

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**“IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* DE ATEMÓIA
(*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), POR MEIO DE
CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, CULTURAL E MORFOLÓGICA”**

LUCIANA MITIKO TAKAHASHI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Novembro – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**“IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* DE ATEMÓIA
(*Annona cherimola x Annona squamosa*), POR MEIO DE
CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, CULTURAL E MORFOLÓGICA”**

LUCIANA MITIKO TAKAHASHI

Orientador: Professor Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Novembro – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

T136i Takahaki, Luciana Mitiko, 1982-
Identificação de *Colletotrichum gloeosporioides* de Atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica / Luciana Mitiko Takahaki . - Botucatu : [s.n.], 2008.
iii, 46 f. : il., color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2008

Orientador: Edson Luiz Furtado

Inclui bibliografia

1. *Colletotrichum gloeosporioides* . 2. Antracnose. 3. Enzimas. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE Colletotrichum gloeosporioides, DE ATEMÓIA,
POR MEIO DE CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, CULTURAL E
MORFOLÓGICA

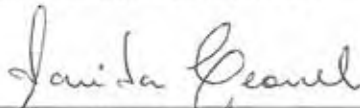
ALUNA: LUCIANA MITIKO TAKAHASHI

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

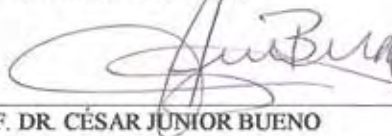
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROF. DR. SARITA LEONEL



PROF. DR. CÉSAR JÚNIOR BUENO

Data da Realização: 22 de agosto de 2008.

Aos meus pais Yasuyuki Takahashi e Shetsu Takahashi,

Ao Professor Nilton Luiz de Souza (*in memoriam*),

orientador da Graduação, da Pós-Graduação e da vida,

A Carlos Eduardo Shigueaki Nagata,

pelo apoio, paciência, compreensão e carinho,

Dedico.

AGRADECIMENTO

Ao Professor Edson Luiz Furtado, pela orientação.

Aos amigos Daniel Dias Rosa e Marco Antonio Basseto, pela grande ajuda na realização dos experimentos e orientação no trabalho dos dados.

Às colegas Juliana Cristina Sodário Cruz, Lina Wong, Alniusa Maria de Jesus e Andréia Nakatani pela amizade e ajuda nas horas difíceis.

Àos colegas da CEAGESP, pela compreensão, humanidade e apoio.

Aos colegas da Empresa Zillo Lorenzetti (Parcerias Agrícolas) pelo apoio e compreensão.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação pela paciência e auxílio.

Aos Professores Natália A. Rodrigues Peres (University of Florida – Gulf Coast Research and Education Center) pelos ensinamentos com o gênero *Colletotrichum* e Nelson Sidney Massola Júnior (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) pelos isolados enviados.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia por todos esses anos de ensinamentos e colaboração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1 A antracnose em anonáceas e demais frutíferas.....	8
4.2 O gênero <i>Colletotrichum</i> e sua caracterização.....	9
4.2.1 Caracterização morfológica.....	9
4.2.2 Caracterização das colônias.....	10
4.2.3 Outras formas de caracterização do gênero.....	10
4.2.4 Crescimento a diferentes temperaturas.....	12
4.2.5 Crescimento em meio contendo fungicida benomil.....	12
5 MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1 Local do experimento e coleta de isolados.....	14
5.2 Caracterização cultural.....	15
5.3 Caracterização morfológica.....	16
5.4 Caracterização patogênica.....	16
5.5 Caracterização enzimática.....	18
5.6 Sensibilidade à fungicida.....	19
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6.1 Caracterização cultural.....	21
6.1.1 Velocidade de crescimento das colônias.....	23
6.2 Caracterização morfológica.....	25
6.3 Caracterização patogênica.....	27
6.4 Caracterização enzimática.....	31
6.5 Sensibilidade a fungicida.....	35
7 CONCLUSÕES	36
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Identificação dos isolados utilizados, coletados de frutas tropicais e de atemóia, a localidade da coleta e o tecido de onde foi isolado.....	15
2. Características das colônias de isolados de atemóia (micélio e fundo da placa) e presença de microescleródios.....	22
3. Velocidade de crescimento micelial de isolados mantidos em BOD a 25°C.....	23
4. Velocidade média de crescimento micelial dos isolados no teste de Tukey a 5% de probabilidade e coeficiente de variação de 4,82%.....	25
5. Dados sobre a morfologia dos conídios dos isolados de atemóia, com respectivo percentual na suspensão de esporos.....	26
6. Valores médios da severidade média dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. inoculados em frutos de goiaba, laranja (cv. Pêra), manga (cv. Tommy Atkins), banana (cv. Nanica), atemóia e mamão (cv. 'Sunrise Solo').....	29
7. Característica enzimática dos isolados.....	34
8. Crescimento em meio contendo 10 mg/L de fungicida benomil e comportamento dos isolados de atemóia.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Frutos após desinfecção, preparados para a inoculação dos discos de micélio dos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.....	17
2. Frutos após inoculação, cobertos com plástico para criar um microclima apropriado para o desenvolvimento do fungo e para evitar possíveis contaminações.....	18
3. Colônias em meio BDA.....	22
4. Polígonos da velocidade de crescimento micelial dos isolados a diferentes temperaturas.....	24
5. Formato dos conídios.....	26
6. (A)- indica goiabas inoculadas. (B)- indica laranjas inoculadas com isolados de atemóia, marcação à caneta indica o diâmetro da lesão. (C)- mangas inoculadas com isolados de atemóia. A manga à direita apresenta halo necrótico bem visível, enquanto a da esquerda mostra pequena lesão. (D)- indica bananas inoculadas. (E)- indica atemóias inoculadas com isolado de atemóia e com meio BDA (testemunha). (F)- indica mamão inoculado com testemunha e com isolado de atemóia.....	28
7. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	30
8. Gráfico de diâmetro de halo em diferentes meios de cultura.....	32

1 RESUMO

A família das anonáceas possui cerca de 40 gêneros e mais de 2.000 espécies, a maioria de regiões de clima tropical ou subtropical. Dessas, muitas possuem características importantes e são de interesse comercial, sendo que o consumo tem apresentado um franco crescimento. As anonáceas têm como característica o sabor adocicado pronunciado e perfume bem característico dos frutos, sendo seu uso voltado para o consumo in natura ou na forma de polpas processadas pela indústria.

A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., tem se destacado como umas das principais doenças na cultura da atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), ocasionando danos em várias partes da planta e em frutos jovens, e também na pós-colheita, o que tem preocupado produtores da região devido a agressividade apresentada no campo.

O presente trabalho teve como objetivo a identificação das espécies de *Colletotrichum* spp., de isolados do fungo coletados de atemóia da região de Botucatu, por meio de estudos de caracterização patogênica, cultural e morfológica. Para auxiliar, espécies de *Colletotrichum*, devidamente identificadas, foram obtidas e inclusas também nos estudos de caracterização. O teste de patogenicidade e a inoculação cruzada dos isolados em diferentes frutos foi efetuada utilizando-se discos de 5mm de diâmetro de BDA contendo micélio de

Colletotrichum gloeosporioides, *C. musae*, *C. acutatum* e *Colletotrichum* spp. e procedendo-se com a utilização de diferentes frutas tropicais e subtropicais. Foram também realizadas a caracterização enzimática, onde avaliou-se a produção das enzimas proteases, celulasas, amilases e lipases através da mensuração do diâmetro do halo formado em torno das colônias, comparou-se a morfologia das colônias e largura de conídios, sua forma e a presença ou não de microescleródios. Culturalmente estudou-se a coloração das colônias assim como a taxa de crescimento a diferentes temperaturas e o crescimento em meio suplantado com o fungicida Benomy.

Após a realização de todos os ensaios, foi constatada a ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* causando antracnose nos frutos jovens, ramos, folhas e flores de atemóia na região de Botucatu.

IDENTIFICATION OF *COLLETOTRICHUM* GLOEOSPORIOIDES OF ATEMOYA (*ANNONA CHERIMOLA* X *ANNONA SQUAMOSA*) BY USING MORPHOPATHOGENIC AND CULTURAL CHARACTERIZATION. Botucatu, 2008. 40p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista.

Author: Luciana Mitiko Takahashi

Adviser: Edson Luiz Furtado

2 SUMMARY

Annonaceae family has approximately 40 genera and more than 2,000 species; most of which are from tropical and subtropical regions. Many of these plants are commercially important and have been increasingly consumed. They present highly sweet taste and their fruits have a typical aroma. The fruits are consumed *in natura* or as industrially processed pulps.

Anthracnose, caused by *Colletotrichum* sp., has been one of the main diseases that affects atemoya (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) crop, leading to injuries in several plant parts, as well as in young and post-harvested fruits. This is a worrying fact for producers of Botucatu region due to the severity of this disease in the field.

The present study aimed at identifying anthracnose causal agent through pathogenic and enzymatic assays, besides cultural and morphological characterization of isolates collected from Annonaceae plants in Botucatu region. In addition, fruit cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates, already identified, from different tropical and subtropical species was evaluated to help in this identification. Enzymatic characterization consisted of analyzing the production of proteases, cellulases, amylases and lipases. The diameter of the halos formed around the colonies was measured in order to compare colony morphology and conidium width, shape and presence or absence of microsclerotia. Colonies were assessed as to coloration, growth rate at different temperatures, and growth in medium supplemented with Benomyl fungicide. Isolates were collected in the producing region of Botucatu. For the pathogenicity test, crossed inoculation was carried out in different tropical

and subtropical fruits by using 5mm-diameter PDA disks containing *C. gloeosporioides*, *C. musae* and *Colletotrichum spp.* mycelia.

After isolate characterization, only *Colletotrichum gloeosporioides* was identified as anthracnose causal agent in atemoya young fruits, branches and leaves in Botucatu region.

Keywords: *Colletotrichum* sp., atemoya, *Annona cherimola* x *Annona squamosa*, characterization.

3 INTRODUÇÃO

O consumo de atemóia vem apresentando crescimento tão expressivo que a fruta foi incluída nas pesquisas de economia da produção do Instituto de Economia Agrícola (IEA), despertando o interesse do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI).

A produção de frutas da família das anonáceas para a comercialização no Brasil é uma realidade a ser encarada, sendo uma importante alternativa do agronegócio (JOSÉ, 1997), porém, ainda há um grande espaço a ser explorado tanto no mercado interno quanto no mercado externo. As anonáceas agradam ao paladar do mercado europeu e asiático, havendo ainda uma grande fatia a ser explorada. Nesse contexto, as espécies de *Colletotrichum* assumem grande importância por causar perdas na produção e devido sua ocorrência em uma grande gama de hospedeiros, tanto em pré como em pós-colheita (DODD et al., 1992).

As frutas da família das anonáceas são cultivadas em várias regiões do globo, embora de distribuição restrita a alguns países (KAVATI, 1992). Segundo Ramos (2001), o Brasil e a Venezuela destacam-se como os principais países produtores da graviola

(*Annona muricata* L.), constituindo esta, a fruta de maior interesse para o processamento industrial na medida em que está relacionada com a produção de polpas congeladas para a produção de sucos. As demais espécies se destacam pelo consumo *in natura*, sendo comercializadas nos centros de distribuição com destino à mesa.

O interesse pela produção das anonáceas tem aumentado em todo o mundo; no Brasil, as anonáceas pertencem a um grupo de produtos com potencial de crescimento de consumo, ainda barrado pela falta de oferta (MELLO et al., 2003). As frutas comercializadas são ainda carentes de padronização e a qualidade das frutas produzidas é um dos principais fatores que prejudicam as exportações brasileiras (NEVES, 1997) e impedem o alcance de valores maiores no mercado interno (AGRIANUAL, 2004). Outro problema verificado é a falta de conhecimento técnico para informar o ponto de colheita de algumas espécies, de forma que cheguem aos mercados consumidores no ponto certo de maturação correta.

O cultivo das anonáceas é dividido em pólos de produção em decorrência das exigências climáticas de cada espécie e também devido a hábitos de consumo regionalizados, ainda que o consumo se concentre, geralmente, nas classes mais altas, no caso da atemóia (NOGUEIRA et al., 2005), e dependente do maior conhecimento e divulgação dessas frutíferas em outras localidades e centros de consumo.

Atualmente, existem cerca de 10.000 ha cultivados, sendo 1.000 ha de atemóia, em propriedades no estado de São Paulo, Bahia, sul de Minas Gerais, Rio de Janeiro e norte do Paraná. A cherimóia ainda tem cultivo insipiente no país, sendo encontrada em algumas localidades de São Paulo e de Minas Gerais (NOGUEIRA et al., 2005), embora tenha sido constatado o crescimento da produção de mudas, indicando uma ampliação nas áreas de produção.

A região de Botucatu destaca-se como o décimo quarto maior fornecedor de atemóia no maior entreposto do estado, a CEAGESP, sendo responsável pelo fornecimento de 35 toneladas da fruta no ano de 2007, ficando atrás de cidades como Mogi das Cruzes, São Miguel Arcanjo e Itaí (FÁBIO GODAS, comunicação pessoal). Só no Estado de São Paulo, o volume comercializado da fruta chegou a 1.850 toneladas de atemóia, considerando que o preço médio do quilograma da fruta alcançou uma média de R\$ 3,41

somente a comercialização da atemóia resultou numa movimentação da ordem de 6 milhões de reais somente no entreposto.

As principais espécies cultivadas são a *Annona squamosa* L., conhecida como fruta do conde; a *Annona muricata* L., conhecida como graviola e o híbrido *Annona cherimola* x *Annona squamosa*, conhecida como atemóia. As duas primeiras preferencialmente de clima tropical e a última adaptada ao clima temperado.

No Estado de São Paulo são cultivados a fruta-do-conde (*A. squamosa* L.), a fruta-da-condessa (*A. reticulata*), a atemóia (*A. cherimola* x *A. squamosa*) e a graviola (*A. muricata* L.). Na região oeste, sul e no Vale do Paraíba, predominam o cultivo da atemóia; na região da Serra da Mantiqueira ocorre o cultivo predominante da cherimola e na região de Jales, encontram-se propriedades de pinha e também de atemóia (Kavati, 2004).

Nesse contexto ganha importância o estudo da antracnose, doença provocada pelo fungo do gênero *Colletotrichum*, responsável pelas principais perdas em frutas pós-colheita e que vêm causando prejuízos aos agricultores da região de Botucatu. Na região de Botucatu e Pardinho, a doença é geralmente detectada nos períodos de alta temperatura de dia, com ligeira queda à noite, geralmente nos locais onde houve adubação nitrogenada em excesso. O fungo, nessas condições, produz lesões necróticas graves, resultando em manchas nas folhas de várias idades, galhos e frutos jovens, que acabam por se tornar mumificadas e não desenvolvem, permanecendo na planta por longos períodos e servindo de fonte de inóculo constante ao longo do desenvolvimento da planta.

Consistem nos objetivos do presente trabalho a identificação do agente causal de antracnose nos frutos jovens, ramos, folhas e flor de atemóia na região produtora de Botucatu, através da utilização de diversas técnicas, como a caracterização patogênica, cultural e morfológica. Nos testes de caracterização, foram inclusas espécies de *Colletotrichum* previamente identificados, com o intuito de auxiliar no processo de identificação.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A antracnose em anonáceas e demais frutíferas

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, encontra-se como uma das principais doença da cultura, junto da podridão da casca e da podridão parda (SÃO JOSÉ et al., 2004), sendo que seu controle leva a perdas de até 5% no custo de produção da atemóia (MELLO et al., 2004).

O fungo causador da antracnose tem sido reportado atacando folhas, ramos e frutos, em diversas fases do desenvolvimento e provocando pontos escuros que podem coalescer. O fungo tem sido relatado provocando sintomas típicos da doença em um grande número de plantas hospedeiras, sendo que as maiores perdas econômicas ocorrem quando as frutas são atacadas (SIMMONDS, 1965; ALVAREZ & NISHIJIMA, 1987; JEFFRIES et al., 1990; BAILEY & JEGER, 1992; AGOSTINI et al., 1992; ALAHAKOON et al., 1994). Os fungos do gênero *Colletotrichum*, também são reportados como a principal causa de perdas de produção no mundo, tanto em pré-colheita como em pós-colheita (DODD et al., 1992; BENATO, 1999, PERES et al. 2002).

A espécie *C. gloeosporioides* pode atacar os mais diversos hospedeiros, nos mais diversos estádios de desenvolvimento da planta, sendo reportados em manga acarretando danos em frutos recém formados, com infecção quiescente nos quais os sintomas

podem ser observados quando do amadurecimento do fruto (PRUSKY & PLUMBIEY, 1992; BENATO, 1999). Esse fungo também é o principal causador de podridões, como a antracnose de pecíolos, folhas, murcha e podridão de raiz, flores, frutas, além de causar a seca de plântulas. O patógeno também aparece com destaque em infecções quiescentes em frutas tropicais como goiaba, mamão, manga, abacate e maracujá e em frutas subtropicais como citros, morango e uva (JEFFRIES et al., 1990; BAILEY & JEGER, 1992).

No Brasil, apenas o *C. gloeosporioides* foi identificado como causador de antracnose em anonáceas (FREIRE et al. 1997), assim como em outros locais da América do Sul, onde há plantações comerciais de plantas da mesma família (Álvarez et al., 2004 e Villanueva-Arce et al., 2005), porém, segundo Villanueva-Arce et al. (2005), foram encontrados isolados de *C. fragariae* em frutos de cherimólia em plantações no México e o mesmo pode ocorrer no Brasil. Segundo Peres et al. (2005) tem sido realizados muitos estudos para elucidar a etiologia das doenças causadas por *Colletotrichum* spp. e a dinâmica de suas populações.

Visto que o fungo *Colletotrichum* spp. é um importante causador de perdas em frutíferas de clima tropical e subtropical e sendo de difícil controle por desenvolver infecção quiescente, é de extrema importância a correta identificação do agente etiológico responsável pela doença na cultura para a escolha de medidas de controle adequadas.

A presença de várias espécies de *Colletotrichum* em um mesmo cultivo é frequente, por exemplo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em goiaba (PERES et al., 1998), abacate, mamão (SIMMONDS, 1965), maçã (SHI et al., 1996), pêssego, noz pecã (BERSTEIN et al., 1995; CARVALHO e LEITE, 1998) e uva (KUMMUANG et al., 1996). Foram encontrados associações de dois ou mais agentes etiológicos causando sintomas de antracnose em frutos de graviola na Colômbia (ÁLVAREZ et al. 2004) e o mesmo pode estar ocorrendo no Brasil, necessitando, portanto, mais estudos relacionados à esta cultura.

4.2 O Gênero *Colletotrichum* e sua caracterização

4.2.1 Caracterização morfológica

O gênero *Colletotrichum* foi estabelecido por Corda, caracterizado como formador de micélio hialino, com conídios fusiformes, curvos e formados em acérvulos; a delimitação das espécies de *Colletotrichum* tem sido baseada nas semelhanças tradicionais como o tamanho e formato dos conídios, características das colônias, morfologia do apressório e especificidade do hospedeiro (SIMMONDS, 1965; SUTTON, 1980; SMITH & BLACK, 1990). O formato das setas produzidas também pode ser utilizado na distinção de *Colletotrichum*, diferenciando *C. gloeosporioides* de *C. acutatum* e de *C. fragariae* em estudo realizado em folhas de morangueiro (GUNNEL & GUBLER, 1995).

Em estudo de identificação de isolados de *Colletotrichum* em morangos, na França, Denoyes & Baudry (1995) verificaram que os isolados de *C. gloeosporioides* apresentam conídios com extremidades predominantemente cilíndricos, enquanto *C. acutatum* apresenta conídios com extremidades pontiagudas e *C. fragariae* apresenta conídios com uma extremidade arredondada e outra pontiaguda. De acordo com Gunnell & Gubler (1992), o formato dos conídios é de grande importância na identificação das espécies, mas não deve ser considerado o único parâmetro a ser considerado, uma vez que o fungo pode sofrer influências do ambiente, o que pode levar a alterações na estabilidade desta característica (FREEMAN et al., 1998).

4.2.2 Caracterização das colônias

As colônias de *Colletotrichum* variam quanto à coloração entre isolados, entre espécies e entre isolados da mesma espécie, sendo esta última menos acentuada (SIMMONDS, 1965). Colônias de *C. gloeosporioides* apresentam-se primeiramente brancas ou cinza-claro, o substrato permanece creme e em alguns casos ocorrem difusões cinza escuro com margens mais claras ou róseas, assim como a massa de conídios (SIMMONDS, 1965) e têm crescimento rápido e cotonoso (SMITH & BLACK, 1990; AGOSTINI et al., 1992; LIYNIAGE et al., 1992; BERSTEIN et al., 1995; SHI et al., 1996; ADASKAVEG & HARTIN, 1997).

4.2.3 Outras formas de caracterização do Gênero

Outros métodos utilizados com grande sucesso no auxílio da caracterização do gênero são os moleculares, através da técnica de PCR que alia o uso de oligonucleotídeos específicos para determinadas espécies como o CaInt2/ITS4 e o CgInt/ITS4 para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992; SREENIVASAPRAD et al., 1996), utilizados com sucesso em diversas culturas como pêssigo, mamão, maracujá, citros, manga, abacate, amêndoa e morango (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; PERES et al. 2002; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; HARTIN, 1997). Outras técnicas também podem ser utilizadas como o RAPD, utilizado por Sharma et al. (2005) em pimenta e Almeida & Coêlho (2005) em maracujá, e o RFLP em várias culturas (CORREL; RHOADS; GERBER, 1993; ANDRADE et al., 2007).

Outros caracteres que auxiliam na diferenciação das espécies do gênero são a taxa de crescimento e a coloração da colônia. De uma forma geral, o crescimento e a coloração podem ser divididos em FGG, KLA e SGO, respectivamente “fast-growing gray”, “key lime anthracnose” e “slow growing orange”, determinados por Timmer e Mitchell (1992), o primeiro foi posteriormente identificado como *C. gloeosporioides* e os demais como *C. acutatum* (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; ZULFIQAR; LANSKY; TIMMER, 1996). Ainda de acordo com a coloração da colônia, Berstein et al. (1995) estudando isolados obtidos de abacate, maçã, morango, pecã e pêssigo, constatou que os isolados identificados como *C. acutatum* apresentavam coloração rosada e alaranjada e os isolados identificados como *C. gloeosporioides* apresentavam colônias de coloração acinzentada.

Alguns pesquisadores têm utilizado a atividade enzimática das espécies para auxiliar na caracterização dos isolados, sendo este método, portanto de grande valia na tarefa. De acordo com Couto et al. (2002), a produção de enzimas extracelulares (com atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica), em meio sólido, permitiu a distinção entre isolados de *C. musae* (Berk & Curtis) von Arx, em banana, assim como Lima & Chaves (1992) em *C. gossypii* em algodão.

A caracterização patogênica também é um método interessante e utilizado por diversos pesquisadores pois, assim como diversos casos de especificidade são relatados, nos quais diversas espécies estão relatadas para um mesmo hospedeiro (SMITH & BLACK, 1990), o contrário também ocorre, sugerindo a patogenicidade cruzada como um

método complementar de diferenciação dos isolados, segundo Deyones & Baudry (1995); Muniz *et al.* (1998); Furtado *et al.* (1999) e Peres *et al.* (2002).

A caracterização enzimática possibilita a diferenciação por meio da determinação da produção de enzimas (difusão em substrato sólido, no caso, meio BDA) (NEIROTT & AZEVEDO, 1988; PATERSON & BRIDGE, 1994), uma vez que os fungos apresentam diferenças quanto a quantidade de enzimas produzidas (no caso lipase, protease, amilase, celulase, pectinase, protease, urease, peroxidase, gelatinase e lacase (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.2.4 Crescimento a diferentes temperaturas

A temperatura exerce grande influência no crescimento micelial dos fungos do gênero *Colletotrichum*, fato que foi estudado por Simmonds em 1965, num estudo onde verificou que colônias de *C. acutatum* submetidas a temperaturas de 15° a 36 C°, cresciam a velocidades diferentes das submetidas a temperaturas próximas a 32° C. O pesquisador também verificou que a temperatura ideal para seu crescimento era entre 25° e 26,5° C. Para *C. gloeosporioides* var. *minor*, a temperatura ótima para crescimento era de 26° a 28,5° C, sendo a temperatura máxima de 35,5° C. Simmonds também inferiu que para *C. musae* a temperatura máxima para o crescimento micelial era de 38° C, apresentando crescimento entre 27° e 30° C, cessando crescimento em temperaturas abaixo de 15° C.

No morango, as espécies causadoras de antracnose podem ser diferenciadas pela velocidade do crescimento micelial radial em meio BDA, segundo observou Smith & Black (1990), isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* submetidos a 28° e 32° C diferenciam-se após 5 dias de crescimento, fato também verificado por Denoyes & Baudry (1995).

4.2.5 Crescimento em meio contendo fungicida benomil

A sensibilidade a fungicidas também pode ser utilizada como método de diferenciação de espécies do gênero, porém, a utilização constante de fungicidas no campo, em grande parte de forma indiscriminada, tem promovido o aparecimento de resistência aos

produtos químicos utilizados (SALES JÚNIOR; TORRES; GUIMARÃES, 2007). O primeiro caso relatado no gênero surgiu em 1985, na cultura da maçã com a forma teleomórfica *Glomerella cingulata* e o fungicida conhecido como benomil (FORTES, 1985). Logo outros relatos foram identificados em outras culturas como no morango e no feijão (TANAKA; PASSOS; BETTI, 1997; MARINGONI; BARROS, 2002). O fungo porém, pode ter também uma resistência natural, sendo menos sensível a determinadas moléculas, de forma que a seleção de indivíduos mais resistentes não é a única forma de encontrar indivíduos menos resistentes na natureza. A característica de resistência é, porém estável e herdável e deve ser considerada no manejo das culturas.

O fungicida benomil possui ação protetora e erradicante contra vários patógenos de várias culturas e foi, por muito tempo (aproximadamente 30 anos), utilizado largamente na agricultura mundial. Segundo Peres et al. (2004), o fungicida atua na inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* em flores de laranja, mas não possui a capacidade de inibir a germinação dos conídios, ou de matar o fungo (PERES et al. 2002.).

No caso de *C. gloeosporioides*, sabe-se que é menos sensível a mancozebe e captafol que *C. capsici* (THIND; JHOOTY, 1990), ao passo que *C. acutatum* é menos sensível a benomil, captana e propiconazol e mais sensível a moclobutanil e tebuconazol do que *C. gloeosporioides* (BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG; FOSTER, 2000; VINNERE, 2004).

Dos últimos anos para cá, foram detectados inúmeros casos de resistência envolvendo o patógeno e o fungicida, sendo, devido ao fato, utilizado ultimamente como método de diferenciação entre as espécies do gênero, também em outras espécies de fungos e em várias culturas (SONODA e PELOSI, 1988; KOENRAADT et al., 1992; PICININI, 1994; HEWITT, 1998).

Todas essas características, porém, podem sofrer grandes variações de acordo com as condições climáticas e com as características apresentadas pelos hospedeiros, não podendo de forma alguma ser utilizadas isoladamente para a identificação e diferenciação das espécies.

5. Material e Métodos

O presente experimento foi realizado no Departamento de Produção Vegetal (DPV)/ Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas-FCA/ UNESP/ Botucatu-SP.

5.1 Local do experimento e coleta de isolados

Os isolados de *Colletotrichum* spp. foram coletados de frutos, ramos, flores e folhas de anonáceas, apresentando sintomas de antracnose, em propriedades da região de Botucatu.

Os isolados provenientes de outras frutíferas foram fornecidos pelo Prof. Dr. Nelson S. Massola Jr., da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, sendo esses isolados já caracterizados e com a confirmação de espécie pelo mesmo pesquisador (Tabela 1). Isolados também foram coletados na região de Botucatu, a partir de frutos de mercados apresentando sintomas de antracnose ou ainda utilizando isolados pertencentes à micoteca do DPV/ FCA/ UNESP-Botucatu-SP.

Os isolados foram mantidos na micoteca para posterior análise, através do método de Castelani e em óleo mineral.

A partir de lesões típicas no material vegetativo, vários cortes foram realizados na região de transição entre tecido com sintoma e sem sintoma. Esses fragmentos passaram por desinfestação superficial em solução de álcool 70% por 15 segundos, seguido da colocação em solução de hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto. Após duas lavagens em água esterilizada, os tecidos foram transferidos para placa com meio BDA (Batata-dextrose-ágar) contendo oxitetraciclina (5 mg/L), sendo em seguida mantidas em BOD à temperatura de 30°C, até o início do crescimento micelial. Após o crescimento inicial, fragmentos do micélio foram então transferidos para placa contendo somente BDA, quando foram utilizados para a realização dos demais experimentos.

Tabela 1. Identificação dos isolados utilizados, coletados de frutas tropicais e de atemoia, a localidade da coleta e o tecido de onde foi isolado.

Isolados	Espécie	Hospedeiro	Tecido	Local	Data coleta	Nº depósito
1	<i>Colletotrichum musae</i>	Banana	Fruto	Botucatu		MDF 0022
2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Laranja	Fruto	Piracicaba		MDF 0023
3	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Goiaba	Fruto	Piracicaba		MDF 0024
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Mamão	Fruto	Piracicaba		MDF 0025
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Manga	Fruto	Piracicaba		MDF 0026
6	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	28/ago	MDF 0027
7	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	28/ago	MDF 0028
8	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Flor	Botucatu	28/ago	MDF 0029
9	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	28/ago	MDF 0030
10	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Ramo	Botucatu	31/mar	MDF 0031
11	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	28/ago	MDF 0032
12	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	28/ago	MDF 0033
13	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	28/ago	MDF 0034
14	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Fruto	Botucatu	31/mar	MDF 0035
15	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	31/mar	MDF 0036
16	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	28/ago	MDF 0037
17	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Flor	Botucatu	31/mar	MDF 0038
18	<i>Colletotrichum</i> spp.	Atemoia	Folha	Botucatu	31/mar	MDF 0039

5.2 Caracterização cultural

A caracterização cultural baseou-se no crescimento das colônias do patógeno em BOD, mantidos nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 ° C, sem fotoperíodo e em meio BDA.

Foram avaliados todos os isolados, verificando-se a velocidade de crescimento, cor e a presença ou não de microescleródios.

Para tal avaliação, foram depositadas no centro de placas, contendo meio de cultura BDA, discos de micélio de 5mm de diâmetro, retirados da área periférica de colônias dos isolados de aproximadamente 5 dias de idade.

A avaliação foi realizada com o auxílio de régua milimetrada, assim como o crescimento micelial, definido por mm/dia. A coloração das colônias foi caracterizada no sétimo dia de crescimento. O crescimento micelial foi avaliado com auxílio de régua, mensurando o mm/dia.

5.3 Caracterização morfológica

Esporos dos isolados foram obtidos das colônias em meio de cultura. Para isso, cerca de 1mL de água destilada foi colocada nas placas contendo o patógeno, e pipetados cerca de 100µl dessa suspensão que foi aplicado sobre lâmina de microscopia e analisada sob microscópio ótico equipado com câmera fotográfica. Os valores foram então lidos em micrômetros e o formato dos esporos verificados de acordo com Gunnel & Gubler, 1995. O comprimento dos esporos foi medido com auxílio de micrômetro acoplado na objetiva de microscópio ótico.

5.4 Caracterização patogênica

Frutos sadios de banana- cv. Nanica, de Goiaba, de Manga- cv. Tommy Atkins, de mamão- cv. 'Sunrise Solo', de laranja, cv. Pêra e de atemóia, em fase intermediária de maturação, foram lavados com água corrente e sabão, seguido de desinfestação em solução de álcool 70%, por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, por 2 min. Após isto, os frutos foram lavados por duas vezes em água destilada esterilizada e secos em papel toalha e, em seguida, mantidos em temperatura ambiente (Figura 1).



Figura 1. Frutos preparados para a inoculação, após desinfecção.

O inóculo, com cinco dias de incubação, constituiu-se de discos de meio de cultura (5 mm de diâmetro) contendo estruturas dos patógenos. Procederam-se as inoculações dos frutos com os isolados de *Colletotrichum* spp.; onde cada fruto foi inoculado com os isolados das demais hospedeiras. Os frutos foram previamente feridos com um perfurador flambado, e sobre a superfície foram depositados discos contendo estruturas do patógeno. Em seguida, os frutos foram colocados em câmara úmida, constituída de um saco plástico e um chumaço de algodão umedecido em água destilada estilizada, por 48 h (figura 2). A testemunha absoluta foi composta por um disco de BDA sobre o ferimento sem conter as estruturas do patógeno. As avaliações foram feitas aos sete dias após a inoculação, medindo-se o diâmetro das lesões em dois sentidos diametralmente opostos. Foi realizado o reisolamento e a comparação dos isolados. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 19 tratamentos e 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e a comparação das médias foi feita por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Figura 2. Frutos após inoculação, cobertos com plástico para criar um microclima apropriado para o estabelecimento da infecção e desenvolvimento do fungo.

5.5 Caracterização enzimática

Discos de 5 mm da colônia de cada isolado foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA, mantidas a 25°C, na ausência de luz, durante seis-oito dias, para a obtenção dos inóculos para os testes enzimáticos. A detecção das atividades enzimáticas foi realizada pelo método de difusão em ágar, onde a enzima amilase foi determinada no meio nutriente-ágar (Difco) contendo 0,3% de amido solúvel (Merck) como descrita por Coon *et al.* (1957). A atividade celulolítica foi avaliada utilizando-se meio sais minerais-ágar (Tuite, 1969) suplementado com 2 g/L de carboximetilcelulose para a enzima carboximetilcelulase, e celulose Whatman nº1 para enzima celulase (LEWIS, 1988). A atividade pectolítica foi determinada utilizando-se meio BDA suplementado com 2,5 g/L de pectina cítrica para detectar a pectinase, e suplementado com 1% com ácido poligalactorônico para detectar a atividade da pectilyase (HANKIN *et al.*, 1971). Lipases foram avaliadas utilizando-se meio BDA suplementado com Tween 80 e 0,001% de Rodamina B (SIERRA, 1957). A atividade proteolítica foi verificada em meio contendo 1% de caseína como fonte de carbono. Após 96 h de incubação, adicionou-se às placas 5,0 mL de uma solução de ácido

acético a 5% (STAMFORD, 1998), cujo precipitado torna o ágar mais opaco e acentua as zonas claras ao redor das colônias, caracterizando a hidrólise da caseína.

Para determinar a capacidade de degradação de lignina, utilizou-se meio BDA suplementado com 2% de ácido tânico, para terminação da atividade da enzima tanase, e ácido gálico a 0,2% para a enzima lacase. A atividade da urease foi avaliada utilizando-se meio BDA suplementado com 1,5 g/L de uréia e 0,15 g/L de vermelho de cresol (SEELIGER, 1956). Verificou-se a atividade da gelatinase utilizando meio Nutriente suplementado com 150 g/L de gelatina. Testou-se todos isolados também para a produção de peroxidase utilizando peróxido de hidrogênio a 3%.

Todos os testes foram conduzidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 15 mL do meio teste. No centro de cada placa foi depositado um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, retirado de colônias dos isolados e, em seguida, todas as placas foram incubadas a 25° C, na ausência de luz. Como testemunhas, foram usadas placas apenas com discos de meio de cultura sem os fungos.

Avaliou-se a produção das enzimas proteases, celulasas, amilases e lipases através da mensuração do diâmetro do halo formado em torno das colônias (BASTOS, 2005). As enzimas urease, peroxidase, pectinase, gelatinase, lacase e tanase foram avaliados por meio de símbolos que representam uma estimativa subjetiva da produção das enzimas, baseada na intensidade da coloração formada no meio ou aspecto do meio de cultura: +++ intensa; ++ moderada; + fraca; e – ausência. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

5.6 Sensibilidade a fungicida

Os isolados provenientes de atemóia foram avaliados de acordo com o crescimento ou a ausência dele em meio contendo fungicida benomil (10µg i.a/mL). Para tal, discos de micélio de 5mm foram colocados no centro de placas contendo meio de cultura BDA acrescido do fungicida. O meio foi preparado através da mistura de meio BDA recém autoclavado e resfriado até aproximadamente 45° C, ao qual foi acrescido o fungicida,

em Erlenmeyer, e posteriormente misturado vigorosamente e depositado nas placas de petri. Avaliou-se medindo o crescimento micelial no sétimo dia de incubação.

6. Resultados e Discussão

6.1.1 Caracterização cultural.

Segundo os dados contidos na Tabela 2, podemos verificar que não houve grande variação na coloração das colônias (figura 3), permitindo inferir que os isolados de atemóia podem ser de uma mesma espécie.

No fundo da placa, verificou-se coloração predominantemente cinza, com os isolados 1 e 3 apresentando coloração salmão e laranja, respectivamente. De acordo com a Tabela 1, estes isolados pertencem às espécies *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum acutatum*, respectivamente.

A presença de microescleródios não foi observada em nenhum dos isolados estudados e trata-se de outro ítem importante para a identificação, classificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* (Tozze Júnior, 2007).

No Brasil, apenas o *Colletotrichum gloeosporioides* foi identificado como causador de antracnose em anonáceas (Freire *et al.*, 1997).

Tabela 2. Características das colônias dos isolados de atemóia (micélio e fundo da placa) e presença de microescleródios.

Isolado	Coloração		Microescleródios
	Micélio	Fundo da placa	
1	Laranja	Salmão	ausente
2	Cinza	Cinza	ausente
3	Cinza escura	Laranja	ausente
4	Cinza clara	Cinza	ausente
5	Creme	Cinza	ausente
6	Cinza escura	Cinza	ausente
7	Cinza	Cinza	ausente
8	Cinza	Cinza	ausente
9	Cinza	Cinza	ausente
10	Cinza	Cinza	ausente
11	Cinza	Cinza	ausente
12	Cinza	Cinza	ausente
13	Cinza	Cinza	ausente
14	Cinza	Cinza	ausente
15	Cinza	Cinza	ausente
16	Cinza	Cinza	ausente
17	Cinza	Cinza	ausente
18	Cinza	Cinza	ausente



Figura 3. Aspecto geral das colônias de *Colletotrichum* spp. em meio BDA.

6.1.2 Velocidade de crescimento das colônias

De acordo com os dados da Tabela 3, a média geral da velocidade de crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* foi de 1,12 cm/dia. Neste parâmetro, exceção foi observada nos isolados 1 e 3, que apresentaram média de velocidade de 0,6 e 0,9 cm/dia, respectivamente. Novamente e de acordo com a Tabela 1, os isolados 1 e 3 são conhecidos como sendo das espécies *C. musae* e *C. acutatum*, respectivamente. Além disso, Vinnere (2004) descreveu que a espécie *C. acutatum* cresce a uma velocidade inferior a *C. gloeosporioides* em meio BDA.

De acordo com a figura 4, todos os isolados apresentaram maior crescimento micelial na temperatura de 25°C.

Tabela 3. Velocidade de crescimento micelial de isolados mantidos em BOD, a 25°C.

Isolado	VCM(velocidade de crescimento micelial) (cm/dia) a 25°C		
	Médio	Mínimo	Máximo
1	0,65	0,40	0,80
2	1,13	1,00	1,20
3	0,92	0,70	1,20
4	1,13	1,00	1,30
5	1,16	1,00	1,20
6	1,16	1,10	1,25
7	1,15	1,10	1,15
8	1,19	1,10	1,25
9	1,20	1,05	1,27
10	1,16	1,04	1,25
11	1,15	1,05	1,25
12	1,16	1,00	1,27
13	1,18	0,90	1,30
14	1,19	0,90	1,25
15	1,21	0,90	1,27
16	1,16	0,90	1,26
17	1,16	0,80	1,28
18	1,16	1,00	1,15

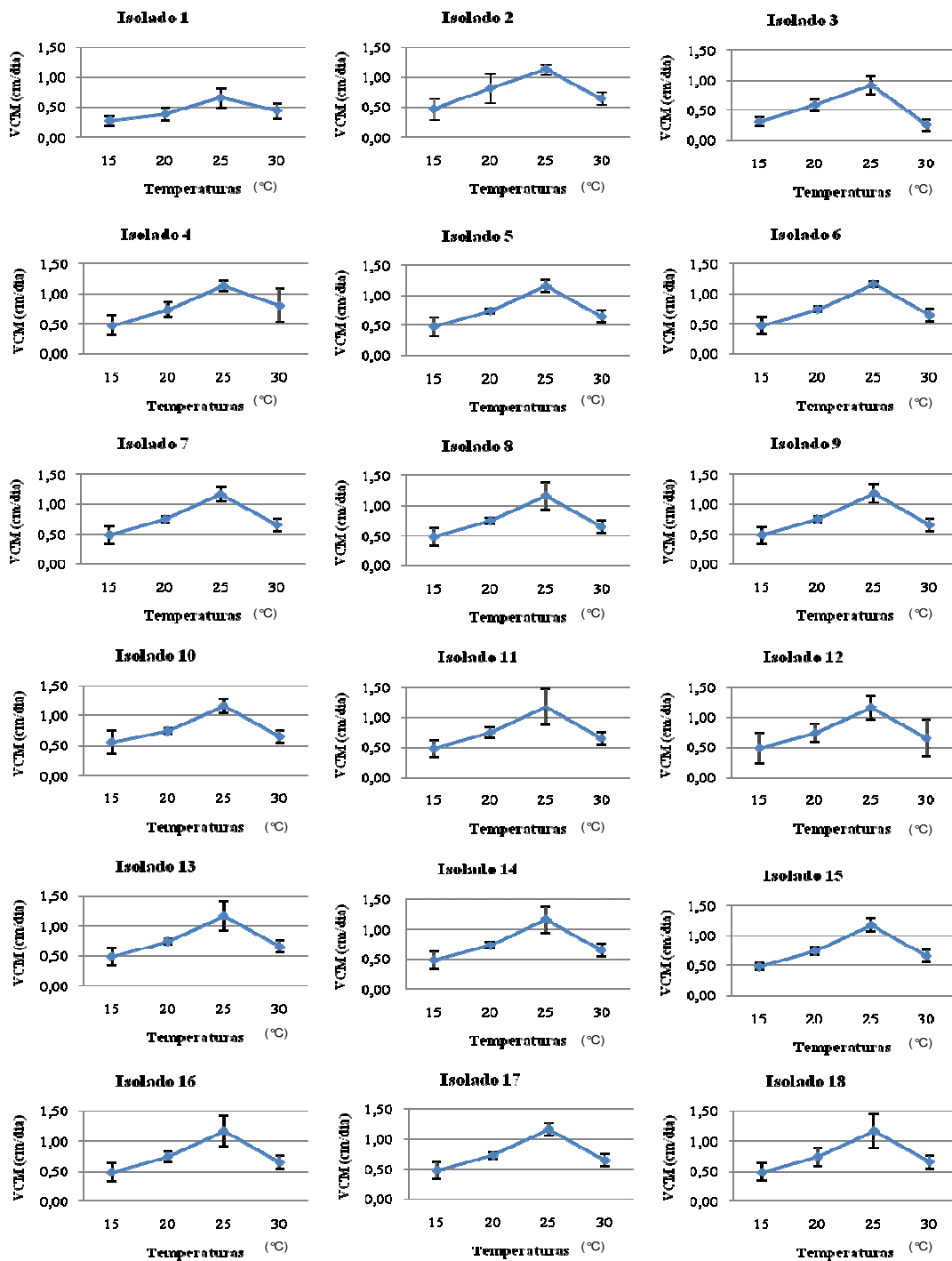


Figura 4. Polígonos de crecimiento micelial de los aislados utilizados, sometidos a diferentes temperaturas.

Tabela 4. Velocidade média de crescimento micelial dos isolados e comparação das médias pelo teste estatístico Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	Médias	Significância*
1	0,65	c
2	1,13	a
3	0,92	b
4	1,13	a
5	1,16	a
6	1,16	a
7	1,15	a
8	1,19	a
9	1,20	a
10	1,16	a
11	1,15	a
12	1,16	a
13	1,18	a
14	1,19	a
15	1,21	a
16	1,16	a
17	1,16	a
18	1,16	a

* Letras iguais indicam que, no nível de 5%, não há diferença significativa entre as respectivas médias;

* Coeficiente de variação de 4,82%.

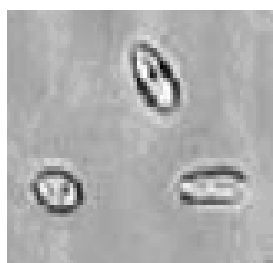
6.2 Caracterização morfológica

De acordo com os dados da Tabela 5, os isolados 2, 4, 5 a 18 apresentaram média de 67% de conídios na forma “A”, 32% na forma “B” 1% na “C”. Segundo a Figura 5, a forma “A” significa conídio cilíndrico com ápices arredondados. O isolado 1 apresentou 54% de conídios na forma “A”, 26% na forma “B” e 20% na “C”. Já o isolado 3 apresentou os percentuais de 35, 65 e 0% nas formas citadas.

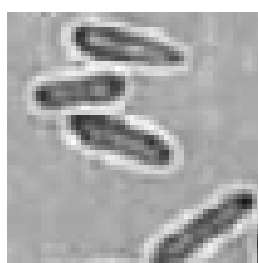
A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* apresenta conídio cilíndrico com ápices arredondados, enquanto que a espécie *C. acutatum* conídio fusiforme com ápices afilados (Deyones & Baudry, 1995). De acordo com a Tabela 1, o isolado 3 é conhecidamente *C. acutatum*.

Tabela 5. Dados sobre a morfologia dos conídios dos isolados de atemóia, com respectivo percentual na suspensão de esporos.

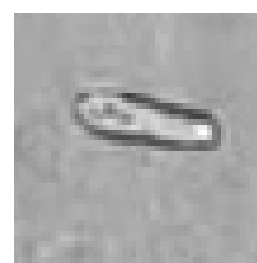
Isolado	Formato dos conídios (%)		
	Cilindrico	Fusifforme	Clavados (C)
	Ápices arredondados (A)	Ápices afilados (B)	
1	54	26	20
2	57	43	0
3	35	65	0
4	51	47	2
5	70	30	0
6	68	32	0
7	64	36	0
8	71	27	2
9	74	26	0
10	65	35	0
11	62	38	0
12	73	27	0
13	61	35	4
14	77	23	0
15	69	31	0
16	70	28	2
17	63	32	5
18	71	29	0



A



B



C

Figura 5. Formato dos conídios (a = conídio cilíndrico com ápices arredondados; b= formato fusiforme; c= conídio clavado).

6.3 Caracterização patogênica

Todos os isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de atemóia, foram patogênicos quando inoculados nos frutos de atemóia e, após reisolamento, confirmaram ser o agente causal dos sintomas de antracnose nos frutos (Tabela 6).

Pode-se verificar que, com relação ao teste de patogenicidade cruzada, os isolados 1, 2, 3, 4 e 5 produziram maiores lesões nos frutos de onde foram isolados, demonstrando certa especificidade (Tabela 6). Essa especificidade de isolados de *Colletotrichum* por determinado hospedeiro já foi observada por Peres *et al.* (2002) e Filho *et al.* (2003). Os isolados de atemóia já apresentaram especificidade por hospedeiro, o que denota fonte de inóculo preferencial para as demais culturas (Tabela 6).

O desenvolvimento de antracnose em várias culturas é influenciado pela temperatura, duração do período de molhamento, densidade do inóculo, genótipo do hospedeiro e também do próprio patógeno (Thompson e Jenkis, 1985; Tu, 1992).

Na Figura 6 pode-se observar os sintomas produzidos nos frutos testados.

Os isolados de *Colletotrichum* demonstram grande variação quanto a agressividade por e entre os hospedeiros (Tabela 6).

Um fato constatado é que os isolados 1 e 3, conhecidos como sendo *C. musae* e *C. acutatum*, causaram doença em inoculação artificial nos frutos de atemóia, no Brasil e em outras partes do mundo, temos somente relatos de *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* ocorrendo em anonáceas (Freire *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 2004; Villanueva-Arce *et al.*, 2005).

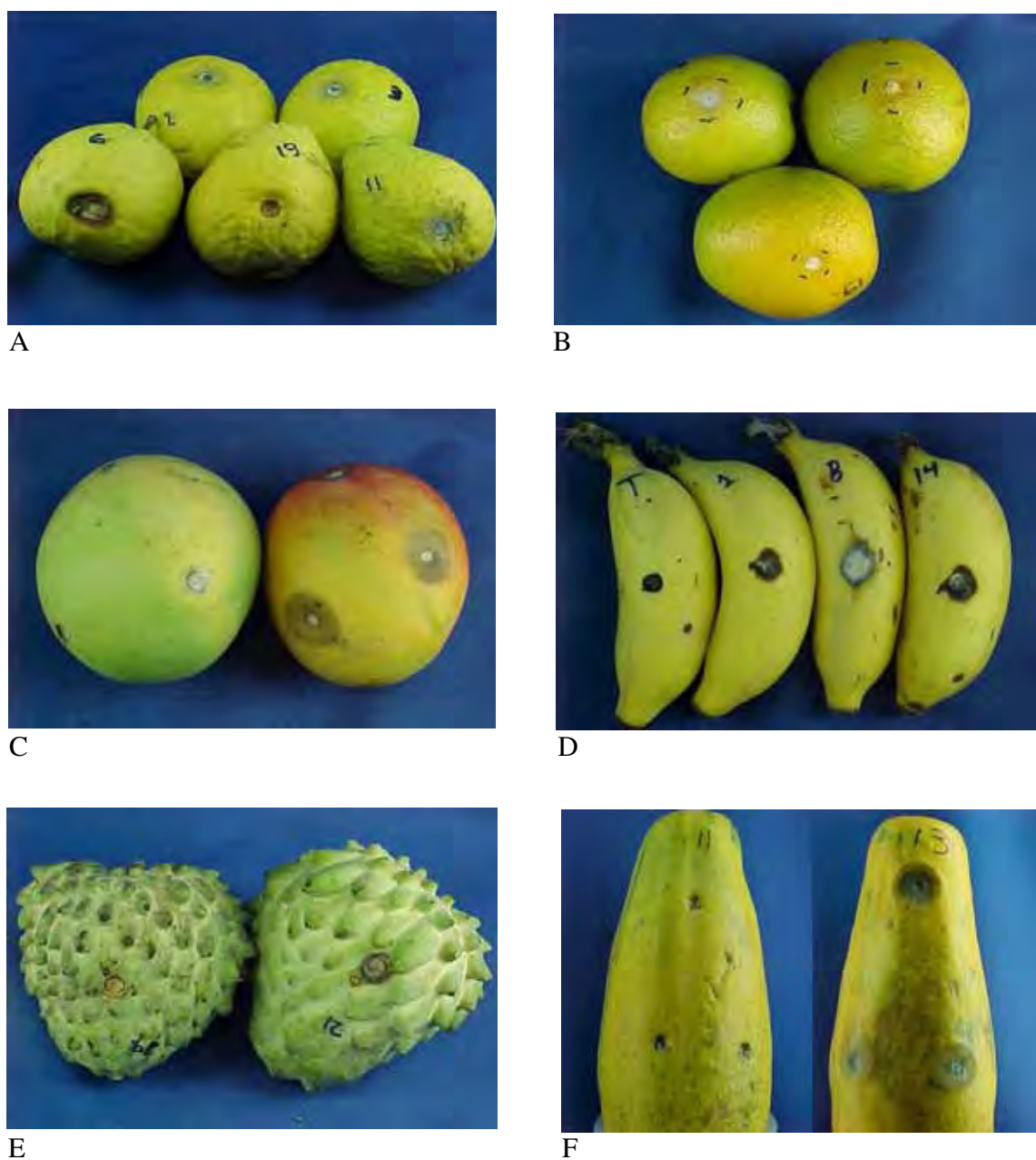


Figura 6. (A) indica goiabas inoculadas. (B) indica laranjas inoculadas com isolados de atemóia, marcação à caneta indica.o diâmetro da lesão. (C) mangas inoculadas com isolados de atemóia. A manga à direita apresenta halo necrótico bem visível, enquanto a da esquerda mostra pequena lesão. (D) indica bananas inoculadas. (E) indica atemóias inoculadas com isolado de atemóia e com meio BDA (testemunha). (F) indica mamão inoculado com testemunha e com isolado de atemóia.

Tabela 6. Valores médios da severidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em frutos de goiaba, laranja (cv. Pêra), manga (cv. Tommy Atkins), banana (cv. Nanica), atemóia e mamão (cv. 'Sunrise Solo').

Tratamento	Goiaba*	Laranja*	Manga*	Banana*	Atemóia*	Mamão
1	1,20 ab	1,83 abc	0,73 ab	2,25 c	1,20 abcd	0,80 ab
2	2,31 e	1,83 abc	1,58 def	0,98 ab	1,10 abc	1,76 defgh
3	2,78 f	1,70 abc	1,4 bcde	0,76 a	1,20 abcd	2,11 fghij
4	1,01 ab	2,05 c	0,85 abc	0,70 a	1,26 abcd	2,50 ij
5	1,66 cd	1,93 bc	4,81 g	0,75 a	1,00 a	2,20 ghij
6	1,66 cd	1,46 abc	1,23 abcd	0,78 a	0,98 a	1,31 bcde
7	1,21 ab	1,41 abc	1,18 abcd	0,85 a	1,35 bcde	1,18 abcd
8	1,16 ab	1,63 abc	1,15 abcd	1,43 b	1,11 abc	1,13 abc
9	1,35 bcd	1,83 abc	1,03 abcd	0,93 ab	0,96 a	1,56 cdef
10	1,20 ab	1,33 ab	1,53 cdef	0,81 a	1,20 abcd	1,70 cdef
11	1,68 d	1,55 abc	2,18 f	0,91 a	1,38 cde	0,85 ab
12	1,23 ab	1,43 abc	1,11 abcd	1,05 ab	1,33 bcde	1,11 abc
13	2,15 e	1,43 abc	4,25 g	0,93 ab	1,45 de	2,53 j
14	1,15 ab	1,33 ab	1,66 def	1,10 ab	1,98 f	1,76 defgh
15	1,06 ab	1,45 abc	0,75 ab	1,16 ab	1,58 e	1,91 efghi
16	1,00 a	1,30 ab	2,10 ef	0,81 a	1,38 cde	2,35 hij
17	1,33 abc	1,28 ab	0,96 abcd	1,06 ab	1,21 abcd	1,36 bcde
18	1,18 ab	1,20 a	1,36 abcd	0,93 ab	1,05 ab	1,25 bcd
19	1,00 a	1,23 a	0,68 a	0,68 a	0,98 a	0,60 a
C.V%	7,68	14,12	14,30	16,69	7,88	12,46

*Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente no teste Tukey a 5% de probabilidade.

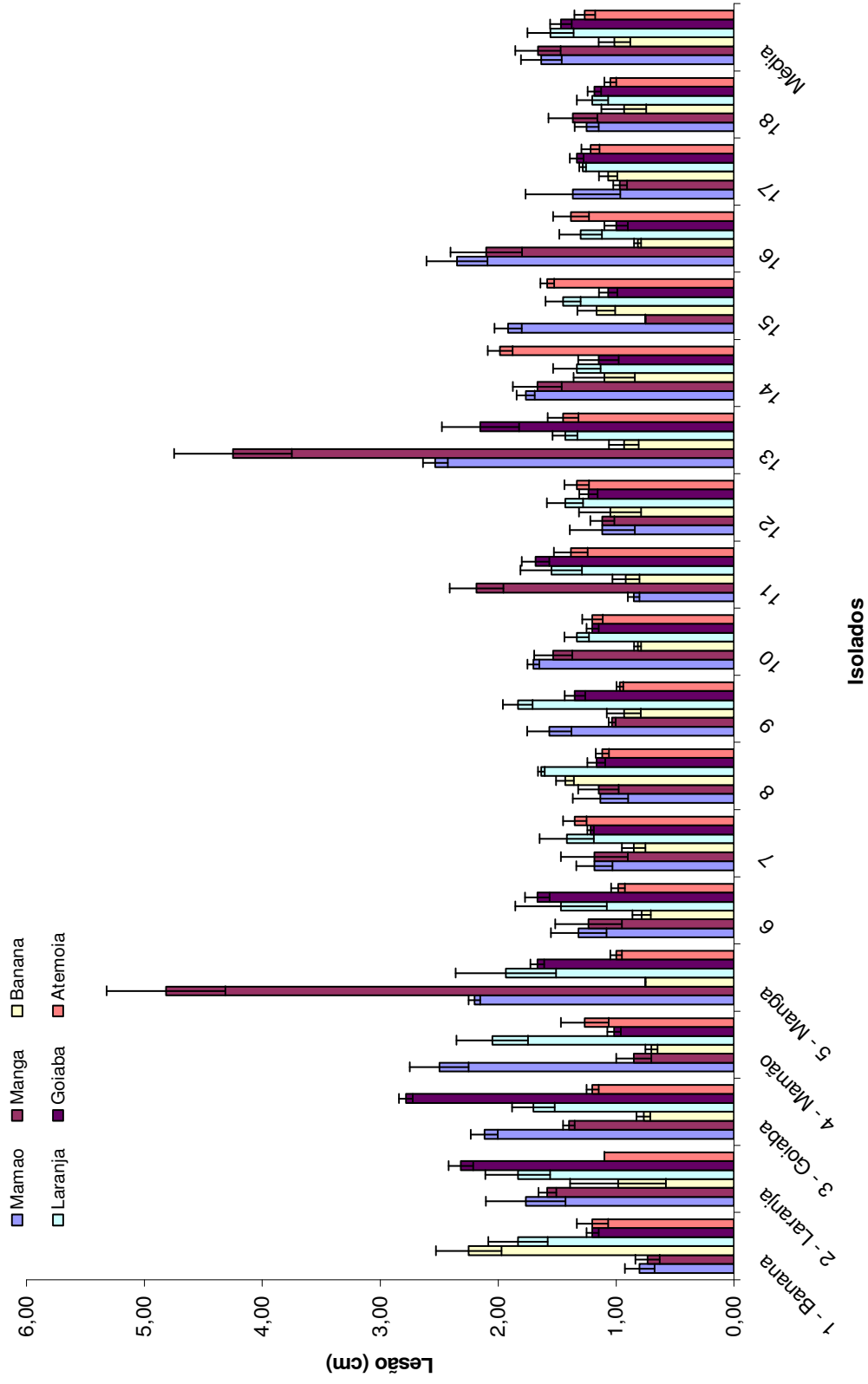


Figura 7. Teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum*.

6.4 Caracterização enzimática

O isolado 1, identificado como *C. musae* e coletado através do isolamento de uma lesão esporulada de banana cultivar Nanica, diferenciou-se dos demais por se comportar apresentando maior produção da enzima caseinase e amilase. De uma forma geral, o isolado foi o que apresentou a menor produção das demais enzimas (Figura 11).

Os isolados 2, 3, 4 e 5, de laranja, goiaba, mamão e manga, respectivamente, apresentaram comportamento semelhante. Uma diferença significativa pode ser observada nos isolados coletados de atemóia. Caracterizados como *Colletotrichum* spp., se diferenciaram por apresentar uma maior produção da enzima amilase, fato que pode ser observado pela média maior do halo formado no meio de cultura contendo amido, de acordo com a Tabela 7. Com relação às demais enzimas, não é observado nenhuma diferenciação, ficando sua média próxima às demais.

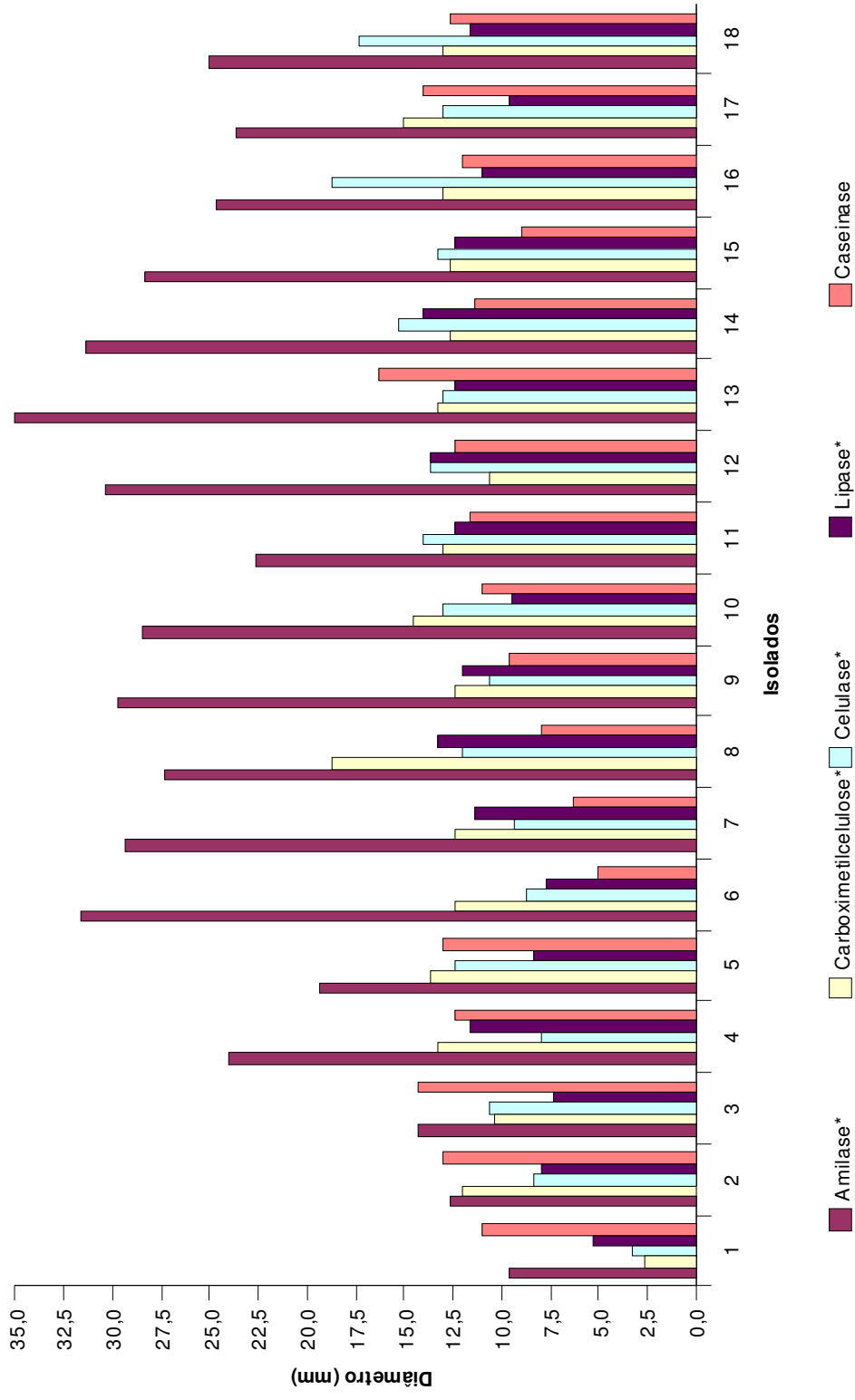


Figura 8. Diâmetro de halo das colônias de *Colletotrichum* em diferentes substratos.

De acordo com a Tabela 7 e Figura 8, o isolado 1 foi o que apresentou, em valores absolutos, a menor produção das enzimas amilase carboximetilcelulase, celulase e lipase em relação aos demais isolados. Todos os isolados produziram de maneira fraca e equânime, as enzimas gelatinase e peroxidase. O isolado 6 foi o único que não produziu a enzima pectinase. De forma geral, todos os isolados produziram as enzimas testadas, porém em quantidades variáveis.

Tabela 7. Caracterização enzimática dos isolados.

Isolado	Amilase*	Carboximetilcelulose*	Celulase*	Lipase*	Caseinase	Tânase**	Lacase**	Pectinase**	Uréase**	Gelatinase**	Peroxidase**
1	9,7	2,7	3,3	5,3	11,0	++	+	+	++	+	+
2	12,7	12,0	8,3	8,0	13,0	+	++	+	++	+	+
3	14,3	10,3	10,7	7,3	14,3	++	++	+	++	+	+
4	24,0	13,3	8,0	11,7	12,3	++	++	+	++	+	+
5	19,3	13,7	12,3	8,3	13,0	+	++	+	++	+	+
6	31,7	12,3	8,7	7,7	5,0	+	+	-	+	+	+
7	29,3	12,3	9,3	11,3	6,3	++	++	+	++	+	+
8	27,3	18,7	12,0	13,3	8,0	++	++	+	++	+	+
9	29,7	12,3	10,7	12,0	9,7	++	++	++	++	+	+
10	28,5	14,5	13,0	9,5	11,0	++	++	+	++	+	+
11	22,7	13,0	14,0	12,3	11,7	+++	++	+	++	+	+
12	30,3	10,7	13,7	13,7	12,3	++	++	+	++	+	+
13	35,0	13,3	13,0	12,3	16,3	++	++	+	++	+	+
14	31,3	12,7	15,3	14,0	11,3	++	++	+	++	+	+
15	28,3	12,7	13,3	12,3	9,0	++	++	+	++	+	+
16	24,7	13,0	18,7	11,0	12,0	++	++	+	++	+	+
17	23,7	15,0	13,0	9,7	14,0	++	++	+	++	+	+
18	25,0	13,0	17,3	11,7	12,7	++	++	+	++	+	+

* A produção de Amilase, Carboximetilcelulase, Celulase, Lipase, Caseinase, Tânase e Lacase foi avaliada pela média (três repetições) do diâmetro do halo formado em torno das colônias.

** A produção de peroxidases, pectinases, ureases e gelatinase baseou-se na intensidade da cor resultante no meio ou aspecto do meio de cultura, onde: coloração intensa +++; coloração moderada ++; coloração fraca + e ausência de coloração.

6.5 Sensibilidade a fungicida

Os isolados 1 e 3 apresentaram crescimento micelial em meio de cultura contendo o fungicida benomil. Os demais isolados não cresceram no meio + benomil.

Na literatura, *C. acutatum* é relatado como resistente ao benomil, enquanto *C. gloeosporioides* é suscetível ao fungicida (Bernstein *et al.*, 1995; Adaskaveg & Hartin, 1997; Foster, 2000; Vinnere, 2004).

Analisando-se todos os testes de caracterização realizados, menos o enzimático, conclui-se que a espécie prevalente em atemóia é *Colletotrichum gloeosporioides*. Isso pode ser corroborado pelo fato dos isolados 6 a 18, todos provenientes de atemóia, comportarem-se de maneira semelhante, nos testes citados, com os isolados 2, 4 e 5, isolados estes identificados pelo Professor Dr. Nelson Massola Júnior da ESALQ – USP, como sendo da espécie *C. gloeosporioides*. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram ainda com o relato de Freire *et al.* (1997), que descrevem a espécie *C. gloeosporioides* como sendo a única identificada como causadora de antracnose em anonáceas no Brasil.

Tabela 8. Crescimento dos isolados de atemóia em meio contendo 10 mg/L de fungicida benomil.

Isolado	Crescimento em Benomyl [10 mg/L]
1	+
2	-
3	+
4	-
5	-
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	-

7. Conclusões

- Os isolados 6 a 18, provenientes de atemóia, pertencem à espécie *Colletotrichum gloeosporioides*;
- As espécies dos isolados 1, 2, 3, 4 e 5 de *Colletotrichum* devidamente identificados foram vitais no auxílio da identificação da espécie dos isolados de *Colletotrichum* de atemóia;
- Os isolados de *Colletotrichum* de atemóia são inespecíficos com relação a hospedeiro;
- As espécies de *Colletotrichum* obtidas da ESALQ – USP apresentaram especificidade, principalmente ao hospedeiro de origem;
- Por meio de inoculação artificial, os isolados 1 e 3, conhecidamente *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum acutatum*, respectivamente, causaram doença em frutos de atemóia;
- Os isolados de *Colletotrichum* de atemóia são inespecíficos com relação a hospedeiro.

8. Referências Bibliográficas

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

AGOSTINI, J. P., TIMMER, L. W., MITCHELL, D. J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, v. 82, p. 1377-1382, 1992.

AGRIANUAL: ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: FNP, 2006, 521 f.

ALAHAKOON, P. W.; BROWN, A. E. AND SREENIVASAPRASAD, S. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 44, n. 2, p. 93-103, 1994.

ALAHAKOON, P. W., SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A. E., MILLS, P. R. Selection pathogenic on mango by passing through wounded tomato fruits. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, v. 41, p. 227-240, 1992.

ÁLVAREZ, E., OSPINA, C. A., MEJÍA, J. F., LLANO, G. A. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, v. 28, n°1, p. 1-8, 2004.

BAYLEY, J. A., JEGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CAB International, 1992, 388 f.

BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 90-92, 1999.

BERNSTEIN, B., ZEHR, E. I., DEAN, R. A., SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease*, v. 79, p. 478-482, 1995.

BROWN, A. E., SREENIVASAPRASAD, S., TIMMER, L. W. Molecular characterization of slow-growing-orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, v. 86, p. 523-527, 1996.

COON, H.J., JENNISON, M.W. & WEEK, O.B. Routine tests for the identification of bacteria. In: *Manual of Microbiological Methods* (ed. Society of American Bacteriologists). New York. McGraw-Hal, p.239-262, 1957.

DENOYES, B., BAUDRY, A. Species identification and Pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology*, v. 85, p. 53-57, 1995.

DODD, J. C., ESTRADA, A., JEGER, M. J. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in the tropics. In: BAYLEY, J. A., JEGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CAB International, p. 308-325, 1992.

EASTBURN, D.M., GUBLER, W. D. Strawberry anthracnose: detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. *Plant Disease*, v. 74, p. 161-173, 1990.

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

FREEMAN, S., SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiology Mol. Plant Pathology*, v. 49, p. 395-404, 1996.

FREIRE, F. C. O., CARDOSO, J. E. Doenças das anonáceas. *Anonáceas: Produção e Mercado*, p.196-213, 1997.

FROST, R. R. Setae formation in *Colletotrichum* spp. *Nature*, v. 201, p. 730-731, 1964.

FURTADO, E. L., BACH, E. B., KIMATI, H., MENTEN, J. O. M. & SILVEIRA, A. P. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 222-227, 1999.

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

GUNNEL, P. S., GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, v. 84, p. 157-165, 1992.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.

HAYDEN, H. L., PEGG, K. G., AITKEN, E. A. B., IRWIN, J. A. G. Genetic relationships as assessed by molecular markers and cross-infection among strains of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Aust. J. Bot.*, v. 42, p. 9-18, 1994.

HEWITT, H. G. Fungicide resistance. *Fungicides in Crop Protection*. Centre for Agriculture and Biosciences International. Wallingford, U.K., p. 155-181, 1998.

JOSÉ, A. R. S. Aspectos gerais das anonáceas no Brasil. *Anonáceas: Produção e Mercado*, p. 5-6, 1997.

JOSÉ, A. R. S., DIAS, N. O., BONFIM, M. P., REBOUÇAS, T. N. H., TAVARES, G. M., SILVA, A. C., NOVAES, Q. S. Aspectos gerais das anonáceas no nordeste brasileiro. *Encontro sobre anonáceas: geração de emprego e renda*, p. 51-74, 2004.

KAVATI, R. O. Cultivo da atemoya. *Fruticultura Tropical*, p. 39-70, 1992.

KOENRAADT, H., SOMMERVILLE, S. C., and JONES, A. L. Characteristics of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, v. 82, p 1348-1354, 1992.

KUMMUANG, N., SMITH, B. J., DIEHL, S. V., GRAVES Jr., C. H. Muscadine grape berry rot diseases in Mississippi: Disease identification and incidence. *Plant Disease*, 1996.

KURAMAE-IZIOKA, E. E., LOPES, C. R., SOUZA, N. L., MACHADO, M. A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. From citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. *Eur. J. Plant Pathology*, v. 103, p. 323-329, 1997.

LEWIS, K.J. Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler. PhD Thesis. Sheffield. University of Sheffield. 1988.

LIYANAGE, H. D., McMILLAN Jr., R. T., KISTLER, H. C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, v. 82, p. 1371-1376, 1992.

MENEZES, M., FILHO, R. M. L., OLIVEIRA, S. M. A. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 620-625, 2003.

MUNIZ, M. de F. S., SANTOS, R. de C. R. dos & BARBOSA, G. V. de S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. *Summa Phytopathologica*, v. 24, p. 177-179, 1998.

NEVES, E. M. Exportação de frutas de mesa: sinais de Mercado. *Preços Agrícolas*, v. 2, n°130, p. 27-28, 1997.

NOGUEIRA, E. A., MELLO, N. T. C., MAIA, M. L. Coeficientes técnicos e estimativa de custo da produção de atemóia no Estado de São Paulo: um estudo de caso. *Encontro sobre anonáceas: geração de emprego e renda*, p. 1-21, 2004.

NOGUEIRA, E. A., MELLO, N. T. C., MAIA, M. L. Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. *Informações Econômicas*, v. 35, p. 51-54, 2005.

PERES, N. A., TIMMER, L. W., ADASKAVEG, J. E., CORREL, J. C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, v. 89, n° 8, p. 784-796, 2005.

PERES, N. A. R., SOUZA, N. L., ZITKO, S. E., and TIMMER, L. W. Activity of Benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease, v. 86, p. 620-624, 2002.

PICCININI, E. C. Fungicidas benzimidazoles. Rev. Anu. Patol. Plantas vol. 2, p. 357-409, 1994.

SHI, Y., CORREL, J. C., GUERBER, J. C., ROM, C. R. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in southeastern United States. Plant Disease, vol. 80, n. 6, p. 692-696, 1996.

SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Laeuwenhoek 23:15-22, 1957.

SIMMONDS, J. H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensl. J. Agric. Anim. Sci., Brisbane, v. 22, p. 437-459, 1965.

SMITH, B. J., BLACK, L. L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease, v. 74, p. 69-76, 1990.

SONODA, R. M., and PELOSI, R. R. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. Proc. Fla. State Hortic. Soc., v. 101, p. 36-38, 1988.

SREENIVASAPRASAD, S., SHARADA, K., BROWN, A. E., MILLS, P. R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology, v. 45, p. 650-655, 1996.
SUTTON, B. C. The Coelomycetes. London: Commonwealth Mycological Institute, p. 696 1980.

STAMFORD, T.L.M.; ARAUJO, J.M. & STAMFORD, M.P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18(4): 382-385, 1998.

THOMPSON, D. C., and JENKINS, S. F. Effect of temperature, moisture and cucumber resistance on lesion size and increase and conidial production by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology*, v. 75, p. 828-832, 1985.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; BUENO, C. R. N. C.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* sp. de hortaliças solanáceas. *Summa Phytopathologica*, v. 30, n. 1, p. 73, 2004.

TU, J. C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean: Population dynamics of the pathogen and breeding for resistance in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger, p. 203-224, 1992.

TUITE, J. *Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria*. Minneapolis. Burgess Publishing Company. 1969.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. *Faculty of Science and Technology*, 2004, 72p.

VILLANUEVA-ARCE, R.; HERNÁNDEZ-ANGUIANO, A. M., YÁÑEZ-MORALES, M.; TÉLIZ-ORTÍZ, D.; MORA-AGUILERA, A.; CÁRDENAS-SORIANO, E. e CASTAÑEDA-VILDÓZOLA, A. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia*, v. 39, n. 1, p. 93-106, 2005.