanismo é registrado inclusive em frutos de goiabeiras acrescido de melanização do apressório (Moraes et al. , 2015), sendo, classificado como hemibiotrófico, com uma fase inicial do tipo biotrófico, e outra necrotrófica, intracelular, com formação de vesícula e hifas infecção para o *C. gloeosporioides* (Moraes et al. , 2013, 2015). Em *C. acutatum*, todavia, o estilo de infecção varia de hemibiotrófico a necrótrófico, de acordo com os hospedeiros (Baronecelli et al. , 2017).

Os conídios de *Colletotrichum* são epidemiologicamente importantes no processo doença. A dispersão dos conídios, a campo, dá por meio de respingos d'água, a partir da chuva, orvalho ou irrigação por aspersão. As condições favoráveis para infecção são representadas por presença de umidade, por pelo menos 6 horas, temperaturas entre 20 e 25°C em condições *in vivo* e a 25 a 30°C, no intervalo de 3 a 36h depois da inoculação *in vitro* (Guédez et al. , 2015; Moraes et al. , 2015).

Os conídios, para o caso de *C. gloeosporioides*, apresentam coloração hialina, tamanho variando 12-17 µm de comprimento e 3,5-6 µm para largura e formato reto, fusiforme, com ápices afilados; reto, oblongo, com ápices arredondados; reto, clavado, afilado em uma extremidade e redonda na outra e reto, com constrição (Sutton, 1992; Silva, 2016).

Apressório é uma estrutura formada pelos fungos fitopatogênicos que auxilia a penetração mecânica na superfície do hospedeiro (Moraes et al. , 2013). A cor e forma dessas estruturas variam com a espécie do fungo, de coloração marrom, marrom claro a marrom escura ou hialina, e o formato arredondado, lobado ou levemente lobado, por vezes com uma extremidade pontiaguda, ovóide ou irregular (Huang et al. , 2013; Silva, 2016).

Diferenciação entre espécies de *Colletotrichum* baseadas no hospedeiro de origem, ou na sua gama de hospedeiros, pode não ser um critério confiável para fungos deste gênero, já que podem infectar uma ampla faixa de hospedeiros, e, às

vezes, sem apresentar um comportamento fisiológico único e específico. Devido a essa complexa situação, a combinação espécies, hospedeiro envolvido e expressão dos sintomas pode ser insuficiente para a definição taxonômica do agente causal, e, por conseguinte, a etiologia geral da doença. Devido tal aspecto, são utilizadas várias ferramentas de pesquisa, de tal forma que se possa caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum*, visando uma melhor compreensão dos patossistemas, e, possivelmente, com consequente melhorias na definição das estratégias de controle do respectivo patógeno (Afanador-Kafuri et al. , 2003; Tozze Júnior, 2007).

Estudos envolvendo a análise molecular com primers específicos são necessários para identificar as espécies de *Colletotrichum* associadas a diferentes tipos de sintomas e hospedeiros, independente da interação patógeno-hospedeiro e da variabilidade intra e interespecífica.

Não há variedades de goiabeiras resistentes a *Colletotrichum* spp., sendo o controle dos patógenos realizados mediante práticas culturais e uso de fungicidas. No Brasil, há poucos fungicidas registrados nos órgãos competentes, e, de certa forma, restringindo quase que unicamente na mistura comercial de fungicidas dos grupos triazóis e estrobilurinas, como 200 gL⁻¹ de tebuconazole e 100 gL⁻¹ trifloxistrobina, respectivamente (AGROFIT, 2018). Fungicidas protetores, segundo os preceitos apresentados, são também registrados. Entretanto, para o caso dos fungicidas sistêmicos/mesostêmicos, são recomendadas até quatro aplicações anuais (AGROFIT, 2018). Entretanto, devido à suscetibilidade das variedades, longo período de exposição dos frutos, níveis de inóculo normalmente elevado e condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno em longos períodos do ano, são normalmente realizadas número maior de aplicações, mesmo em cenários cujo uso de fungicidas protetores deem-se intercaladamente ou em combinação. Não há outros fungicidas que tenham propriedades curativas que pudessem contribuir para o rodízio de ingredientes ativos de grupos químicos diferentes, aumentando a massificação do uso dos produtos registrados, e, por consequência, incrementando as possibilidades da seleção de estirpes resistentes. Outros fungicidas, até há alguns anos utilizados na fruticultura do Brasil, e atualmente em uso em vários

outros países, tem a eficiência muitas vezes contestada, como por exemplo na China (Lin et al. , 2016).

Os fungicidas cúpricos, por exemplo, são eficientes quando empregados preventivamente. Entretanto, sob condições ambientais favoráveis aos patógenos, seu uso contínuo, muitas vezes faz-se necessário o que, invariavelmente, causa sintomas de fitotoxicidade, resultando na redução da qualidade comercial dos frutos (Goes et al. , 2004; Yang-Yang et al. , 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos isolados de *Colletotrichum*

Os isolados foram obtidos a partir de frutos de goiabeira com sintomas de antracnose, coletados em áreas de produção localizadas em Campinas, Itápolis, Jaboticabal, Monte Alto, Pirangi, São Lourenço do Turvo, Taquaritinga e Vista Alegre do Alto, todos no Estado de São Paulo. Do conjunto de isolados foram selecionadas 26 cepas, sendo acrescentado um isolado proveniente de pomar não comercial (quintal), sem aplicação de fungicidas (Tabela 1). A denominação de cada isolado foi realizada mediante a numeração específica, seguida de letra inicial do local de procedência do fruto, com exceção do isolado proveniente de pomar não comercial, que foi denominado 1J.Q.

Tabela 1. Procedência, variedade de goiabeiras, número e ano do isolamento das cepas de *Colletotrichum* utilizadas no estudo.

Municípios amostrados no Estado de São Paulo e designação	Variedade	Número de isolados	Ano de coleta
Campinas (C)	Paluma	3	2013
Itápolis (I)	Paluma	3	2013
Jaboticabal (J; J.Q)	Paluma	2	2018
Monte Alto (MA)	Tailandesa	1	2013
	Paluma	5	2017
Pirangi (P)	Paluma	2	2013
São Lourenço do Turvo (SLT)	Paluma	1	2013
Taquaritinga (T)	Paluma	4	2013
	Tailandesa	1	2013
Vista Alegre do Alto (VA)	Paluma	5	2017

No presente estudo, além dos isolados fúngicos obtidos na presente coleta, para fins comparativos, foram utilizados dois isolados (BR.F.TA13; JA.F.B105) de *Colletotrichum* provenientes de frutos de mangueira com sintomas de antracnose das variedades Tommy Atkins e Bourbon, coletado em pomares comerciais

localizados os municípios de Barretos e Jardinópolis, SP, no ano de 2007. Estes isolados pertencem à Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP - Jaboticabal, e foram previamente identificados como *C. gloeosporioides* (Souza et al. , 2013).

O isolamento dos fungos do gênero *Colletotrichum* foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP. Inicialmente, os frutos foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2,5 % (v.v⁻¹), secos em ambientes de laboratório, e em seguida colocados em bandejas de plástico, em temperatura ambiente (28 °C ± 1 °C), sendo mantido por um período de 24-36 h, para surgimento aparente de sintomas. Posteriormente, com a definição desses sintomas e esporulação do fungo, foram utilizadas duas metodologias de isolamento: (i) transferência direta de conídios das lesões dos frutos; ou (ii) retirada de fragmentos de tecidos em transição doente/sadio (Figura 1). Para ambas as situações foi empregado meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de Pentabiótico® (benzilpenicilina benzatina - 600.000 UI, procaína - 300.000UI e potássica - 300.000UI; sulfato de estreptomicina - 200mg e sulfato de dihidroestreptomicina - 250mg), Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda.

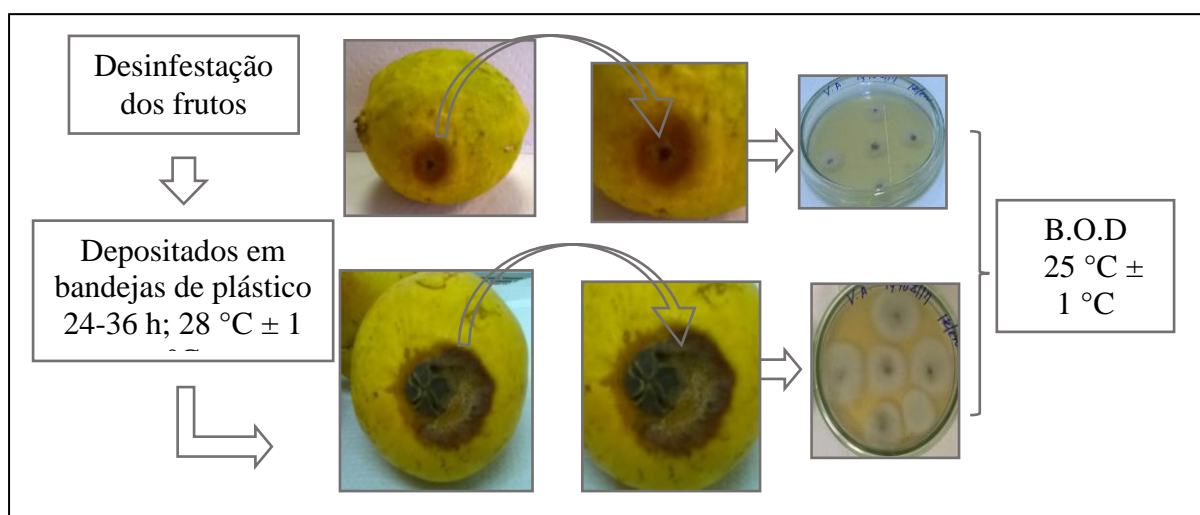


Figura 1. Representação das etapas de desinfestação dos frutos, surgimento de sintomas e crescimento do isolados em placa de BDA, acrescido com pentabiótico.

Após o isolamento, as placas contendo o fungo foram mantidas em estufas tipo B.O.D., a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 a 7 dias de incubação. Posteriormente, as colônias indicativas de *Colletotrichum* spp. foram repicadas para a obtenção de culturas puras. Tubos de ensaios contendo as cepas típicas de *Colletotrichum* foram etiquetados e preservados conforme Alfenas e Mafia (2016) e Gonçalves, et al. (2016).

3.2. Caracterização morfológica de conídios e apressórios

Para a caracterização de tamanho e formato dos conídios e apressórios foi adotada a técnica de microcultivo (Figura 2) de Mafia e Alfenas (2016), com modificações, na qual foi substituída a lâmina por lamínulas; o bastão de vidro em forma de “V” por canudo plástico, no mesmo formato, e o papel filtro, por dois pequenos chumaços de algodão separados equidistantemente. A incubação deu-se por 5-7 dias em condições ambiente ($22\text{-}28\text{ }^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, deu-se a preparação de lâminas com solução azul de algodão.



Figura 2. Representação da técnica de microcultivo para o isolado 2C.

As medidas dos tamanhos dos conídios e apressórios foram determinadas mediante sistema vídeo-câmera (Bel Photonics®), acoplada ao microscópio óptico. A imagem foi transmitida para o computador e analisada por meio do software Bel Capture, sob objetiva 40X. Para cada cepa foram avaliados, ao acaso, 50 conídios e 50 apressórios para valores médios de comprimento (C), largura (L) e relação de comprimento por largura (C/L).

As metodologias de avaliação fenotípica dos conídios e apressórios foram semelhantes às adotadas por Sutton (1992) e Silva (2016). Os conídios foram

discriminados de acordo com o formato: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redonda na outra e (4) reto, com constrição; e os apressórios, (1) lobados; (2) levemente lobados; (3) arredondados. Para cada isolado foram avaliados ao acaso 100 conídios e 100 apressórios. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o programa AgroEstat (Barbosa e Maldonato Junior, 2015), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.3. Caracterização molecular

A caracterização molecular dos isolados foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/UNESP – Jaboticabal, SP.

3.3.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA, todos os isolados do estudo foram repicados para tubos de vidro de 110 mL, contendo meio de cultura líquido BD (batata-dextrose) visando à obtenção de quantidades maiores de micélio e a separação do mesmo do meio de cultura. Após sete dias de desenvolvimento, a massa miceliana foi retirada do meio de cultura com o auxílio de peneira de pequena trama. Ainda na peneira, a mesma foi enxaguada com água destilada e seca em estufa a 50 °C por 12 horas. Posteriormente, a massa miceliana seca foi submetida à maceração com nitrogênio líquido até a formação de um pó, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

A extração de DNA foi baseada no protocolo de Kuramae-Izioka (1997). Para a lise celular foram acrescentados aos tubos contendo o micélio macerado 650 µL de tampão de extração de DNA (160 mM de Tris-HCl pH 8.0, 60 mM de EDTA pH 8.0, 20 mM de NaCl e SDS 0,5%). Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos em ThermoMixer (Eppendorf) a 65°C por 50 minutos. Após a lise celular, foram acrescentados aos tubos 300 µL de acetato de potássio 5M. A solução foi homogeneizada por inversão e incubada em gelo por 30 minutos. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação das amostras a 12.000 x g por 10 minutos a 10 °C. O

sobrenadante translúcido foi então transferido para tubos novos, aos quais foram acrescentados 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). A solução foi agitada vigorosamente em vórtex e centrifugada sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente transferido para outros tubos aos quais foram acrescentados 1000 µL de álcool etílico absoluto para precipitação do DNA que ocorreu a -20°C por 12 horas.

Para obtenção do *pellet* de DNA, a solução contendo álcool etílico absoluto foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 10 °C. A fase líquida foi completamente removida e o *pellet* de DNA foi lavado com 1000 µL de álcool etílico 70%, sob nova centrifugação. O *pellet* de DNA foi seco em estufa a 50°C por 30 minutos, e, posteriormente, suspenso em 60 µL de solução TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0).

A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-1000 (ThermoScientific), medindo-se a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. 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 (Sambrook; Russell, 2001). As amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 g/mL) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas) para verificação da qualidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOCXR (BioRad).

3.3.2. Identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. por PCR espécie-específico

Todos os isolados foram submetidos à PCR espécie-específica utilizando-se o oligonucleotídeo Cglnt (Mills; Sreenivasaprasad; Brown, 1992) para *C. gloeosporioides*, utilizado em associação com o oligonucleotídeo ITS4 (White et al. , 1990). Os isolados que não apresentaram amplificação foram então submetidos à PCR com os oligonucleotídeos Calnt2 (Sreenivasaprasad et al. ,1996) e ITS4, específicos para amplificação da espécie *C. acutatum* (Pileggi et al. , 2009) e ITS4,

específicos para amplificação da espécie *C. boninense*. Os isolados que ainda assim não apresentaram amplificação foram submetidos à PCR para confirmação do gênero *Colletotrichum*, utilizando-se os oligonucleotídeos Coll1F/Coll3Rb (Mosca et al., 2014) (Tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleotídeos espécie-específicos utilizados na caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento (°C)
CgInt	GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG	450	64
CaInt2	GGGGAAGCCTCTCGCGG	500	57
Col1	GCCGTCCCCTGAAAAG	500	48
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
Coll1F	AACCWGCGGAGGGATCATT	450	55
Coll3Rb	TCCCTBCGRRTCCCRRTGCG		

3.4. Sensibilidade a fungicidas

Foram avaliados 14 isolados de *Colletotrichum*, sendo 11 provenientes de goiabeira, escolhidos aleatoriamente, e dois isolados de mangueira.

O teste de sensibilidade a fungicidas foi conduzido em semelhança a metodologia descrita na literatura (Fischer et al., 2012; Espinoza-Altamirano et al., 2017), com modificações. Para tal, o ingrediente ativo foi diluído em água destilada estéril (1:10), e a partir desta, uma solução estoque de 100.000 µg.mL⁻¹ foi preparada. Posteriormente, foram realizadas diluições para a obtenção das concentrações contendo 5; 20; 35; 50 µg.mL⁻¹ para tebuconazole (Folicur 200 EC® Bayer S.A. – São Paulo, SP); 1.000; 2.000; 4.000 e 8.000 µg.mL⁻¹ para trifloxistrobina (Flint 500WG®, Bayer S.A. – São Paulo, SP) e 500; 2.500; 5.000; 10.000 µg.mL⁻¹ para o tiofanato-metílico (Cercobin 700WP®, Iharabras S.A. Indústria Químicas - Sorocaba). Para preparo, os fungicidas foram adicionados ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) fundente (45-50 °C), levemente agitados para a sua mistura e homogeneização, sendo posteriormente vertidos 20 mL em cada placa

de Petri de 90 mm de diâmetro. Placas de Petri contendo BDA sem fungicidas foram utilizadas como testemunha.

Após 24 horas, foi transferido para o centro da placa de Petri, contendo BDA, um disco de colônia de 6,5 mm de diâmetro, com aproximadamente seis dias de incubação. As placas contendo o fungo, distribuídas aleatoriamente, foram incubadas a temperatura a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h por um período de seis dias, quando uma ou algumas das colônias dos fungos atingiu a bordadura das placas.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos inteiramente casualizados, em esquema fatorial de $14 \times 5 \times 5$, correspondente a isolados, concentrações dos fungicidas e repetições, respectivamente. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri.

A avaliação consistiu na determinação do efeito inibitório dos fungicidas no tamanho das colônias. Para isso, o tamanho das colônias foi determinado mediante mensuração do crescimento micelial em dois sentidos perpendiculares entre si. A partir dos dados do tamanho das colônias foi determinada a porcentagem de inibição de crescimento - PIC em relação a testemunha, sendo empregada a equação: $\text{PIC} = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) \times 100 / \text{diâmetro da testemunha}$.

Para análise, os dados de concentração dos fungicidas foram transformados em logaritmo ($\log 10+1$) que, juntamente com os dados do tamanho das colônias, foram submetidos a análises de variância, regressão e aplicação do teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa AgroEstat (Barbosa e Maldonato Junior, 2015).

O valor de dados relativos a concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento micelial foi obtido pela média ponderada, PIC e probabilidade. E para classificação do nível de sensibilidade dos isolados foi adotada uma escala semelhantemente a empregada por Joshi et al. (2013), em que os valores de concentração mínimos necessários se enquadram em: $<100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ altamente sensível (AS); $101 \geq 200\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ - sensível (S); $201 \geq 300\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ - moderadamente insensível (MI); $301 \geq 400\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ - insensível (I); $>400\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ - altamente insensível (AI).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização morfológica e molecular dos isolados de *Colletotrichum*

Os conídios de *Colletotrichum* analisados apresentavam quatro padrões morfológicos, sendo os predominantes: (i) hialinos, retos e oblongos, com as duas extremidades arredondadas (Figura 3A) e (ii) reto, com constrição. Tais características estão associadas a várias espécies de *Colletotrichum*, porém enquadram-se mais apropriadamente em *C. gloeosporioides*, cujos conídios são retos, oblongos, com as duas extremidades arredondadas (Sutton, 1992; Huang et al. , 2013).

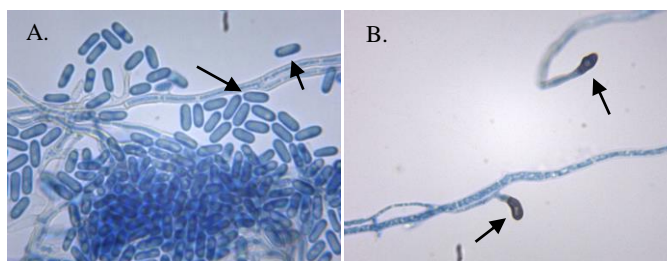


Figura 3. Características morfológicas de conídios e apressórios de isolados de *Colletotrichum* sp. oriundos de goiabeira da variedade Paluma com sintomas de antracnose. **A** - Conídios hialinos, retos, oblongos e com extremidades arredondadas. **B** - Apressórios exibindo parede espessa, escuros, levemente lobados.

Os 50 conídios avaliados de cada isolados de *Colletotrichum* apresentaram comprimento médio de que variaram de 5,2 a 17,0 μm , representados pelos isolados 36T e 25P, respectivamente. A largura média dos conídios variou de 1,4 (36T e 19MA) a 4,6 (16VA) μm (Tabela 3), com indicação, pois, de elevado polimorfismo. Resultados dessa natureza já foram apontados em outros estudos, incluindo isolados de *Colletotrichum* oriundos de outros hospedeiros, como por exemplo, o mamoeiro, cuja variação do tamanho dos conídios foi de 10,4 a 18,2 μm (Andrade et al. , 2007).

Tabela 3. Tamanho e formato de conídios e apressórios de isolados de *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose em goiabeiras no Estado de São Paulo.

Isolados	CONÍDIOS							APRESSÓRIOS					
	Tamanho (µm)			Formato				Tamanho (µm)			Formato		
	C	L	C/L	1	2	3	4	C	L	C/L	1	2	3
13 VA	15,1 b	4,0 b	3,8 c	0	33	12	55	9,5 b	6,2 b	1,6 a	0	82	17
17 VA	13,1 c	3,7 c	3,5 d	1	45	8	46	10,1 b	7,0 a	1,5 b	3	72	25
16 VA	13,0 c	4,6 a	2,8 f	5	71	7	17	10,7 a	6,3 b	1,8 a	37	47	16
18 VA	13,1 c	4,1 b	3,3 e	0	39	6	55	11,3 a	6,8 a	1,7 a	16	68	16
5 VA	14,0 c	3,8 c	3,7 c	5	48	28	19	9,3 b	6,4 b	1,5 b	3	72	25
40 VA	12,8 c	3,9 b	3,3 e	0	98	1	1	10,1 b	6,3 b	1,7 a	0	92	8
1 C	12,6 c	3,7 c	3,5 d	5	53	6	36	9,7 b	6,2 b	1,6 a	1	70	29
2C	11,4 d	3,6 c	3,2 e	0	88	1	11	10,9 a	6,6 a	1,8 a	7	76	17
3C	10,9 d	3,4 d	3,3 e	3	75	12	10	9,6 b	6,5 b	1,6 b	5	81	14
38 T	12,8 c	3,5 d	3,7 c	5	52	7	12	9,5 b	7,1 a	1,4 c	0	69	31
37 T	11,1 d	3,8 c	3,0 f	1	80	3	16	10,5 a	7,1 a	1,6 b	2	91	7
39 T	11,5 d	3,0 f	4,0 c	0	82	4	14	10,7 a	6,8 a	1,6 a	4	71	25
36 T	5,2 f	1,4 g	3,7 d	0	78	4	18	4,3 e	3,0 d	1,5 b	2	75	23
22 I	11,2 d	3,5 d	3,3 e	2	68	12	18	8,2 d	6,5 b	1,3 c	3	68	29
21 I	12,0 d	3,1 e	3,9 c	3	81	12	4	8,3 d	6,0 b	1,4 c	0	82	18
24 I	15,2 b	3,2 e	4,8 b	1	69	9	21	9,8 b	6,8 a	1,5 b	6	83	11
27 P	12,2 c	3,4 d	3,7 c	0	59	12	29	8,7 c	6,1 b	1,5 b	6	74	20
25 P	17,0 a	3,1 e	5,6 a	0	75	14	11	9,9 c	7,1 a	1,3 c	1	86	13
12 MA	10,0 e	3,2 d	3,2 e	0	84	7	9	8,1 d	6,1 b	1,4 c	0	70	30
15 MA	10,9 d	4,0 b	2,8 f	2	94	4	0	8,9 c	6,6 b	1,4 c	2	86	12
7 MA	11,2 d	3,8 b	3,0 f	1	85	1	13	8,1 d	6,9 a	1,2 c	2	75	23
19 MA	12,5 c	1,4 f	4,6 b	2	68	8	22	8,6 c	5,3 c	1,7 a	1	93	6
20 MA	10,4 e	3,7 c	2,9 f	2	73	9	16	11,3 a	6,3 b	1,9 a	1	89	10
18 MA	11,3 d	3,3 d	3,5 d	1	65	13	21	9,4 b	7,0 a	1,4 c	9	68	23
5 J	10,0 e	3,6 c	2,8 f	2	18	13	67	7,3 d	5,3 c	1,4 c	0	40	60
30 SLT	11,1 d	3,9 b	2,8 f	0	96	1	1	8,3 d	5,3 c	1,6 a	0	57	43
CV%	21,3	13,2	22,9					23,2	20,3	31,9			

*Valores seguidos da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C – comprimento; L- largura; C/L – relação entre o comprimento e a largura. Formato dos conídios: 1 – reto, fusiforme, com ápices afilados; 2 – reto, oblongo, com ápices arredondados; 3 – reto, clavado afilado em uma extremidade e redonda na outra e 4 – reto, com constrição; Formato dos apressórios 1 – lobado; 2 – levemente lobado e 3 – arredondados.

De acordo com Sutton (1992), conídios de fungos da espécie *C. gloeosporioides* apresentam comprimento entre 12 e 17 μm e largura entre 3,5-6 μm . Tomando-se como referência as médias de comprimento atribuídas, pressupõe-se que os isolados 13VA, 17VA, 16VA, 18VA, 5VA, 40VA, 25P, 1C, 38T, 24I são integrantes dessa espécie de fungo, enquanto os isolados 2C, 3C, 37T, 39T, 22I, 21I, 27P, 12MA, 15MA, 7MA, 20MA, 18MA, 5J e 30SLT enquadram-se mais adequadamente em *C. acutatum*. As variações de comprimento e largura dos conídios deste grupo de isolados foram respectivamente 8,5-16,5 μm e 2,5-4 μm . As medidas dos conídios dos isolados 25P (3,1-17,0 μm), 36T (1,4-5,2 μm) e 19MA (1,4-12,5 μm) situaram-se em média divergentes à maioria das espécies de *Colletotrichum* normalmente associadas às frutíferas tropicais e subtropicais, incluindo goiabeiras.

Os valores médios da relação comprimento e largura dos conídios de *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose variaram de 2,8 a 5,6 μm (Tabela 3). Esses valores foram similares aos encontrados por Pereira (2009), de 2,7-5,5 μm , e Pereira (2016), com 2,47-4,59 μm , para isolados de goiabeira. Contudo, tais médias diferiram daquelas observadas para *C. gloeosporioides* associado a sintomas de antracnose em frutos de abacateiro, com 3,3 e 4,3 μm , mangueira, 3,2 e 4,7 μm , maracujazeiro, 2,9 e 3,7 μm , pessegueiro, 3,1 e 4,5 μm , e bananeira, 2,19-3,07 μm (Tozze Júnior et al. , 2015; Pereira, 2016).

Os apressórios dos isolados de *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose predominantemente mostraram-se levemente lobados (Figura 3B.). Outras formas de apressórios, também descritas para fungos desse gênero, são esférica, irregular e lobada ou clavada. De acordo com Moraes et al. (2013), essas formas, juntamente com as camadas da parede celular e enzimas, estão associadas a natureza da interação hospedeiro-patógeno e à competência apresentada pelos fungos quando do processo de penetração.

O comprimento médio dos apressórios variou de 7,3 a 11,3 μm , e a largura de 3,0 a 7,1 μm (Tabela 3), porém permanecendo dentro dos padrões estabelecidos por Sutton (1992) para *C. gloeosporioides* normalmente associados a sintomas de antracnose em frutíferas. No entanto, especificamente não há na literatura dados

relativos ao tamanho dos apressórios para isolados de *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose em goiabeira.

A relação entre o comprimento e a largura dos apressórios variou de 1,2 a 1,9 μm (Tabela 3). Esta característica não foi avaliada em estudos direcionados para isolados de *Colletotrichum* em goiabeira (Pereira, 2009; Stracieri, 2015; Pereira, 2016). Contudo, esta relação foi encontrada para fungos do gênero *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose em outras culturas, como mangueira (1,22-3,23 μm), mamoeiro (1,08-1,82 μm) e guaranazeiro (1,52-5,69 μm) (Andrade et al. , 2007; Pimenta, 2009; Cruz, 2014).

Dentro dos 26 isolados de *Colletotrichum* spp. cujos conídios foram analisados morfometricamente, e tomando-se como referência o comprimento médio e largura média dos conídios estabelecidos na literatura, pressupõe-se que na coleção estudada, nove isolados corresponderam a *C. gloeosporioides* e 14 a *C. acutatum*. Quando aos dados relativos aos apressórios, há limitação para o estabelecimento das espécies de *Colletotrichum* presentes nos frutos sintomáticos.

O emprego unicamente de características morfológicas como critério para a identificação taxonômica de fungos do gênero *Colletotrichum* apresenta muita limitação devido ao elevado polimorfismo do fungo (Weir et al. ,2012). Entretanto, técnicas adicionais visando maior sensibilidade do estudo, fazem-se necessárias. Em vista disso, e mediante estudo complementar, verificou-se que dos 27 isolados do estudo, 25 apresentaram amplificação quando submetidos à PCR (Figura 4) com os oligonucleotídeos CgInt/ITS4, específico para a espécie *C. gloeosporioides*. Os dois isolados restantes, 24I e 30SLT, não apresentaram amplificação com os oligonucleotídeos Calnt/ITS4 e Col1/ITS4, específicos para as espécies *C. acutatum* e *C. boninense*, respectivamente, e amplificaram apenas com os oligonucleotídeos Coll1F/Coll3Rb, específico para o gênero *Colletotrichum* (Figura 5).

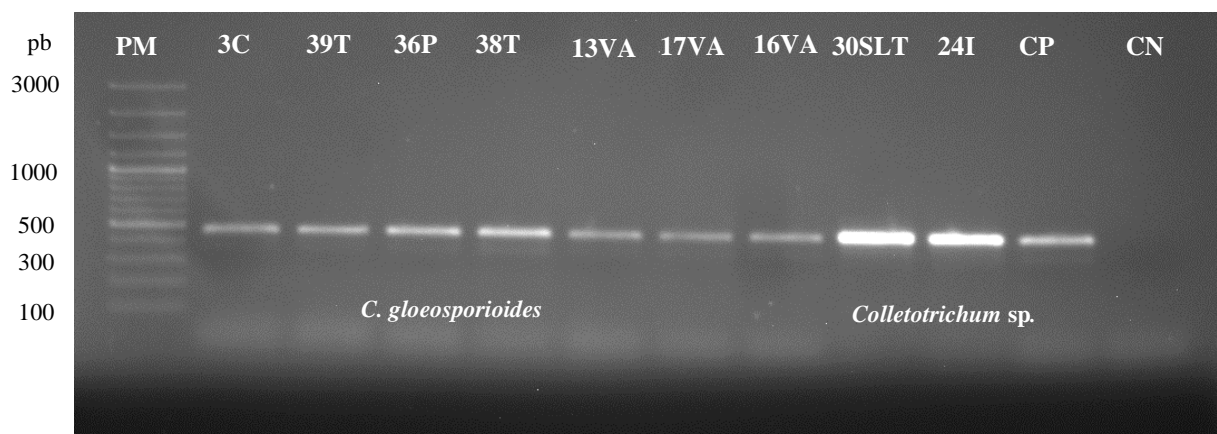


Figura 4. Eletroforese em gel dos produtos de amplificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. com os oligonucleotídeos CgInt/ITS4 (3C, 39T, 36P, 38T, 13VA, 17VA, 16VA) e Coll1F/Coll3Rb (, 30SLT, 24I). PM: 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). CP: isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* classificado pela análise do sequenciamento de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2. CN: controle negativo, mix livre de DNA.

Tabela 5. Caracterização das espécies de *Colletotrichum* isoladas de frutos de goiabeira com oligonucleotídeos específicos.

Isolados	Oligonucleotídeos				Espécie
	CgInt/ITS4	CaInt/ITS4	Col1/ITS4	Coll1F/Coll3Rb	
13 VA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
17 VA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
16 VA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
18 VA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
5 VA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
40 VA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
1 C	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
2C	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
3C	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
38 T	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
37 T	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
39 T	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
36 T	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
22 I	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
21 I	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
24 I	-	-	-	+	<i>Colletotrichum spp</i>
27 P	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
25 P	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
12 MA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
15 MA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
7 MA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
19 MA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
20 MA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
18 MA	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
5 J	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
30 SLT	-	-	-	+	<i>Colletotrichum spp</i>
1J.Q	+	-	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>

Fungos do gênero *Colletotrichum* têm ampla faixa de hospedeiros, compreendendo plantas frutíferas, hortícolas, cereais e plantas ornamentais. Em plantas frutíferas são descritas várias espécies de *Colletotrichum* associadas a sintomas de antracnose nos frutos. Levantamentos das espécies do fungo, associadas a plantas frutíferas com sintomas de antracnose, no Estado de São Paulo, evidenciaram a ocorrência das espécies dos Complexos *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense* em frutos de abacate, manga, maracujá (Tozze Júnior

et al. ,2015). Para o caso do estado de Alagoas, estudos semelhantes evidenciaram o envolvimento das espécies *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *C. magna* em associação com os hospedeiros pinheira e gravioleira (Kamei et al. ,2014).

Na goiabeira, embora já citado na literatura a presença de espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* como principais agentes causais da antracnose, fica evidenciada a constatação de pelo menos uma espécie adicional, cuja identificação taxonômica não pode ser concluída no presente trabalho. Estudos adicionais fazem-se necessários para a identificação da(s) espécie(s).

4.2. Sensibilidade a fungicidas

Todos os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* avaliados mostraram-se altamente sensíveis (AS) a tebuconazole, sem, contudo, ter sido constatada inibição completa do crescimento das colônias, independente dos isolados avaliados (Tabela 4). Em média, a inibição do crescimento das colônias foi superior a 42%, mesmo nas concentrações mais baixas (Tabela 5).

Tabela 4. Dados relativos à concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mínima necessária para inibição de 50% do crescimento de colônias de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* associados a sintomas de antracnose em frutos de goiaba das variedades Paluma e Tailandesa, e de duas cepas de *Colletotrichum* isoladas de mangueira das variedades Tommy Atkins e Bourbon (BR.F.TA13 e JA.F.B105), a tebuconazole, trifloxistrobina e tiofanato-metílico.

Isolados	Tebuconazole	Classificação ^x	Trifloxistrobina	Classificação ^x	Tiofanato metílico	Classificação ^x
25P	1,2	AS	6.772	AI	ND	ND
36 T	5,01	AS	ND	ND	ND	ND
19 MA	1	AS	7.495,40	AI	ND	ND
18 MA	< 1	AS	4.288,20	AI	ND	ND
2 C	< 1	AS	2.203,30	AI	ND	ND
17 VA	< 1	AS	≥ 8.000	AI	ND	ND
27 P	1,02	AS	6.651,90	AI	ND	ND
37 T	4,37	AS	>8.000	AI	ND	ND
15 MA	1,55	AS	>8.000	AI	ND	ND
16 VA	4,79	AS	ND	ND	ND	ND
1 J.Q	3,72	AS	3.352,90	AI	< 1	AS
BR.F.TA13	< 1	AS	1.985,90	AI	< 1	AS
JA.F.B105	< 1	AS	<1.000	AS	< 1	AS
12 MA	4,17	AS	>8.000	AI	ND	ND

^x AI – Altamente insensível; AS – Altamente sensível

ND – Não determinado devido a ausência de sensibilidade dos isolados

Tabela 5. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Colletotrichum gloeosporioides* oriundos de frutos de goiabeira com sintomas de antracnose e dos isolados BR.F.TA13 e JA.F.B.105 em diversas concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos fungicidas tebuconazole, trifloxistrobina e tiofanato-metílico em condições *in vitro*.

Isolados	Tebuconazole ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					Trifloxistrobina ($\times=1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$)					Tiofanato metílico ($\times=500 \mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	5	20	35	50	PIC	1	2	4	8	PIC	x	2,5x	5x	10x	PIC
25 P	78,3 b	92,3 a	96,6 a	97,6 a	91,2 c	27,5 b	37,6 ab	42,1 ab	53,5 a	40,2 cd	ND	ND	ND	ND	ND
36 T	42,2 b	98,3 a	98,7 a	99,2 a	84,6 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19 MA	79,3 b	94,5 a	96,3 a	98,1 a	92,1 bc	26,2 b	32,8 b	40,3 ab	51,4 a	37,7 de	ND	ND	ND	ND	ND
18 MA	65,5 c	74,2 b	81,1 a	82,4 a	75,8 e	41,9 b	46,9 ab	49,2 ab	62,0 a	50,0 bc	ND	ND	ND	ND	ND
2 C	88,2 b	97,2 a	98,0 a	98,9 a	95,6 ab	46,5 a	49,4 a	55,3 a	62,5 a	53,4 b	ND	ND	ND	ND	ND
17 VA	80,0 b	92,6 a	94,7 a	96,7 a	91,0 c	26,1 b	33,7 ab	40,3 ab	49,4 a	37,4 de	ND	ND	ND	ND	ND
27 P	77,8 c	90,7 b	95,0 ab	96,6 a	90,1 c	24,7 b	37,9 b	38,0 b	56,1 a	39,2 de	ND	ND	ND	ND	ND
37 T	53,9 c	86,7 b	96,4 a	96,5 a	83,4 d	30,0 b	25,8 ab	36,3 ab	44,6 a	34,2 de	ND	ND	ND	ND	ND
15 MA	78,1 c	93,8 b	96,1 ab	100,0 a	92,0 c	12,9 c	24,3 bc	36,4 ab	46,2 a	29,9 e	ND	ND	ND	ND	ND
16 VA	51,6 c	80,8 b	90,4 a	93,6 a	79,1 e	-2,8 c	12,4 bc	15,1 ab	29,0 a	13,4 f	ND	ND	ND	ND	ND
1 J.Q	76,2 c	83,8 b	88,0 ab	90,3 a	84,6 d	37,5 b	45,6 ab	52,4 ab	61,2 a	49,2 bc	98,2 a	98,0 a	98,1 a	100,0 a	98,6 a
BR.F.TA13	77,4 b	92,4 a	94,0 a	96,4 a	90,1 c	43,0 b	50,1 b	53,9 ab	67,7 a	53,7 b	87,8 a	85,1 a	83,2 a	86,1 a	85,6 b
JA.F.B105	96,6 a	98,7 a	98,9 a	99,0 a	98,3 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	93,4 a	94,4 a	94,8 a	94,2 a	94,2 ab
12 MA	50,2 c	64,8 b	66,7 ab	71,9 a	63,4 f	21,9 a	25,9 a	31,2 a	37,7 a	29,2 e	ND	ND	ND	ND	ND
Média	86,5					40,4					92,8 ^Y				

ND – Não determinado devido a não significância (NS) na análise estatística de regressão polinomial

*Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,5% de probabilidade

^Y Valor médio equivalente ao comportamento de três isolados de *Colletotrichum* os quais foram inibidos em meio de cultura contendo tiofanato-metílico

A porcentagem média de inibição do crescimento micelial (PIC) das colônias dos isolados JA.F.B105 e 2C foi de 98,3% e 95,6%, respectivamente, sendo os mais sensíveis em relação a tebuconazole (Tabela 6). Foi constatado relação positiva direta entre incremento das concentrações do fungicida e taxas médias de inibição do crescimento das colônias conforme média geral de PIC de 86,5%.

Com exceção de JA.F.B105, todos os demais isolados de *Colletotrichum* avaliados mostraram-se altamente insensíveis a trifloxistrobina, independente das dosagens avaliadas (Tabela 4). O isolado apontado, mostrou-se muito sensível ao trifloxistrobina, sendo totalmente inibido na menor concentração avaliada. A média de inibição das colônias foi de 40,4%, comprovando a baixa a muito baixa sensibilidade dos isolados de *C. gloeosporioides* avaliados. Dentre os isolados avaliados, quatro deles apresentaram crescimento de colônia em concentração superior a $8.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para se atingir a concentração mínima necessária para inibição de 50% do crescimento micelial.

Em relação a tiofanato-metílico, com exceção dos isolados 1J.Q, BR.F.TA13 e JA.F.B105, todos os demais mostraram-se insensíveis ao fungicida, independente das concentrações avaliadas. Para estes isolados, o valor correspondente à concentração mínima necessária para inibição de 50% do crescimento de colônia foi inferior a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 4). Os demais isolados, por outro lado, mostraram-se insensíveis, apresentando padrão de crescimento médio semelhante ao observado quando da ausência de fungicida.

O padrão de crescimento dos isolados de *C. gloeosporioides* avaliados, para os fungicidas tebuconazole e trifloxistrobina, ajustaram-se, na sua maioria, ao modelo polinomial de segundo grau (Tabela 6). Para alguns isolados, o modelo foi melhor ajustado segundo uma equação linear. De forma semelhante ao observado quando da determinação dos valores de concentração mínima necessária para inibição de 50% do crescimento micelial e PIC, para o tratamento constituído por tiofanato-metílico não foi constatado significância para a maioria dos isolados avaliados *in vitro*.

Tabela 6. Representação dos ajustes das equações dos coeficientes de determinação (R^2) em função do comportamento de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* associados a sintomas de antracnose em frutos de goiabeira e BR.F.TA13 e JA.F.B105, expostos a diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos fungicidas tebuconazole, trifloxistrobina e tiofanato-metílico.

Isolados	Fungicidas/Equações e valores de R^2					
	Tebuconazole	R^2	Trifloxistrobina	R^2	Tiofanato-metílico	R^2
25 P	$y = 68,988 - 90,402x + 30,398x^{2**}$	0,9954	$y = 69,473 + 2,8568x - 3,1658x^{2**}$	0,9948	ND	ND
36 T	$y = 33,646 - 21,278x^{**}$	0,9584	ND	ND	ND	ND
19 MA	$y = 65,928 - 88,582x + 30,270x^{2**}$	0,9966	$y = 66,302 + 4,0281x - 3,2461x^{2**}$	0,9977	ND	ND
18 MA	$y = 61,352 - 65,594x + 21,570x^{2**}$	0,9896	$y = 62,299 - 9,2728x^{**}$	0,9827	ND	ND
2 C	$y = 65,505 - 99,364x + 36,829x^{2**}$	0,9918	$y = 66,313 - 10,374x^{**}$	0,9973	ND	ND
17 VA	$y = 60,608 - 82,029x + 28,564x^{2**}$	0,9942	$y = 61,082 + 2,6025x - 2,6626x^{2**}$	0,9995	ND	ND
27 P	$y = 68,894 - 89,312x + 30,103x^{2**}$	0,9944	$y = 69,403 + 6,3567x - 4,0935x^{2**}$	0,9740	ND	ND
37 T	$y = 46,348 - 39,410x + 7,3176x^{2**}$	0,9966	$y = 46,562 - 4,7686x^{**}$	0,9306	ND	ND
15 MA	$y = 48,356 - 62,646x + 20,616x^{2**}$	0,9955	$y = 48,699 + 9,7092x - 4,0112x^{2**}$	0,9949	ND	ND
16 VA	$y = 46,297 - 36,185x + 6,1508x^{2**}$	0,9993	$y = 46,205 + 11,593x - 3,8513x^{2**}$	0,9533	ND	ND
1 J.Q	$y = 69,662 - 87,925x + 30,827x^{2**}$	0,9880	$y = 70,389 - 1,8581x - 2,3589x^{2**}$	0,9998	$y = 65,626 - 18,393x^{**}$	0,917
BR.F.TA13	$y = 68,711 - 89,800x + 30,511x^{2**}$	0,9962	$y = 69,102 - 3,2520x - 2,1579x^{2**}$	0,9939	$y = 64,569 - 15,504x^{**}$	0,895
JA.F.B105	$y = 55,004 - 92,113x + 36,232x^{2**}$	0,9840	$y = 55,757 - 32,513x + 4,6951x^{2**}$	0,9997	$y = 52,134 - 13,917x^{**}$	0,916
12 MA	$y = 57,008 - 46,452x + 13,538x^{2**}$	0,9959	$y = 57,198 + 2,6123x - 2,0922x^{2**}$	0,9813	ND	ND

ND – Não determinado devido a não significância (NS) na análise estatística de regressão polinomial

A eficiência de tebuconazole *in vitro*, observada nesse estudo, mostra-se convergente aos resultados obtidos por Fischer et al. (2012). Segundo dados obtidos por estes investigadores, a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, este fungicida inibiu completamente o crescimento das colônias de dois isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* oriundos de sintomas de antracnose em frutos de goiabeira. No presente estudo, o maior valor de PIC foi observado na maior concentração avaliada ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Embora apenas um dos isolados avaliados tenha sido totalmente inibido por tebuconazole, nessa concentração, os isolados mostraram-se altamente sensíveis ao fungicida, apresentando redução de 50% da taxa de crescimento das colônias (PIC) quando submetidos à concentração contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

No Brasil, o registro de tebuconazole, de forma isolada, se aplica unicamente para o controle da ferrugem da goiabeira (*Puccinia psidii* Winter). Entretanto, quando associado a trifloxistrobina, o seu registro estende-se também para o controle *C. gloeosporioides*, cuja dosagem varia de $0,60$ a $0,70 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$, empregando-se vazão média de 500 a $1.000 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ (AGROFIT, 2018). Por se tratar de formulação que contém 200 gramas do ingrediente ativo por litro de produto formulado, significa que a dosagem, em ingrediente ativo, é de $0,12$ a $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uma concentração inferior àquela testada no presente estudo. Estudos complementares empregando-se concentrações inferiores a $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indicarão as concentrações mínimas para o controle dessa espécie de *Colletotrichum*, o que certamente revalidarão as dosagens para o controle desses patógenos.

Na cultura da goiabeira, no Brasil, não há registro para o uso isolado de trifloxistrobina ou outros fungicidas do grupo das estrobilurinas, no controle de doenças associadas à cultura. Este fungicida é registrado para a cultura somente em mistura com o fungicida tebuconazole, em formulação comercial (Nativo®, 100 g de trifloxistrobina + 200 g de tebuconazole, Bayer S.A., São Paulo), na dosagem de $0,60 \text{ L ha}^{-1}$ e vazão entre 500 e 1.000 L de calda ha^{-1} (AGROFIT, 2003), ou o equivalente a $0,06 \text{ g L}^{-1}$, ou $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em termos práticos, nossos resultados apontam a necessidade de concentrações significativamente mais elevadas, superiores a $8.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, em muitas situações. Dada a inexistência de estudos quanto à eficiência da combinação tebuconazole e trifloxistrobina, assim como

outras formulações comerciais de fungicidas triazóis e estrobilurinas, registradas para a cultura, avaliações a campo do controle da antracnose fazem-se justificáveis.

Fungicidas do grupo dos benzimidazóis, onde se inclui o tiofanato-metílico, não são registrados para a cultura da goiabeira, porém o são para o controle de múltiplos gêneros do fungo associados a diversas culturas, incluindo frutíferas (AGROFIT, 2018). Desta forma, os resultados ora obtidos, com constatação da ineficiência desses fungicidas no controle *C. gloeosporioides* associadas à goiabeira são indicações que reforçam a sua impropriedade para uso na cultura. A elevada frequência da doença sob condições naturais de cultivo (dados não apresentados), a prospecção de novas alternativas de controle desse complexo de doenças faz-se imprescindível.

Colletotrichum spp., agentes causais da antracnose, e *P. psidii*, agente causal da ferrugem, são os principais patógenos fúngicos associados à goiabeira (Hernández e Mendes, 2003; Sussel et al. , 2010; Galli et al. , 2015). Ambos os grupos de patógenos são controlados mediante formulação comercial constituída pela combinação contendo 100 g L⁻¹ trifloxistrobina + 200 g L⁻¹ de tebuconazole (AGROFIT, 2018; Sussel et al. ,2010).

As recomendações técnicas de uso desses fungicidas são para o máximo de até quatro aplicações por ano. Entretanto, devido ambas as doenças ocorreram de forma simultânea, ou isoladamente, em diversos períodos do ano é muito comum o uso continuado desses ingredientes ativos, às vezes em intervalos semanais, superando significativamente o número limite de aplicações anuais. Somado a este fato, áreas cuja produção seja destinada ao mercado de fruta fresca, por consequência das podas frequentes e sistemáticas, há vários fluxos vegetativos e reprodutivos, com consequente disponibilidade de folhas e frutos em períodos críticos de suscetibilidade, amplia-se o tempo de exposição de frutos aos diferentes patógenos, ampliando-se as necessidades das pulverizações mais regulares e em intervalos ainda menores.

Em nosso estudo foi constatada a grande eficiência de tebuconazole na inibição do crescimento de isolados de *C. gloeosporioides*. Por outro lado, o desempenho verificado para trifloxistrobina mostrou-se aquém dos níveis desejáveis, e, inferiores, em termos gerais, aos observados sob condições naturais de campo.

Os resultados ora obtidos indicam a ocorrência de baixa sensibilidade de *C. gloeosporioides* a trifloxistrobina, tanto para isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de frutos de goiabeira com sintomas de antracnose, como também aos isolados oriundos de mangueiras. É muito provável que esse fato deva-se ao uso recorrente desse princípio ativo, com vistas ao controle simultâneo da antracnose e ferrugem da goiabeira. Sob condições normais de cultivo, todavia, as respostas positivas até então obtidas pelos produtores de goiabas, nas áreas agrícolas contempladas neste estudo, advêm do efeito seu efeito combinado com tebuconazole, já que este apresenta alta capacidade inibitória do fungo, como demonstrado pelos testes *in vitro*.

Um possível efeito sinérgico das misturas dos grupos químicos triazóis e estrobilurinas não pode ser descartado, o que, em termos práticos, significa na potencialização das respostas de controle dos agentes causais. Todavia, a sensibilidade demonstrada pelos isolados de *C. gloeosporioides* oriundo de mangueira, ainda que em número de isolados pouco representativos, é indicativo da viabilidade da trifloxistrobina no controle do patógeno. Pese-se, entretanto, que no Brasil, há cinco espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose em mangueiras (Lima et al. , 2013).

Fungicidas do grupo dos benzimidazóis não são registrados para o controle de doenças fúngicas associadas à cultura da goiabeira. Em nossos estudos, a maioria dos isolados avaliados demonstraram-se insensíveis a tiofanato-metílico, independente das concentrações avaliadas, sinalizando a sua inconformidade técnica. Estes resultados corroboram informações prévias, apresentadas por vários pesquisadores, os quais indicaram a ineficiência deste princípio ativo no controle de *Colletotrichum* associado a sintomas de antracnose em frutos de goiabeira (Gutierrez-Alonso e Gutierrez-Alonso, 2003; Fischer et al. , 2012).

O manejo das doenças associadas às plantas é uma premissa importante para o sucesso agrícola (AGRIOS, 2005). Para o caso da goiabeira, cuja qualidade dos frutos é indispensável para bons preços no mercado e maior rentabilidade da cultura (Sussel et al. ,2010; Ferreira et al. ,2016), é fundamental a compatibilização das diversas alternativas para o controle das doenças associadas à cultura, especialmente diante de um cenário da inexistência de variedades resistentes

(Sussel et al. ,2010). O uso recorrente de fungicidas sistêmicos e translaminares, resultantes da mistura comercial, constitui-se em agravante do ponto de vista prático, pela possibilidade da seleção contínua de isolados de fungos resistentes (Brent, 1995), incluindo *Colletotrichum* spp., agentes causais da antracnose em goiaba. Ao longo do tempo, por consequência do aumento da vulnerabilidade dos princípios ativos, os prejuízos decorrentes da contínua redução da eficiência tendem a serem progressivamente mais elevados, caso medidas antirresistência não sejam adotadas.

Dentre as estratégias visando ao manejo da resistência de fungos aos fungicidas inclui-se o uso simultâneo ou intercalar de fungicidas protetores (Brent, 1995; Brent e Hollomon, 2007). Entretanto, para o caso do Brasil, somente os fungicidas cúpricos são registrados para a cultura, cujo uso mostra-se muito limitado por consequência dos riscos potenciais de fitotoxicidade aos frutos quando em tamanho entre 20 a 40 mm de diâmetro (Goes et al. , 2004).

5. CONCLUSÕES

- Isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos de goiabeira com sintomas de antracnose, oriundo de diversos municípios produtores do estado de São Paulo, são altamente polimórficos, como demonstrado pelas avaliações morfológicas de conídios e apressórios;
- O principal agente causal de antracnose em frutos de goiabeira no estado de São Paulo é a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*;
- Há pelo menos uma espécie adicional de *Colletotrichum* que não se enquadra às espécies descritas em associação com sintomas de antracnose em goiaba no estado de São Paulo;
- Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* associados a sintomas de antracnose em goiaba são altamente sensíveis a tebuconazole, em condições *in vitro*;
- Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* associados a sintomas de antracnose em goiaba são insensíveis a trifloxistrobina e tiofanato-metílico, em condições *in vitro*;

6. REFERÊNCIAS

Afanador-Kafuri L, Minz D, Maymon M, Freeman S (2003) Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology** 93: 579-587.

AGROFIT. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 16 de março de 2018.

AGRIOS GN (5 ed). (2005) Plant pathology. Burlington: Elsevier Academic Press. 952p.

Alfenas AC, Mafia RG Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC, Mafia RG (2 ed.) (2016) Métodos em Fitopatologia Viçosa: Ed. UFV.

Almeida IR de, Nachtigal JC, Stelnmetz S, Relsser Junior C, Cuadra S Zoneamento agroclimático da cultura da goiabeira na região Sul do Brasil. In: Nachtigal JC, Martins CR, Nachtigal GdeF (2015) **Sistema de produção de goiabas para pequenos produtores do Rio Grande do Sul**. Pelotas: EMBRAPA de Clima Temperado, p. 105. (Embrapa de Clima Temperado. Sistema de produção 22)

Andrade EM, Uesugi CH, Ueno B, Ferreira MASV (2007) Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Patogênicos ao Mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. 32:021-031. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000100003>

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2015. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta. 104p.

Barbosa JC, Maldonato Junior W (2015) **Experimentação agrônômica e AgroEstat: sistemas para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda. 396p.

Baroncelli R, Talhinhos P, Pensec F, Sukno SA, Floch G, Thon MR (2017) The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. **Frontiers in Microbiology** 8:1-7.

Belarmino LC Panorama da economia da goiaba no Brasil: locais de produção e comercialização, preços de mercado, custos e viabilidades dos negócios. In: Nachtigal JC, Martins CR, Nachtigal GF (2015) **Sistema de produção de goiabas para pequenos produtores do Rio Grande do Sul**. Pelotas: EMBRAPA de Clima Temperado, p. 105.

Bragança CD, Damm, Baroncelli, R, Massola Júnior, Crous PW (2016) Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brasil. **Fungal Biology** 20:547-561.

Brent JK (1995) Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC – Fungicide Resistance Action Committee. Brussels: GIFAP. 48p.

Brent JK e Hollomon DW (2007) Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Brussels: FRAC Monograph. 50p.

Cannon PF, Damm PR, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology** 73:181-213.

Cruz AA (2014) **Características morfo-culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. procedentes do Estado do Amazonas.**, 105p. Tese (Doutorado em Ciências) – USP, Piracicaba.

De Silva DD, Crous PW, Ades PK, Hyde KD, Taylor PWJ (2017) Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, 31:155-168.

Espinoza-Altamirano D, Silva-Rojas HV, Leyva-Mir SG, Marbán-Mendoza N, Rebollar-Alviter A (2017) Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from strawberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin fungicides. **Revista Mexicana de Fitopatología** 35:186-203.

Ferreira A, Lopes JC, Ferreira MFS, Soares TCB (2016) **Tópicos especiais em produção vegetal** 6 [e-book]. Alegre, ES: CAUFES 553p.

Fischer IH, Soares-Colletti AR, Palharini MCA, Parisi MCM, Amorim L (2017) Temporal progress and spatial patterns of quiescent diseases in guava influenced by sanitation practices. **Scientia Agricola** 74:68-76.

Fischer IH, Silva BL, Soares AR, Arruda MC, Parisi MCM, Amorim L (2012) Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba. **Ciências Agrárias** 33:2753-2766.

Flori JE (2016) Principais variedades de goiaba. **Revista Campo e Negócio**. Disponível em: <www.revistacampoenegocios.com.br/principais-variedades-de-goiaba/>. Acesso em: 18 mai. 2018

Galli JA, Fischer IH, Palharinini MCA, Michelotto MD (2015) Quantificação de doenças pós-colheita em acessos de goiabeira cultivados em sistema orgânico. **Revista Agropecuária Tropical** 45:225-230.

Gill KS (2016) Guavas. Punjab Agricultural University. Ludhiana, Índia: Elsevier Ltd. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/B9780123849472003639/3-s2.0-B9780123849472003639-main.pdf?_tid=f4503c86-0464-11e8-a7b50000aacb35feacdnat=1517169416_78758389d6d5a043fc02a446de9f175a. Acesso em: 28 Jan. 2018.

Goes A, Martins RD, Reis RF (2004) Efeito de fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente ou em combinação com mancozeb, na expressão de sintomas de fitotoxicidade e controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em goiabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura** 26:237-240.

Gonçalves RC, Alfenas AC, Mafia RG Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS AC, MAFIA RG (2 ed.) (2016) Métodos em Fitopatologia Viçosa: Ed. UFV.

Guédez C, Rodríguez D, Olivar R, Cañizalez L, Castillo C (2015) Eventos de pre-penetración, penetración y colonización de *Colletotrichum gloeosporioides* em flores y frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.). **Revista de la Facultad de Agronomía** 32:309-324.

Gutiérrez-Alonso O e Gutiérrez-Alonso JG (2003) Evaluación de resistência a benomil, thiabendazol y azoxystrobin para el control de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) and Sacc.] em frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) em Postcosecha. **Revista Mexicana de Fitopatología** 21:228-232.

Haider M, Bukhari SAA, Binyamin R, Habib A (2016) Fungi associated with guava anthracnose and mangement of *Colletotrichum gloeosporioides* through biological and chemical means. **Pakistan Journal of Phytopathology** 28:153-160.

Hernández AG, Mendes MAS (2003) Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://Brasil, 2003.agricultura.gov.br/Brasil, 2003_cons/principal_Brasil, 2003_cons>. Acesso em: 25 Mar. 2018

Huang F, Chen CG, Hou X, Fu YS, Cai L, Hyde KD, Li HY (2013) *Colletotrichum* species associated cultivated citrus in China. **Fungal diversity** 61:61-74.

IBGE 2016: instituto brasileiro de meio ambiente. **Áreas destinada à colheita e colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção de Goiaba, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação produtoras, Brasil**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?et=resultados>. Acesso em: 04 fev. 2018

Joshi MS, Sawant DM, Gaikwad AP (2013) Variation in fungi toxicant sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting fruit crops. **ISABB Journal of Food and Agriculture Science** 3:6-8.

Kamei SH, Costa JFO, Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA (2014) Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no Estado de Alagoas. v.36, edição especial, p. 209-216,. In: CONGRESSO INTERNACIONAL E ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ANNONACEAE: GENE À EXPORTAÇÃO **Anais....**, Botucatu, SP, p.5. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v36nspe1/v36nspe1a25.pdf>>. Acesso em: 03 Set. 2017.

Kuramae-Izioka EE (1997) A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar** 19:683-689.

Lima NB, Batista MVA, Morais Junior MA, Barbosa MAG, Michereff SJ, Hyde KD Câmara MPS (2013) Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity** 61:75-88.

Lima NB, Lima WG, Tovar-Pedraza JM, Michereff SJ, Câmara MPS (2015) Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from in northeastern Brasil. **European Journal of Plant Pathology** 141:679-688.

Lopes LNS, Silva AS, Pereira CCO, Menezes IPP, Malafaia G, Lima MLP (2015) Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Multi-Science Journal** 1:106-114.

Mafia RG, Alfenas AC Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS AC, MAFIA RG (2 ed.) (2016) Métodos em Fitopatologia Viçosa: Ed. UFV.

Mills PR, Sreenivasaprasad S, Brown AE (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters** 98: 137-144.

Moraes SRG, Escanferla ME, Massola Júnior NS (2015) Prepenetration and penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* into guava fruit (*Psidium guajava* L.): Effects of temperature, wetness period and fruit age. **Journal Phytopathology** 163:149-159.

Moraes SRG, Tanaka FAO, Massola Júnior NS (2013) Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura** 35:657-664.

Mosca S, Nicosia LDMG, Cacciola SO, Schena L (2014) Molecular Analysis of *Colletotrichum* Species in the Carposphere and Phyllosphere of Olive. **PLoS ONE** 9:1-21.

Oliveira PDL, Oliveira KR, Vieira WAS, Câmara MPS, Souza EL (2018) Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. Essential oil. **International Journal of Food Microbiology** 266:87-94.

Pereira FD (2016) **Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de diferentes frutas tropicais.** 119f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Pereira WV (2009) **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo.** 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – USP, Piracicaba.

Pileggi SAV, Oliveira SFV, Waculicz-Andrade CE, Vicente VA, Dalzoto PR, Cruz GK, Gabardo J, Massola Júnior NS, Torres Júnior HJ, Pileggi M, Kava-Cordeiro V, Galli-Teresawa LV, Pimentel IC, Glienke C (2009) Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*. **Canadian Journal of Microbiology** 55:1076-1088.

Pimenta AA (2009) **Caracterização morfométrica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)**. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Unesp, Jaboticabal.

Reetz ER, Kist BB, Santos CE, Carvalho C, Drum M (2015) Anuário de fruticultura. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta,. 104p.

Rozane DE (2017) Panorama nacional da produção de goiabas. Revista campo e negócio. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br/panorama-nacional-da-producao-de-goiabas-2/> . Acesso em: 07 Mar. 2018.

Sambrook J, Russell DW (3ed.) (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Londres: CSHL Press. 1448p.

Silva MCA (2016) **Caracterização morfológica, enzimática e processo inicial de colonização de *Colletotrichum guaranicola* patogênicos e endofítico**. 137p. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – UFAM, Amazônia.

Silva CA da, Pereira SMA, Souza TS, Ferreira A (2016) Goiabeira: aspectos econômicos e nutracêuticos. In: Ferreira A, Lopes JC, Ferreira MFS, Soares TCB **Tópicos especiais em produção vegetal 6** [e-book]. Alegre, ES: CAUFES 553p.

Soares-Colletti AR (2012) **Doenças quiescentes em goiabas: quantificação e controle pós-colheita**. 143f. Tese (Doutorado em ciências) - USP, Piracicaba.

Souza A de, Delphino Carboni RC, Wickert E, Macedo Lemos EG de, Goes A de (2013) Lack of host specificity of *Colletotrichum* spp. isolates associated with anthracnose symptoms on mango in Brazil. **Plant Pathology** 62:1038-1047.

Stracieri J (2015) **Caracterização morfocultural e molecular de *Colletotrichum* spp. associados a antracnose em manga, mamão e goiaba**, 109p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown A E, Mills PR (1996) PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology** 45:650-655.

Sussel AAB (2010) **Manejo de doenças fúngicas em goiaba e maracujá**. Planatina, DF: Embrapa Cerrados, 43p. (Embrapa Cerrados. Documentos 294).

Sutton BC (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ (1992) ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Oxon: CAB International. p.1-26.

Tozze Junior HJ, Firmino AC, Fischer IH, Furtado EL, Massola Junior NS (2015) Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa phytopathologica** 41:270-280.

Tozze Júnior HJ (2007) **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) USP, Piracicaba.

Weir, B.S.; Jhonston, P.R.; Damm, U. (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, v. 73, n. 1, p. 115-118. <https://doi.org/10.3114/sim0011>

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. eds. **Academic Press**, San Diego, CA. p. 315-322.