

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM* spp. PROVENIENTES
DE DIFERENTES FRUTAS TROPICAIS**

Fernanda Dias Pereira
Engenheira Agrônoma

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM* spp. PROVENIENTES
DE DIFERENTES FRUTAS TROPICAIS**

Fernanda Dias Pereira

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Co-orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2016

P436c Pereira, Fernanda Dias
Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de
Colletotrichum spp. provenientes de diferentes frutas tropicais /
Fernanda Dias Pereira. – – Jaboticabal, 2016
xi, 119 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Antonio de Goes
Banca examinadora: Margarete Camargo, Viviani Vieira Marques,
Ronai Ferreira Ramos, Luciana Rossini Pinto
Bibliografia

1. *Colletotrichum* spp. 2. *Mangifera indica*. 3. *Musa* spp. 4. *Persea
americana*. 5. *Psidium guajava*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:634.1

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FERNANDA DIAS PEREIRA – Nascida em Jaboticabal, SP, no dia oito de maio de 1985. Filha de José Roberto Dias Pereira e Tania Regina Pagliuso Dias Pereira. Iniciou o curso de Engenharia Agrônômica em 2005, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), que foi concluído em dezembro de 2009. Foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Em março de 2010, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal. Recebeu o título de Mestre em fevereiro de 2012. Em março de 2012 ingressou no curso de Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é,
senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

Aos meus pais, *José Roberto* e *Tania Regina*, que acompanharam meu crescimento e trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus, e aos meus irmãos, *Roberta* e *Júnior*, pela constante torcida pelo meu sucesso.

A minha avó, *Lindaura Gonçalves Pagliuso* (*in memoriam*), que iniciou esta jornada comigo, mas infelizmente não pode estar presente neste momento tão feliz da minha vida.

“Vó, você permanecerá eternamente em nossas lembranças e, principalmente, em nossos corações. Que Deus a tenha na sua infinita glória! ”

Ofereço

Ao meu amado filho, *Henrique*, que me faz feliz simplesmente por existir, e ao meu esposo, *Diego*, que tanto amo, por todo carinho, dedicação e paciência ao longo desses quatro anos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tornar este sonho realidade.

Ao Prof. Dr. Antonio de Goes por incentivar-me desde a época da graduação, acreditando no meu potencial. Obrigada pela paciência, conselhos acadêmicos, pessoais e profissionais.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela co-orientação, amizade, ensinamentos e disponibilidade.

À professora Dra. Rita de Cássia Panizzi pelo aprendizado, dedicação e exemplo de profissional e ser humano.

À professora Dra. Margarete Camargo pelos conselhos, esclarecimentos e amizade.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudo e pelo incentivo à pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

À FCAV/UNESP (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela oportunidade.

Às técnicas de Laboratório Rosângela, Lúcia e Eliane por toda ajuda neste trabalho, pela convivência, aprendizado e carinho durante esta etapa da minha vida.

Aos técnicos, Wanderley e Luiz, pela ajuda e amizade durante a execução deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia: Olavo, Guilherme, Matheus, Larissa, Marcos, Ivan, Ana Dulce e Edwin, e em especial Laís, João, Amanda, Juliana, Marina e Eduardo, pelos felizes anos de convivência, amizade, companheirismo e infinita ajuda. Obrigada por estarem comigo nesta caminhada!

Às amigas do Laboratório de Biologia, Isis e Camila, pela amizade, risadas e o “cafezinho” especial de todas as tardes.

À minha querida amiga, Ana Rita, por toda ajuda, dedicação e companheirismo durante esses dez anos convivência. Minha amiga de todos os momentos!

Aos meus pais, minha eterna gratidão pelos valores que me foram passados, pelo carinho, dedicação e amor incondicional em todas as etapas da minha vida. E, sem dúvida nenhuma, a participação de vocês foi decisiva em cada etapa dessa caminhada! “Amo muito vocês!”

Aos meus irmãos, Junior e Roberta, por me proporcionarem dias de felicidade verdadeira, pura e sincera. Por me ensinarem que o verdadeiro prazer da vida é ter pessoas ao nosso redor para fazer “simplesmente nada”, e que “fazer nada” com quem se ama, admira e respeita, é um dos melhores programas que se pode ter. “Tata e Jú, não importa onde estejamos, o importante é que estejamos sempre juntos!”

Aos meus amores, Henrique e Miguel, que surgiram durante essa caminhada, e transformaram a minha vida. Amo vocês!

Ao meu esposo, Diego, por fazer parte da minha vida. Te amo!

Ao meu sogro, Cícero, minha sogra, Célia, e cunhado, Igor, por todo apoio e carinho.

À minha querida tia Regina, que esteve sempre presente em minha vida, apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

A todos os meus familiares, em especial Andréa, Adriana, Eliana, Estela, Vivian, José Marcelo, João Pedro, Matheus, Lorena, Grazielle, Marcelo, Fernanda, Gabriel, José Carlos e Jeová, que de perto ou de longe contribuíram de alguma forma para concretização de mais este sonho.

A todos aqueles que de uma maneira ou outra, prestaram o seu apoio e incentivo para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	xi
CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1.INTRODUÇÃO.....	1
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	2
1.2.1. Aspectos gerais da antracnose.....	2
1.2.2. O gênero <i>Colletotrichum</i>	5
1.2.3. Análise filogenética.....	8
1.2.3.1. Máxima Parcimônia.....	9
1.2.3.2. Máxima verossimilhança.....	9
1.2.3.3. Inferência Bayesiana.....	10
1.2.3.4. Análise de Bootstrap.....	11
REFERÊNCIAS.....	12
CAPITULO 2 - Caracterização morfocultural e molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de frutos de abacateiros com sintomas de antracnose.....	18
2.1. INTRODUÇÃO.....	19
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados <i>Colletotrichum</i> spp.	21
2.2.2. Caracterização morfocultural.....	23
2.2.3. Teste de patogenicidade cruzada.....	24
2.2.4. Análise dos dados morfocultural e patogenicidade cruzada	24
2.2.5. Caracterização molecular	25
2.2.5.1 Extração de DNA.....	25
2.2.5.2. Amplificação e sequenciamento das regiões ITS, actina parcial, glutamina sintase parcial, calmodulina parcial, β -tubulina parcial e gliceraldeído3-fosfato desidrogenase parcial.....	27
2.2.5.3. Análise Filogenética.....	29
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
2.3.1. Caracterização morfocultural.....	30
2.3.2. Patogenicidade cruzada.....	32

2.3.3. Análise de agrupamento das características morfológicas e teste de patogenicidade.....	34
2.3.4. Caracterização molecular.....	37
2.4. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 3 - Caracterização morfológica e molecular de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de bananas ‘prata’ e ‘nanica’ com sintomas de antracnose.....	48
3.1. INTRODUÇÃO.....	49
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados <i>Colletotrichum</i> spp.	51
3.2.2. Caracterização morfológica.....	53
3.2.3. Teste de patogenicidade cruzada.....	53
3.2.4. Análise dos dados morfológica e patogenicidade cruzada	53
3.2.5. Caracterização molecular	53
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.3.1. Caracterização morfológica.....	54
3.3.2. Patogenicidade cruzada.....	57
3.3.3. Análise de agrupamento das características morfológicas e teste de patogenicidade.....	58
3.3.4. Caracterização molecular.....	61
3.4. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO 4 – Caracterização morfológica e molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de frutos de goiabeira com sintomas de antracnose	70
4.1. INTRODUÇÃO.....	71
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	73
4.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados <i>Colletotrichum</i> spp.....	73
4.2.2. Caracterização morfológica.....	75
4.2.3. Teste de patogenicidade cruzada.....	75
4.2.4. Análise dos dados morfológica e patogenicidade cruzada	75
4.2.5. Caracterização molecular	75

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.3.1. Caracterização morfocultural.....	76
4.3.2. Patogenicidade cruzada.....	78
4.3.3. Análise de agrupamento das características morfoculturais e teste de patogenicidade.....	80
4.3.4. Caracterização molecular.....	83
4.4. CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
CAPÍTULO 5 – Caracterização morfocultural e molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. provenientes de frutos de mangueira com sintomas de antracnose.....	93
5.1. INTRODUÇÃO.....	94
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	97
5.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados <i>Colletotrichum</i> spp.	97
5.2.2. Caracterização morfocultural.....	99
5.2.3. Teste de patogenicidade cruzada.....	99
5.2.4. Análise dos dados morfocultural e patogenicidade cruzada	99
5.2.5. Caracterização molecular	99
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
5.3.1. Caracterização morfocultural.....	100
5.3.2. Patogenicidade cruzada.....	103
5.3.3. Análise de agrupamento das características morfoculturais e teste de patogenicidade.....	104
5.3.4. Caracterização molecular.....	107
5.4. CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	112
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	118

CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM* spp. PROVENIENTES DE DIFERENTES FRUTAS TROPICAIS

RESUMO – A produção média de fruta por ano no mundo é aproximadamente de 800 milhões de toneladas. O Brasil é o terceiro colocado no ranking das principais nações produtoras, estando atrás apenas da China e da Índia, respectivamente. Desta forma, verifica-se que o Brasil possui um grande potencial a ser explorado no contexto das exportações. Para isso, no entanto, há necessidade de investimentos visando minimizar os danos pré e pós-colheita, que representam um fator limitante, tanto na produção, como nas exportações. Entre os danos pós-colheita incluem-se os de natureza fúngica, com destaque ao complexo antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*. O presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas a frutos de abacate, banana, goiaba e manga, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas. Duzentos isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de abacateiro, bananeira, goiabeira e mangueiras com sintomas de antracnose foram submetidos a análises morfofocultural, molecular e teste de patogenicidade cruzada. Embora mediante análises morfofoculturais tenham identificado diversidade entre os isolados de *Colletotrichum* avaliados, essas foram insuficientes para distinguir espécies do gênero. Os isolados de *Colletotrichum* spp. encontrados em lesões de antracnose em frutos de abacate, banana, goiaba e manga não apresentaram especificidade fisiológica. *Colletotrichum musae* e *C. siamense* estão associadas aos sintomas de antracnose em abacate no Brasil. O agente causal da antracnose em banana não é constituído por um único grupo monofilético, *C. musae*, contando-se com espécies adicionais de patógenos. Além de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, *C. siamense* e *C. musae* são também patógenos responsáveis por sintomas de antracnose em frutos de goiaba. A antracnose em frutas de mangueira, no estado de São Paulo, está associada às espécies *C. asianum* e *C. dianesii*.

Palavras-chave: *Colletotrichum* spp., *Mangifera indica*, *Musa* spp., *Persea americana*, *Psidium guajava*

MORPHOCULTURAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *COLLETOTRICHUM* spp. ISOLATES FROM OF VARIOUS TROPICAL FRUITS

ABSTRACT – The average production of fruit per year worldwide is about 800 million tons. The Brazil is third in ranking of the major producing nations. It is behind only to China and India, respectively. It ascertain that Brazil has great potential to be explored in the context of exports. Among the post-harvest damage includes up the fungal nature, highlighting the complex anthracnose, caused by fungi of the genus *Colletotrichum* and present in all the producing countries of fruit. Among the post-harvest damage includes up the fungal nature, highlighting the complex anthracnose, caused by fungi of the genus *Colletotrichum* and present in all the producing countries of fruit. This study aimed to identify the taxonomic species of *Colletotrichum* associated with avocado fruit, banana, guava and mango, as well as to establish phylogenetic relationships among the species identified. Two hundred isolates of *Colletotrichum* spp. fruit avocado, banana, guava and mango trees, underwent Morphocultural analysis, molecular and pathogenicity. According to the results, cultural and morphological characterization still enabling the detection of phenotypic diversity among isolates, do not provide reliable results for identification of species of *Colletotrichum* evaluated. The *Colletotrichum* spp. found in avocado fruit, banana, guava and mango showed no physiological specificity. *C. musae* and *C. siamense* are associated with anthracnose symptoms on avocado in Brazil. The causal agent of anthracnose in banana is not composed of a single monophyletic group of *C. musae*, suggesting the existence of more than one species as a pathogen of this crop. In addition to *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, *C. siamanese* and *C. musae* are also pathogen responsible for anthracnose symptoms in fruits of guava. The anthracnose in hose fruits in the state of São Paulo, is associated with the species *C. asianum* and *C. dianesii*.

Keywords: *Colletotrichum* spp., *Mangifera indica*, *Musa* spp., *Persea americana*, *Psidium guajava*

CAPITULO 1 – Considerações gerais

1.1. INTRODUÇÃO

A produção mundial média de fruto por ano é aproximadamente de 800 milhões de toneladas. O Brasil é o terceiro colocado no ranking das principais nações produtoras, estando atrás apenas da China, em primeiro lugar, e da Índia, (ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2015). Para o Brasil, o valor da safra anual dos principais frutos, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi de R\$ 23 bilhões em 2013. Em 2014, nos negócios com o exterior, o setor frutícola obteve US\$ 3,2 bilhões, o que representa 3,3% da balança comercial do agronegócio (ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2015).

O Brasil possui um grande potencial a ser explorado no contexto das exportações. Para isso, no entanto, há necessidade de investimentos visando minimizar os danos pré e pós-colheita, que representam um fator limitante, tanto na produção, como nas exportações. Entre os danos pós-colheita incluem-se os de natureza fúngica, com destaque ao complexo antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, e presente em todos os países produtores de frutas (PEGG et al., 2002; AVILA-QUEZADA et al, 2007).

A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro pode resultar em dificuldades de controle visto as diferenças de comportamento dos mesmos, especialmente quanto às necessidades ambientais mínimas capazes de criar condições favoráveis ao desenvolvimento das infecções e consequente expressão de sintomas. Como exemplo, para o caso de pimentão, o complexo antracnose resulta de infecções originárias de *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides*, as quais apresentam sensibilidade diferenciada aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (TOZZE JÚNIOR, 2007).

Diferenciação entre espécies de *Colletotrichum* baseadas no hospedeiro de origem, ou na sua gama de hospedeiros, não é 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 espécie, hospedeiro envolvido e expressão dos

sintomas mostra-se insuficiente para a definição taxonômica do agente causal, e, por conseguinte a etiologia geral da doença. Devido tal aspecto, investigadores buscam por meio de ferramentas de pesquisa, caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum*, visando uma melhor compreensão dos patossistemas, com consequente melhorias na definição de estratégias de controle (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR, 2007).

Estudos envolvendo a análise de sequências de duas ou mais regiões do DNA são necessárias para identificar as espécies de *Colletotrichum* associadas a diferentes tipos de sintomas e hospedeiros, independente da interação patógeno-hospedeiro e a variabilidade intra e interespecífica das espécies associadas.

O presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente os isolados de *Colletotrichum* associados aos frutos de abacateiro, bananeira, goiabeira e mangueira, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Aspectos gerais da antracnose

O agente causal da antracnose corresponde ao fungo filamentoso do gênero *Colletotrichum*, sendo considerado um dos principais fitopatógenos em todo mundo. Fungos desse gênero causam significativas perdas econômicas em culturas de regiões temperadas, subtropicais e tropicais no mundo. Em frutíferas tropicais é considerada a mais importante doença de pós-colheita, causando prejuízos que variam em função do grau de suscetibilidade da planta hospedeira e das condições ambientais, sendo temperaturas amenas e alta umidade, os fatores mais favoráveis ao patógeno. Cereais, legumes, plantas ornamentais e frutos podem ser seriamente afetados pelo patógeno. As maiores perdas por *Colletotrichum* se dão nos frutos, em pré e em pós-colheita (JUNQUEIRA et al., 2001; JUNQUEIRA et al., 2002; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005, SERRA et al., 2011).

Fungos do gênero *Colletotrichum* sobrevivem no próprio hospedeiro, e também em restos culturais. Como os propágulos desse fungo são disseminados por respingos de água, a ação do patógeno é favorecida por alta umidade,

principalmente chuvas abundantes. Temperatura média próxima de 23 a 27°C favorece a produção dos esporos. Chuvas menos intensas, ou a existência de um contínuo filme de água, favorecem o progresso da doença numa mesma planta já infectada, enquanto que gotas de água acompanhadas de ventos tendem a transportar o fungo para outras plantas. Em algumas situações, temperaturas mais baixas podem contribuir para a permanência do filme de água por um período mais longo, o que, na maioria das vezes, contribui para maiores níveis de incidência e severidade dos sintomas.

O ciclo de infecção é constituído desde o primeiro contato entre o patógeno e o hospedeiro, até a morte dos tecidos (Figura 01). A antracnose é uma doença policíclica, ou seja, que se caracteriza por repetidos ciclos de infecções durante o cultivo. As fases que compõem cada ciclo da antracnose geralmente compreendem: deposição do conídio na superfície da planta, adesão do conídio, germinação do conídio, alongação do tubo germinativo, formação do apressório, desenvolvimento do peg de penetração, penetração nas células epidérmicas, crescimento do patógeno, colonização do tecido vegetal e produção de acérvulos, que dão origem aos conídios (JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999; PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN, 2000; PEGG et al., 2002; MORAES, 2009).

Em geral, os sintomas da doença são caracterizados por manchas necróticas, queima e queda de flores, podridão e queda de frutos, cancro e secamento de ramos, tombamento de plantas jovens, etc. As manchas são necróticas, de coloração escura, com bordos definidos e formato irregular nas folhas. Nos ramos, as manchas são escuras, às vezes deprimidas, podendo causar seca dos ramos e dos ponteiros. Nas flores ocorre secamento ou a sua abscisão. Frutos jovens infectados caem prematuramente. Os sintomas nos frutos variam de acordo com a espécie, mas, de maneira geral, iniciam-se por pequenas pontuações de coloração marrom a preta, com formato circular, onde frequentemente são observados círculos concêntricos, com massas alaranjadas que contêm os esporos do fungo. As lesões evoluem e atingem parte do fruto ou necrosando-o completamente. As necroses ultrapassam a casca e alcançam a polpa do fruto. Uma vez dentro do fruto, o fungo causa um escurecimento da polpa. É muito comum a ocorrência de frutos com

podridão no pedúnculo, a qual tem início nas infecções ocorridas nas flores ou em pós-colheita, no ponto de cicatrização.

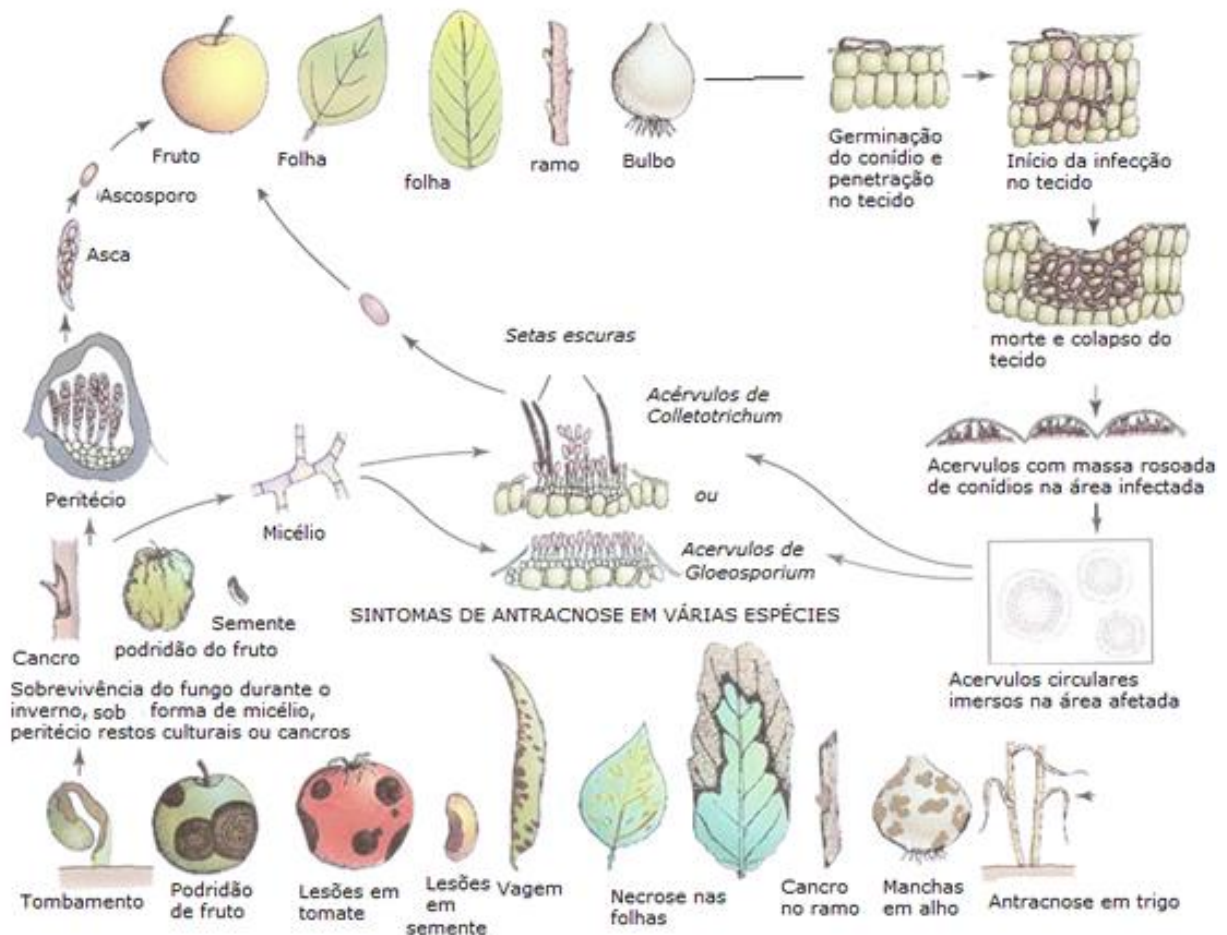


Figura 1 - Ciclo geral das doenças causadas por *Colletotrichum* spp, em diversos hospedeiros. Adaptado de Agrios (2005).

Sutton (1992) menciona à habilidade de *Colletotrichum* em causar infecção latente ou quiescente. O micélio pode permanecer viável por longo período de tempo em frutos assintomáticos, em sementes infectadas, e em restos culturais, a partir do qual pode iniciar um processo infeccioso quando das condições de ambiente mostrarem-se favoráveis para o seu desenvolvimento.

A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro pode dificultar o controle da antracnose. Fato dessa natureza já foi verificado para o caso do pimentão, no Brasil, já que as espécies presentes, *C.*

acutatum, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides*, apresentam sensibilidade diferenciada aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (TOZZE JÚNIOR, 2007).

Outro fator que pode dificultar o controle da antracnose redonda da ausência de especificidade ao hospedeiro, de forma que muitas espécies de plantas, incluindo várias frutíferas tropicais, podem atuar como fontes de inóculo (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; PERES et al. 2002). Este risco é ainda maior no caso da associação de culturas, sistema em que há utilização simultânea do solo com duas ou mais culturas, como já praticado para o abacateiro, que pode ser associado a maracujazeiros e outras frutíferas (KOLLER, 2002).

A falta de especificidade patogênica em fungos do gênero *Colletotrichum* foi demonstrada em vários trabalhos por meio de inoculações artificiais (ALAHAKOON; BROWN; SREENIVASAPRASAD, 1994; BERNSTEIN et al., 1995; PERES et al., 2002, SANDERS; KORSTEN, 2003b). Porém, existe a necessidade de estudos para confirmar quais espécies de plantas efetivamente são hospedeiras dos fungos causadores da antracnose em frutíferas tropicais, pois alguns trabalhos indicam a existência de especialização patogênica dentro de algumas espécies de *Colletotrichum*. Em Israel, por exemplo, embora o cultivo de abacateiros seja realizado próximo às culturas de amendoeiras e morangueiros, em regiões com a presença de espécies de *Colletotrichum* patogênicas aos três hospedeiros, a ocorrência natural de infecção cruzada não tem sido observada (FREEMAN; KATAN, 1997; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

Diante do exposto, torna-se imprescindível conhecer os aspectos relacionados às espécies existentes, variabilidade da população do patógeno e o nível de especificidade do patógeno ao hospedeiro. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento ou recomendação de medidas adequadas de manejo da doença, seja ela baseada em métodos culturais, genéticos ou químicos.

1.2.2. O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum*, descrito por Corda em 1837, compreende várias espécies fitopatogênicas, responsáveis pela doença denominada antracnose. As

espécies deste gênero caracterizam-se por apresentar conídios hialinos, curvos ou fusiformes, produzidos em um acérvulo setoso.

O número de espécies desde o trabalho de Arx aumentou lentamente, à medida que os estudos sobre morfologia, características culturais e patogenicidade foram aprofundados (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000). Na revisão do gênero, realizada por Sutton (1980), 22 espécies foram propostas, passando para 39 espécies na atualização realizada pelo mesmo autor, em 1992.

Colletotrichum apresenta colônia de coloração muito variada, com presença de escleródios em algumas espécies (SUTTON, 1992). As células conidiogênicas do gênero geralmente são agregadas em conidiomatas (acérvulos), mas também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio (MENEZES, 2002).

Os acérvulos podem variar muito de forma e tamanho dentro de uma mesma espécie, e frequentemente sobre uma mesma planta suscetível. São rasos, com formato de crosta, lentilha ou pústula, e alcançam um diâmetro de 40 µm a 1 mm, instalam-se na epiderme do tecido do hospedeiro, e menos frequentemente, sob a epiderme. No material vegetal, observa-se com frequência a presença de setas.

A formação de setas no acérvulo é variável e controlada por fatores ambientais. Portanto, a sua presença ou ausência não deve ser utilizada como um caráter de valor taxonômico para separação de taxa. As setas e células conidiogênicas parecem ser homólogas e, em determinadas condições do ambiente, as setas podem produzir conídios na extremidade (MENEZES, 2002).

As espécies mais comumente associadas à antracnose em frutíferas são *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, ambas amplamente disseminadas em todo o mundo, e possuem uma extensa gama de hospedeiros. O fungo *C. gloeosporioides* já foi relatado em mais de 470 gêneros de hospedeiros (SUTTON, 1980; DODD; ESTRADA; JEGGER, 1992; CANNON; BUDDIE; BRIDGE, 2008). Por sua vez, *C. acutatum* foi relatado em mais de 34 gêneros de plantas, de 22 famílias (WALKER; NIKANDROW; MILLAR, 1991). Estas duas espécies, como Sutton (1992) descreve, apresentam características morfológicas e culturais distintas, que têm sido útil para a identificação das mesmas.

Ao longo dos anos, as dificuldades apontadas na identificação de espécies de *Colletotrichum*, baseadas somente em características morfoculturais, abriram espaço

para que técnicas mais sensíveis, como as moleculares, pudessem amparar os métodos clássicos de taxonomia, gerando uma nova abordagem para este gênero.

Peres et al., (2002) analisaram a variabilidade patogênica, características morfológicas, culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum* spp. que infectam frutos, causando podridão em pós-colheita. Isolados de morango e goiaba, em meio de cultura apresentaram crescimento lento, colônia alaranjada e alta frequência de conídios do tipo fusiforme, enquanto que isolados de abacate, mamão, manga e maracujá apresentaram crescimento mais rápido, colônias cinza e alta frequência de conídios obclavados. Essas constatações associadas às análises moleculares permitiram a detecção de duas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de frutos em pós-colheita. Os isolados de morango e goiaba foram identificados como *C. acutatum*, enquanto que os demais foram identificados como *C. gloeosporioides*. O isolado de goiaba, que foi identificado como *C. acutatum*, nunca havia sido relatado causando sintomas de antracnose em frutos de espedeiro, constituindo-se na primeira constatação no Brasil.

Hyde et al., (2009) forneceram uma visão geral de 66 espécies de *Colletotrichum* que estão em uso corrente, descrevendo-as com base na morfologia, complementado por uma abordagem filogenética multilocus.

Em 2012, Cannon et al. relataram mais 41 espécies introduzidas no gênero *Colletotrichum*, elevando o número para mais de 100 espécies. Neste mesmo ano, Weir et al. descreveram 22 espécies dentro do 'Complexo *C. gloeosporioides*': *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, and *C. xanthorrhoeae*, *C. aenigma*, *C. aeschynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. clidemiae*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. salsolae*, e *C. ti*. Ainda em 2012, esse autor caracterizou as espécies do 'Complexo *C. acutatum*' e 'Complexo *C. boninense*'.

Lima et al., (2013) em um estudo filogenético realizado com isolados obtidos de pomares do Nordeste brasileiro relataram a existência de quatro espécies previamente descritas, *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. karstii*, e uma nova espécie, *C. dianesii*, associadas a antracnose em frutos de mangueira. Tozze Junior

(2015) relatou, em seu trabalho, que a espécie *C. boninense* está associada a sintomas de antracnose do maracujá, no Estado de São Paulo.

Em vista aos avanços nos estudos moleculares associados aos métodos baseados em critérios fenotípicos, novas espécies de *Colletotrichum* poderão ser descritas.

1.2.3. Análise filogenética

A filogenia permite a identificação e entendimento das relações entre as espécies que resultam da evolução. Sob a premissa que as espécies evoluem de um ancestral comum, as espécies mais próximas têm mais características em comum do que as mais distantes. A sistemática filogenética é utilizada para identificar características similares e definir a relação histórica ou evolucionária mediante essas características, incluindo genes ou fragmentos de DNA. Com base nessas relações, árvores filogenéticas são desenvolvidas mostrando as relações evolucionárias ou agrupamentos de organismos (BUSO, 2005).

Os métodos usados para determinar as diferenças entre as unidades de estudo dependem do número e tipo de características a serem comparadas. Características podem incluir diferenças morfológicas, sequências de DNA, genes ou seus produtos (proteínas).

Existem dois tipos de análises utilizadas para o desenvolvimento de árvores filogenéticas. Os métodos fenéticos utilizam medidas de distância, que consolidam estatisticamente as diferenças entre os caracteres em um número. Uma matriz de distância entre os possíveis pares do grupo de estudo é criada, e árvores são desenvolvidas agrupando aqueles com menor diferença num fenograma (BUSO, 2005).

Os métodos cladísticos calculam árvores para cada caráter e então indicam a melhor árvore através da determinação daquela que requer menor número de mudanças (parcimônia), ou aquela mais provável estatisticamente (máxima verossimilhança). A idéia básica por trás da cladística é que membros do mesmo grupo compartilham uma história evolucionária comum, e são proximamente relacionados, mais com membros do mesmo grupo do que com outros organismos.

Estes grupos são reconhecidos por compartilharem características únicas que não estão presentes num ancestral distante (BUSO, 2005).

1.2.3.1. Máxima Parcimônia

O método de máxima parcimônia é relativamente simples em sua concepção. Seu princípio envolve a identificação de uma topologia que requer o menor número de mudanças evolutivas para explicar as diferenças observadas entre os táxons estudados. Esse método utiliza apenas os sítios variáveis informativos em suas análises, pois os sítios invariáveis não acrescentam nenhuma mudança na árvore, enquanto os sítios variáveis não informativos acrescentam o mesmo número de mudanças em todas as possíveis árvores (GRAUR; LI, 2000; NEI; KUMAR, 2000; MIYAKI et al., 2001).

A vantagem do método de máxima parcimônia em relação aos outros é o seu conceito simples e, em geral, computacionalmente mais rápido que os demais. No entanto, deve-se ter cuidado com homoplasias, substituições múltiplas e desvio de composição de bases, que não são corrigidos por esse método (MIYAKI et al. 2001).

Há diferentes algoritmos para análise filogenética. No caso da máxima parcimônia, dois deles são mais utilizados: a busca exaustiva (se o número de táxons for pequeno, até 10) ou a busca heurística (se houver um grande número de táxons). A busca exaustiva analisa todas as possíveis árvores bifurcadas para um grupo de táxons. A busca heurística une inicialmente todos os táxons em um único nó interno, formando uma árvore totalmente politômica, e em seguida avalia todas as possíveis árvores (GRAUR; LI, 2000; NEI; KUMAR, 2000).

1.2.3.2. Máxima verossimilhança

É um método de inferência filogenética que avalia a hipótese sobre a história evolucionária em termos da probabilidade de que o modelo proposto e a história hipotética dariam origem ao conjunto de dados observados. A suposição é que a história com maior probabilidade de atingir o estado observado é preferida à história com mais baixa probabilidade. O método procura pela árvore com maior probabilidade ou maior verossimilhança (BUSO, 2005).

O método de máxima verossimilhança avalia a probabilidade de que um modelo evolucionário escolhido tenha gerado as sequências observadas. A filogenia é inferida achando-se as árvores com maior verossimilhança.

Sob a hipótese de que cada sítio do nucleotídeo evolui independentemente (modelo de evolução Markovian), pode-se calcular a verossimilhança para cada local separadamente e combinar as verossimilhanças num valor total. Para calcular a verossimilhança para um determinado sítio, têm-se que considerar todos os cenários possíveis pelos quais os nucleotídeos presentes nas pontas da árvore possam ter evoluído. Então, a verossimilhança para um local particular é a soma das probabilidades de todas as reconstruções possíveis de estados ancestrais, dado o modelo de substituição de bases (BUSO, 2005). Após a estimativa das probabilidades para o sítio em questão e considerando-se todos os nucleotídeos possíveis, o processo é repetido para todos os sítios até que todas as probabilidades tenham sido estimadas. Aceitando-se que todos os sítios evoluem independentemente, a estimativa da verossimilhança para toda a sequência será igual ao produto das probabilidades de cada sítio. Isso é repetido para todas as árvores possíveis, e aquela com maior verossimilhança será escolhida. Para um grande número de táxons torna-se impossível a procura devido ao grande esforço computacional (BUSO, 2005).

1.2.3.3. Inferência Bayesiana

Os métodos bayesianos partem do mesmo princípio matemático da máxima verossimilhança. Entretanto, nos métodos da máxima verossimilhança os parâmetros são considerados constantes desconhecidas fixas, enquanto nos métodos bayesianos, os parâmetros do modelo são considerados como variáveis aleatórias, com distribuições estatísticas. Antes da análise dos dados, aos parâmetros é atribuído uma distribuição a priori, que é, então, combinada com os dados (ou suas verossimilhanças) para gerar a distribuição a posteriori que serve de base para as inferências sobre os parâmetros que deverão ser estimados. O principal algoritmo empregado para este tipo de abordagem são os baseados em 'Cadeia de Markov', por simulação de Monte Carlo (MCMC, de Markov chain Monte Carlo). As 'Cadeias de Markov' são uma sequência estocástica (ou cadeia) de

estados, cuja probabilidade da mudança do estado atual para outro, ou para permanecer no mesmo estado, não depende dos estados passados, apenas do estado atual (WHELAN; LIÒ; GOLDMAN, 2001; YANG; RANNALA, 2012).

Assim, a escolha da árvore resultante dependerá do menor número de mudanças, no caso dos métodos de máxima parcimônia, o valor de log-verossimilhança (*log-likelihood*), nos métodos de máxima verossimilhança, e a probabilidade posterior, nos métodos de inferência bayesiana (WHELAN; LIÒ; GOLDMAN, 2001).

1.2.3.4. Análise de Bootstrap

O bootstrap não paramétrico (FELSEINSTEIN, 1985) é muito utilizado em análises filogenéticas, tanto em análises por máxima parcimônia, como nas análises por máxima verossimilhança, para estimar o nível de confiança dos ramos das hipóteses filogenéticas. O teste consiste em uma simples reamostragem aleatória, com reposição dos dados. Para cada réplica é obtida uma árvore e, no final, é computada uma árvore consenso na qual consta a proporção (porcentagem de vezes) que cada agrupamento foi recuperado nas árvores réplicas (GRAUR; LI, 2000; NEI; KUMAR, 2000; RUSSO et al., 2001).

REFERÊNCIAS

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th. ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 948p, 2005.

ALAHAKOON, P.W.; BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, n. 2, p. 93-103, 1994.

ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2015. Santa Cruz do Sul- RS: Editora Gazeta Santa Cruz, 104 p., 2015.

AVILA-QUEZADA, G.; SILVA-ROJAS, H.V.; TELIZ-ORTIZ, D. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 1200-1200, 2007.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 289p. 1996.

BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 478-482, 1995.

BUSO, G. S. C. **Marcadores Moleculares e Análise Filogenética**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documento 137, Brasília, 2005. Disponível

em:<<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2021925/doc137.pdf/deb86efd-2ca9-4b1b-b241-45a719d33729>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* Systematics. In: PRUSKY, D., FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. Saint Paul: APS Press, p. 1-19. 2000.

CANNON, P.F.; BUDDIE, A.G.; BRIDGE, P.D. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 104, p.189-204, 2008.

CANNON, P. F., DAMM, U., JOHNSTON, P. R., WEIR, B. S. *Colletotrichum* current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, p.181-213, 2012.

DAMM U, CANNON PF, WOUDEMBERG JHC, JOHNSTON PRP, WEIR BS, TAN Y, SHIVAS RG, CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies Mycology** 73:1-36, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEMBERG, J. H. C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies Mycology** 73:37-113, 2012.

DODD, J.C.; ESTRADA, A.; JEGER, M.J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics, In: BAILEY, A.J.; JEGER, J.M. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CAB International, p. 308-325. 1992.

FELSENSTEIN, J. Os limites de confiança em filogenias: uma abordagem utilizando o *bootstrap*. **Evolução**, v.39, p.783-791, 1985.

FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R.J.; TÖFOLI, J.G.; NOGUEIRA, E.M.C. **Antracnose associada às fruteiras**. 2011. Artigo em Hipertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/antracnose/index.htm>. Acesso em: 21 dez. 2015.

FREEMAN, S.; KATAN, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 516-521, 1997.

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

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 608-614, 2000.

GRAUR, D. & LI, W. **Fundamentals of Molecular Evolution**. 2ª edição, Sinauer Associates, Sunderland, 2000.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 147-182, 2009.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEEGER, M.J.; PUMBLEY, R.A. *Colletotrichum* species on tropical fruits. **Plant Pathology**, London, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.; PEREIRA, M.; LIMA, M.M.; CHAVES, R.C. Doenças da goiabeira no Cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 31 p. (Circular Técnica, 15) 2001.

JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, H. Controle das doenças da goiabeira In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed.) Controle de doenças de plantas: fruteiras. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p. 1247-1277. 2002.

KOLLER, O.C. Abacate – Produção de mudas, Instalação e manejo de pomares, colheita e pós-colheita. Porto Alegre: Cinco Continentes, 149p. 2002.

LIMA, N. B.; BATISTA, M. V. A.; MORAIS JR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D. CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61: p.75–88, 2013.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*, **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, Suplemento, p. 523-524, 2002.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. D.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, cap. 9, p. 97-107, 2001.

MORAES, S.R. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros**. 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press. New York, 2000.

PEGG, K.G.; COATES, L.M.; KORSTEN, L.; HARDING, R.M. Foliar, fruit and soil diseases. In: WHILEY, A.W.; SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B.N. (Ed.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CAB International Press, p. 299-338. 2002.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum* - A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-198, 1999.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças do abacateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 1-7, 2005.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. *Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. Minnesota: APS Press, 393p. 2000.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSE, A.R; VOLPE, C.A; OLIVEIRA, J.C; DURIGAN, J. F; BAUMGARTNER, J. G; SILVA, J.R. da; NAKAMURA, K.I.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA, 64 p. 1996.

RUSSO, C. A. M.; MIYAKI, C. Y. E PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In: Mاتيoli, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Editora Holos, Brasil. Pp. 108-116, 2001.

SANDERS, G.M.; KORSTEN, L. A comparative morphological study of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. Canadian **Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, p. 877-885, 2003.

SERRA, I.M.R.S.; COÊLHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.; MONTARROYOS, A.V.V.; SILVA, D.S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 37, n. 1, 2011.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 696p. 1980.

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

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

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L., MASSOLA, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 270-280, 2015.

WALKER, J.; NIKANDROW, A.; MILLAR, G.D. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 10, p. 1175-1193, 1991.

WEIR, B.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**. v.73, 2012.

WHELAN, S.; LIÒ, P., GOLDMAN, N. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. **Trends Genetics**. May; 17(5):262-72, 2001.

VON ARX, J.A. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathology**. Zeitschrift 29: 413-468, 1957.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**. Mar 28;13(5):303-14, 2012.

CAPITULO 2 – Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de abacateiros com sintomas de antracnose

RESUMO – O Brasil produz, em média, 139 mil toneladas de abacate por ano, em área de 8,5 mil hectares. Em 2015, a exportação brasileira foi de 5,8 mil toneladas de abacate, gerando uma receita de 9,5 milhões de dólares. Dentre os fatores que limitam o aumento da exportação desta fruta, encontra-se a antracnose. Esta doença é causada pelo fungo *Colletotrichum* spp. e está presente em todos os países produtores de abacate. O presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas a sintomas de antracnose em frutos de abacate, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas. Cinquenta isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de abacateiros, provenientes de diferentes municípios, foram submetidos às análises morfo culturais, testes de patogenicidade cruzada e estudos moleculares. Na caracterização molecular foram sequenciadas regiões parciais dos genes da actina (ACT), glutamina sintase (GS), gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CL), β -tubulina (TUB) e ITS1-5.8S-ITS2. Constatou-se diversidade morfo cultural entre os isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados. Os critérios morfo culturais abordados neste estudo não foram suficientes para distinguir espécies do gênero. Os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de abacateiros mostraram-se patogênicos em banana, goiaba, manga e mamão. *Colletotrichum musae* e *C. siamense* estão associadas aos sintomas de antracnose em abacate no Brasil.

Palavras chaves: *Persea americana*, *Colletotrichum musae*; *Colletotrichum siamense*; pós colheita.

2.1. INTRODUÇÃO

O Brasil produz em média 139 mil toneladas de abacate (*Persea americana* L.) por ano, em área de 8,5 mil hectares. A produção brasileira está distribuída principalmente nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com 50,0% do total nacional, seguido por Minas Gerais, que apresenta participação em torno de 20%, Paraná (11,0%), Rio Grande do Sul (5,0%) e Ceará, com 3,0% (AGRIANUAL, 2012). Em 2015, o Brasil exportou 5,8 mil toneladas de abacate, gerando uma receita de 9,5 milhões de dólares (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2015).

A exportação de abacate aumentou devido às melhorias na qualidade dos produtos, resultantes dos avanços nas tecnologias de pós-colheita, reduções de barreiras comerciais, elevação no consumo, baseado na divulgação dos seus benefícios à saúde, entre outros motivos. O Brasil possui um grande potencial a ser explorado para a exportação desta fruta. No entanto, são necessários investimentos visando minimizar os danos de pós-colheita, uma vez que esse fator é limitante à exportação. Esses danos podem ser de natureza física, fisiológica e patológica, e se expressam desde a colheita até seu uso pelo consumidor (KLUGE et al., 2001; MARTINS et al., 2006).

Dentre os fatores de pós-colheita de natureza patológica, destaca-se a antracnose, que ocorre em todas as regiões produtoras de abacate, sendo considerada uma das mais importantes doenças da cultura (PEGG et al., 2002; AVILA-QUEZADA; SILVA-ROJAS; TELIZ-ORTIZ, 2007).

A antracnose ocorre em todos os órgãos aéreos do abacateiro. Nas folhas, ocorrem lesões angulares, de cor marrom a preta, nos ramos ocorrem necroses escuras e secas, e nas flores ocorre seca e abscisão das mesmas. Os danos mais severos, entretanto, ocorrem nos frutos, cujos sintomas são lesões diminutas, marrons, situadas ao redor das lenticelas do fruto, as quais depreciam o seu valor comercial, ou provocam a queda prematura. Outro tipo de sintoma, em frutos verdes, são manchas grandes e difusas, resultantes da infecção favorecida por aberturas causadas por picadas de insetos ou danos mecânicos. Nos frutos em amadurecimento, na pós-colheita, os sintomas provêm da infecção latente ocorrida no campo, podendo aparecer nos lados ou no extremo floral do fruto. Estes iniciam

com uma área marrom-clara e deprimida, aumentando rapidamente de tamanho, tornando-se marrom-escura a negra, e se expandindo para o interior da polpa, até atingir a semente. Sob condições de alta umidade, aparecem massas mucilaginosas rosadas de esporos, que saem dos acérvulos (PEGG et al., 2002).

No Brasil, apenas *C. gloeosporioides* é citado como agente causal da antracnose do abacate (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005). Entretanto, em outros países, as espécies *C. acutatum* (AVILA-QUEZADA; SILVA-ROJAS; TELIZ-ORTIZ, 2007) e *C. boninense* (SILVA-ROJAS; AVILA-QUEZADA, 2011) são também relatadas como agentes causais.

A diferenciação entre espécies de *Colletotrichum*, baseadas no hospedeiro de origem, pode não ser um critério confiável para fungos deste gênero, que podem infectar inúmeras espécies de plantas. Deste modo, diversos estudos buscam caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum*, visando compreender a etiologia da antracnose, em diferentes hospedeiros (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR, 2015).

Estudos de caracterização baseados na combinação de métodos convencionais e técnicas moleculares são fundamentais para a identificação e conhecimento das relações filogenéticas entre isolados de um determinado patógeno (FREEMANN; KATAN; SHABI, 1998; LOPEZ, 2001; TOZZE JÚNIOR et al., 2006; ANDRADE et al., 2007).

Com os avanços nos estudos moleculares associados aos métodos baseados em critérios fenotípicos, novas espécies de *Colletotrichum* poderão ser descritas. Tozze Junior (2015) verificou em seu trabalho que, no Estado de São Paulo, as antracnoses do abacate, manga, maracujá e pêssego poderiam ser causadas por diferentes espécies do complexo *C. gloeosporioides*. Porém, a discriminação dessas espécies não foi realizada.

Estudo envolvendo espécies de *Colletotrichum* spp. associadas ao cafeeiro, na Colômbia, GONZÁLEZ (2007) verificou que a análise filogenética conjunta, envolvendo sequências das regiões ITS e β -tubulina demonstrou ser mais confiável que a análise desses genes, individualmente. Hyde et al., (2009), tendo como base critérios morfológicos associados à análise de sequência de múltiplos genes sugeriram a existência de 66 espécies de *Colletotrichum*.

A análise filogenética utilizando dados de várias regiões do genoma, em conjunto, tem demonstrado resultados importantes para elucidar questões filogenéticas. A viabilidade desta técnica para estudos taxonômicos de fungos do gênero *Colletotrichum* foi confirmada por Choi et al., (2011). Esses autores, ao caracterizarem isolados de *C. panacicola* de ginseng na Coreia, concluíram que esta espécie não poderia ser distinguida de *C. higginsianum*, *C. destructivum* e *C. coccodes* por meio de características morfológicas, tampouco a poderia discriminar de *C. higginsianum* e *C. destructivum*, com análise das sequências da região ITS. Porém, uma árvore filogenética baseada em sequências combinadas de três genes (Actina, Glutamina sintetase e α -elongase) proveu variabilidade suficiente para delimitar *C. panacicola* das demais espécies de *Colletotrichum* analisadas.

Dessa forma, estudos dessa natureza, e principalmente a taxonomia dos agentes causais dos sintomas de antracnose em mangueiras são essenciais para uma melhor compreensão deste patossistema, assim como da epidemiologia da doença e, por conseguinte, melhorias na definição de estratégias de controle. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente os isolados de *Colletotrichum* associadas aos frutos de abacate, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados *Colletotrichum* spp.

Foram obtidos 50 isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de frutos de abacateiros, cujas as variedades e localidades estão apresentadas na Tabela 1.

Para o isolamento, os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 2,5%, por três minutos e mantidos em ambiente de laboratório para expressão dos sintomas de antracnose. Posteriormente, a partir de lesões típicas de antracnose, e de forma direta, procedeu-se a remoção superficial de conídios, empregando-se agulha previamente flambada. A seguir, a massa de conídios foi plaqueada em meio batata-dextrose-água (BDA) contido em placas de Petri, e mantidas em estufas para B.O.D. a 25 °C $\pm$ 1 °C por tempo necessário para a formação de colônias do fungo.

Posteriormente, uma vez purificadas as culturas, foram obtidas colônias monospóricas.

Tabela 1. Procedência dos frutos de abacateiros, variedades e identificação dos Isolados de *Colletotrichum* utilizados na caracterização morfo cultural e molecular.

Localidade	Variedade	Isolados
Aguai - SP	Breda	1A
		2A
		3A
	Margarida	4A
		5A
		6A
Bauru – SP	Beatriz	7A
		8A
		9A
	Breda	10A
		11A
	Fortuna	12A
		13A
	Hass	14A
		15A
	Quintal	16A
Piraju - SP	Beatriz	17A
		18A
		19A
		20A
		21A
		22A
	Breda	23A
		24A
	Fortuna	25A
		26A
	Hass	27A
		28A
		29A
		30A
	Quintal	31A
		32A
		33A
		34A
São João da Boa Vista - SP	Breda	35A
		36A
		37A
		38A
		39A
		40A
		41A
		42A
São Sebastião do Paraíso - MG	Breda	43A
		44A
		45A
		46A
Taquaritinga - SP	Breda	47A
		48A
		49A
		50A

2.2.2. Caracterização morfocultural

Para a análise morfocultural, discos de colônias de 5 mm de diâmetro foram extraídos das margens de culturas monospóricas de sete dias, cultivadas em meio BDA, e transferidos para novas placas contendo o mesmo meio de cultivo. A seguir, tais culturas foram incubadas a 25°C, sob luz fluorescente contínua. Após as colônias alcançaram uniformemente as bordas das placas e atingir estabilização da sua coloração, procederam-se avaliações das mesmas, borda e reverso, sendo também avaliada a possível presença de setores. Para cada isolado foram utilizadas três repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri contendo os respectivos isolados. A partir das avaliações quanto à coloração das colônias e possível presença de setores, desenvolveu-se uma escala qualitativa das notas (Tabela 2).

Tabela 02. Escala de notas referentes à coloração de colônias, em meio de cultura batata-dextrose-água, de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de abacateiros.

Escala	Coloração das Colônias	
	Frente da placa de Petri	Reverso da placa de Petri
1	Branco	Branco
2	Cinza	Castanho
3	Branco/Cinza	Castanho
4	Branco/Salmão	Branco/Cinza
5	Branco/Cinza	Branco/Castanho

A mensuração do diâmetro médio das colônias foi realizada diariamente, em dois sentidos perpendiculares entre si, até que para algum isolado, a colônia tenha atingido o bordo da placa. A partir de tais dados foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), conforme Nechet (2002), empregando-se a equação usada por Oliveira (1991).

$$IVCM = \frac{\sum(D - D_a)}{N}$$

Onde:

IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial (cm dia^{-1});

D: Diâmetro médio da colônia (cm);

Da: Diâmetro médio da colônia do dia anterior (cm);

N: Número de dias após a repicagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por isolado. Cada unidade amostral foi constituída por uma placa. Nas análises morfométricas, conídios oriundos de colônias de *Colletotrichum* foram utilizados em preparações microscópicas, montados e avaliados ao microscópio óptico, usando a objetiva de 40X. Foram avaliados 50 conídios, dos quais foram tomadas medidas do comprimento (C) e a largura (L), empregando-se o software BEL Capture 3.1. Posteriormente, mediante os dados obtidos foi determinada a relação comprimento/largura (C/L).

2.2.3. Teste de patogenicidade cruzada

Para os testes de patogenicidade cruzada, isolados de *Colletotrichum* spp. foram inoculados em frutos destacados e sadios de abacate 'Breda', banana 'Prata', goiaba 'Paluma', manga 'Palmer' e mamão 'Formosa', previamente desinfestados, conforme Sanchez (1990). Na inoculação, frutos limpos e enxutos, arrumados individualmente em bandejas de plástico, foram feridos superficialmente com uma agulha hipodérmica esterilizada. A seguir, uma gota contendo 30 μL de suspensão contendo $1-2 \times 10^5$ conídios mL^{-1} , de cada um dos isolados mantidos em BDA, a 25°C, foi colocada sobre o ferimento. Os frutos, uma vez inoculados, foram mantidos nas bandejas, sendo armazenados em câmara fria a 25°C (MORAES; TANAKA; MASSOLA JÚNIOR 2013). As avaliações de patogenicidade foram feitas a cada 24 h após a inoculação, por um período de 15 dias, considerando positivo quando da presença de sintomas típicos da doença.

2.2.4. Análise dos dados morfocultural e patogenicidade cruzada

Para os dados oriundos das análises morfoculturais e teste patogenicidade cruzada foram aplicados análises exploratórias multivariadas, análise de

agrupamento por método hierárquico e análise de componentes principais, que permitiram a avaliação em conjunto de todas as variáveis analisadas. O software utilizado para essas análises foi o Statistica 7.0.

Para medir a semelhança entre os centróides de cada isolado utilizou-se a distância euclidiana (medida de dissimilaridade) para o conjunto das variáveis, enquanto que para a estratégia de agrupamento adotou-se o método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). O resultado da análise foi apresentado em forma gráfica (dendrograma), auxiliando na caracterização dos grupos.

A caracterização dos isolados foi feita utilizando a análise de componentes principais, que é uma técnica multivariada exploratória que permite condensar a maior quantidade de informações originais, contida em p variáveis (coloração das colônias, presença ou ausência de setores, índice de velocidade de crescimento micelial, patogenicidade dos isolados e mensuração dos conídios), em variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais (HAIR, 2005), onde a correlação entre cada variável (X_j) e um componente principal (CP_h) é medida por:

$$r_{x_j}(cp_h) = \frac{a_{jh} \sqrt{\lambda_h}}{s_j}$$

Onde:

s_j é o desvio padrão da variável j ;

a_{jh} é o coeficiente da variável j no h -ésimo componente principal;

λ_h é o h -ésimo autovalor da matriz de covariância.

O critério de Kaiser foi utilizado para eleger os componentes principais. Um autovalor preserva informação relevante quando é superior à unidade.

2.2.5. Caracterização molecular

2.2.5.1 Extração de DNA

Para a obtenção e extração de DNA, os isolados de *Colletotrichum* spp. foram repicados para frascos de vidro transparentes, de 110 mL, contendo meio de cultura líquido BD (batata-dextrose), nos quais os fungos se desenvolveram por cerca de 15

dias. Para a separação do micélio do meio de cultura foram utilizadas peneiras de pequena trama, que permitiram a filtragem, retendo o micélio e dispensando o meio restante. Ainda na peneira, o micélio foi lavado com água destilada autoclavada, escorrido e colocado para secar em placas de Petri limpas, em temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. Posteriormente, o micélio seco foi macerado com nitrogênio líquido até a formação de um pó, que foi transferido para tubos Eppendorf de 2,0 mL e armazenados em freezer -20°C, para posterior extração de DNA.

O protocolo de Kuramae-Izioka (1997), com modificações, foi utilizado para as extrações de DNA, o que permitiu a obtenção de DNA em maior quantidade e qualidade. Assim, foram acrescentados 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 100 mM pH 8,0 e SDS 0,5% (p/v)] a um tubo Eppendorf de 2,0 mL contendo 0,1 g de micélio macerado. Após agitados, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo agitados gentilmente a cada 10 minutos. Posteriormente a esse período, foram acrescentados 400 µL de acetato de potássio 5M. Misturou-se a solução por inversão e incubou-se em gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Após as amostras terem sido centrifugadas a 3040 g por 10 minutos, a 15°C, o sobrenadante foi transferido para tubos novos, e acrescido 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão durante dois minutos, seguida de centrifugação a 3040 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e, novamente, tratado com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sob as mesmas condições. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para tubos novos e acrescido 15 µL de RNase (10 mg/mL). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado, e a solução, após ser misturada gentilmente, foi levada ao freezer -20°C por aproximadamente 12 horas, ou ao freezer -80°C, por 30 minutos. Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 3040 g por 20 minutos. A fase líquida foi descartada e o pellet foi lavado com 1000 µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação nas mesmas condições anteriores, a fase líquida foi descartada e o pellet seco na capela fluxo laminar por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, o pellet foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl

10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) por 24 horas a 4°C. A concentração de DNA e sua qualidade foi verificada com o auxílio de um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000, 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).

2.2.5.2. Amplificação e sequenciamento das regiões ITS, actina parcial, glutamina sintase parcial, calmodulina parcial, β -tubulina parcial e gliceraldeído3-fosfato desidrogenase parcial

A região ITS1-5.8S-ITS2 e as regiões parciais dos genes da actina (ACT), glutamina sintase (GS), β -tubulina (TUB), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e calmodulina (CL) foram amplificadas com os pares de primer: ITS1/ITS4, ACT512F/ACT783R, GSF1/GSR1, Bt2a/Bt2b, GDF1/GDR1 e CLF/CLR (Tabela 3). Para a PCR utilizou-se tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 2 mM, pH 8,4); 0,2 mM de dNTPs, 2u de Taq DNA polimerase, 2 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada primer, 80 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 μ L. O programa utilizado no termociclador foi: 94°C por 2 minutos, 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C (para ITS e GADHP, 58°C para ACT e 54°C para GS, CL e TUB) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando-se o processo com 72°C por 5 minutos. 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 do tamanho dos fragmentos gerados. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC 1000 (BioRad).

A purificação do produto de PCR foi realizada de acordo com o protocolo de Dorado-Pérez (2012), com modificações. Após a finalização da amplificação o produto de PCR foi transferido para um tubo de 1,5 mL, e acrescentou-se 12 μ L de acetato de sódio 3M (pH 4,6) e 330 μ L de etanol absoluto gelado. O tubo foi invertido e incubado por 30 min no freezer -80 °C. O tubo foi centrifugado a 3040 g por 30 min a 4°C, e o sobrenadante, descartado. Na etapa seguinte acrescentou-se 1 mL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação por 10 min a 3040 g. O sobrenadante

foi descartado, e o pellet seco. Após a evaporação de todo o etanol, o pellet foi eluído em 22 µL de água pura esterilizada.

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 50 ng de produto de PCR purificado, 3,0 mL de tampão de sequenciamento (Save money 2,5X), 1,0 mL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador e quantidade de água bi-destilada esterilizada qsp. 10 mL. Em seguida, 80 mL de isopropanol 75% foram adicionados em cada reação. Após 15 minutos em temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas a 3040 *g*, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), por 30 minutos a 20°C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 mL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 3040 *g* por 10 minutos a 20°C. As amostras foram secas à vácuo, ressuspendidas em 10 mL de formamida, desnaturadas por 5 min. a 95°C e submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático ABI 3730 XL, conforme recomendações sugeridas pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)).

Tabela 3. Primers utilizados para amplificar as regiões ITS1-5.8S-ITS2, actina parcial, glutamina sintase parcial, gliceraldeído 3 -fosfato desidrogenase parcial, calmodulina parcial e β -tubulina.

Região/Gene	Primers	Referência
Actina parcial	ACT512F (5'-ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC-3')	Carbone; Kohn, 1999
	ACT783R (5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT-3')	
B-tubulina	Bt2aF (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3')	Glass; Donaldson, 1995
	Bt2bR (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3')	
Calmodulina	CL1F (5'- GAA TTC AAG GAG GCC TTC TC -3')	Weir et al., 2012
	CL2R (5'- CTT CTG CAT CAT GAG CTG GAC -3')	
Glutamina sintase parcial	GSF1 (5'-ATG GCC GAG TAC ATC TGG-3')	Guerber et al., 2003
	GSR1 (5'-GAA CCG TCG AAG TTC CAC-3 ')	
Gliceraldeído 3 -fosfato desidrogenase parcial	GDF1 (5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3')	Guerber et al., 2003
	GDR1(5'-GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT-3')	
ITS1-5.8S-ITS2	ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3')	White et al., 1990
	ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3')	

2.2.5.3. Análise Filogenética

Para a análise dos eletroferogramas gerados pelo processo de sequenciamento foi utilizada a infraestrutura do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO da FCAV-UNESP. Os eletroferogramas foram submetidos aos programas Phred (EWING; GREEN, 1998), Phrap (GREEN, 1996) e Cap3 (HUANG; MADAN, 1999), para verificação da sua qualidade, alinhamento e corte das extremidades. As duas sequências obtidas destas regiões, para cada amostra, foram alinhadas e a sequência consenso exportada para um arquivo de sequências destinadas às análises posteriores. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e depois, manualmente, editadas. Inserções e deleções (“indels”) foram assinaladas com traços (“-”). Foram adicionadas ao alinhamento sequências do gênero *Colletotrichum*, obtidas no GenBank (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição das unidades taxonômicas operacionais de *Colletotrichum* spp. utilizadas nas análises filogenéticas.

	ACT	TUB	CAL	GS	GPDH	ITS
<i>C. gloeosporioides</i>	FJ907430	FJ907445	FJ917512	FJ972589	FJ972582	FJ972609
	HM034800	HM034810	HM034802	-	HM034806	HM034808
	HM034801	HM34811	HM34803	-	HM34807	HM34809
<i>C. asianum</i>	FJ903188	FJ907434	FJ917501	FJ972586	FJ972571	FJ972506
	FJ907424	FJ907439	FJ917506	FJ972595	FJ972576	FJ972612
	FJ907421	FJ907436	FJ917503	FJ972598	FJ972573	FJ972615
<i>C. siamense</i>	FJ907420	FJ907434	FJ917502	FJ972599	FJ972572	FJ972604
	FJ907423	FJ907438	FJ917505	FJ972596	FJ972575	FJ972613
	FJ907422	FJ907437	FJ917504	FJ972597	FJ972574	FJ972674
<i>C. fruticola</i>	FJ907427	FJ7442	FJ917509	FJ972592	FJ972579	FJ972611
	FJ907425	FJ907440	FJ917507	FJ972594	FJ972577	FJ972602
	FJ907426	FJ907441	FJ917508	FJ972593	FJ972578	FJ972603
<i>C. acutatum</i>	FJ907428	FJ907443	FJ917510	FJ972591	FJ972580	FJ972601
	FJ907429	FJ907444	FJ917511	FJ972590	FJ972581	FJ972610
<i>C. musae</i>	HQ596284	HQ596280	-	HQ596258	HQ59299	HQ596292
	HQ596285	HQ596281	HQ596296	HQ596289	HQ596300	HQ596293
	HQ596286	HQ596282	HQ596297	HQ596290	HQ596301	HQ596294
	HQ596287	HQ596283	HQ596298	HQ596291	HQ596302	HQ596295
<i>C. boninense</i>	KJ954462	KP119720	JX009741	KJ955039	KJ954890	KJ955189

Para obtenção das árvores filogenéticas foram utilizados três métodos: 1) Máxima Parcimônia (MP); 2) Máxima Verossimilhança (MV), nos quais, em ambos, foi selecionada a opção TBR (Tree-Bisection-Regrafting), com 1000 réplicas de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) para verificar a robustez dos ramos em cada conjunto de dados e; 3) Análise Bayesiana (BA), com probabilidade posterior de 5.000 gerações. Os métodos 1 e 2, assim como a escolha do melhor modelo evolutivo foram implementados no programa Mega v.6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2013), enquanto o método 3 foi implementado no MrBayes (3.2.6) (RONQUIST; HUELSENBECH, 2003).

Após a análise individual de cada região (ACT, CL, TUB, GAPGH, GS e ITS) foi verificado visualmente a constância do sinal filogenético existente em cada uma das regiões, e as mesmas concatenadas gerando uma matriz multilocus.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Caracterização morfofocultural

Os dados relativos ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), características morfofoculturais e teste de patogenicidade cruzada encontram-se apresentados na Tabela 5. A média de crescimento dos isolados foi 1,43 cm dia⁻¹, e o isolado que apresentou o maior IVCM foi o 38A (1,58 cm dia⁻¹), enquanto que o menor IVCM foi verificado para isolado 14A (1,25 cm dia⁻¹).

Todos os isolados deste estudo apresentaram IVCM superior a 1 cm dia⁻¹. Adaskaveg e Hartin (1997) utilizaram desta característica como critério para distinção de espécies de *Colletotrichum*. Em seu trabalho, os isolados que apresentaram taxa de crescimento inferior a 1 cm dia⁻¹ foram identificados como *C. acutatum*, enquanto que os que apresentaram taxa de crescimento maior que 1 cm dia⁻¹ foram classificados como *C. gloeosporioides*. Embora este critério seja adotado por alguns autores, Freeman, Katan e Shabi (1998) observaram que as colônias de isolados de *C. gloeosporioides* de amendoeira tiveram menor crescimento que os isolados dessa mesma espécie obtidos de abacate, e não diferiram estatisticamente de isolados de *C. acutatum* de morangueiro. Sendo assim, tal critério não se mostra confiável para distinção de espécies do gênero *Colletotrichum*.

Tabela 5. Classificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de abacate quanto a coloração das colônias, teste de patogenicidade, presença de setor, morfometria dos conídios e índice de velocidade de crescimento micelial.

	Cor*	IVCM (cm/dia)*	Setor	Mensuração Conídios (µm)**			Teste Patogenicidade Cruzada				
				C*	L*	C/L*	Abacate	Banana	Goiaba	Mamão	Manga
1A	5	1,43	+	10,65 i	4,57 b	2,33 h	+	+	-	-	+
2A	5	1,52	-	9,56 j	3,76 d	2,54 g	+	-	-	+	-
3A	5	1,48	-	9,36 j	3,4 f	2,75 g	+	-	-	-	-
4A	2	1,43	-	12,92 e	4,54 b	2,84 f	+	-	-	-	-
5A	2	1,31	-	12,42 f	4,28 c	2,90 f	+	-	-	-	-
6A	1	1,30	-	11,56 h	3,69 e	3,13 e	+	-	-	+	+
7A	5	1,43	+	12,52 f	3,5 f	3,57 c	+	-	-	-	-
8A	5	1,44	-	12,63 f	4,67 a	2,70 g	+	-	-	-	-
9A	5	1,29	-	11,83 g	3,18 g	3,72 b	+	-	-	+	+
10A	2	1,36	-	9,62 j	4,24 c	2,26 h	+	+	-	+	+
11A	5	1,45	-	9,28 j	3,91 d	2,37 h	+	-	-	-	-
12A	5	1,30	-	12,63 f	4,62 b	2,73 g	+	-	-	-	-
13A	5	1,42	-	12,78 e	3,69 e	3,46 c	+	-	-	+	+
14A	4	1,25	-	12,86 e	3,18 g	4,04 a	+	+	-	-	-
15A	5	1,29	-	9,52 j	3,48 f	2,73 g	+	-	-	-	-
16A	3	1,46	-	12,63 f	4,28 c	2,95 f	+	-	-	-	-
17A	3	1,34	-	14,8 b	4,31 c	3,43 c	+	-	-	-	-
18A	5	1,44	-	12,54 f	3,5 f	3,58 c	+	-	-	-	+
19A	4	1,30	-	14 c	3,93 d	3,56 c	+	-	-	+	-
20A	4	1,38	-	14,03 c	4,15 c	3,38 d	+	-	-	-	-
21A	5	1,48	-	13,44 d	3,69 e	3,64 b	+	-	-	+	-
22A	2	1,45	-	13,02 e	3,48 f	3,74	+	-	-	-	-
23A	5	1,57	-	12,12 g	3,18 g	3,81 b	+	-	-	+	-
24A	5	1,39	-	13,76 c	4,74 a	2,90 f	+	+	-	+	-
25A	3	1,44	-	12,02 g	4,57 b	2,63 g	+	+	-	-	-
26A	3	1,52	-	14,81 b	3,69 e	4,01 a	+	-	-	-	-
27A	3	1,48	-	11,69 h	3,59 e	3,25 d	+	-	-	-	-
28A	4	1,38	-	13,64 d	3,26 g	4,18 a	+	+	-	-	-
29A	3	1,41	-	13,6 d	4,28 c	3,17 e	+	-	-	+	-
30A	3	1,43	-	12,93 e	4,83 a	2,67 g	+	-	-	-	-
31A	5	1,38	-	15,19 a	4,6 b	3,30 d	+	-	-	-	-
32A	2	1,45	-	12,27 f	3,79 d	3,23 d	+	-	-	-	-
33A	2	1,51	-	12,02 g	4,57 b	2,63 g	+	-	-	-	-
34A	2	1,50	-	13,06 e	4,26 c	3,06 e	+	-	-	-	-
35A	2	1,57	-	12,45 f	3,73 e	3,33 d	+	-	-	-	-
36A	4	1,40	-	12,28 f	3,9 d	3,14 e	+	+	-	-	-
37A	5	1,39	+	11,69 h	3,8 d	3,07 e	+	-	+	-	-
38A	3	1,58	-	13,02 e	4,46 b	2,91 f	+	-	-	-	-
39A	3	1,30	-	11,74 h	3,79 d	3,09 e	+	+	-	+	+
40A	3	1,50	-	12,85 e	4,28 c	3,00 f	+	-	-	-	-
41A	3	1,28	-	11,84 g	3,18 g	3,72 b	+	-	-	-	-
42A	3	1,46	-	13,42 d	4,31 c	3,11 e	+	-	-	-	-
43A	3	1,37	-	12,45 f	3,79 d	3,28 d	+	-	-	-	-
44A	3	1,46	-	12,17 g	3,67 e	3,31 d	+	-	-	-	+
45A	4	1,44	+	11,63 h	4,28 c	2,71 g	+	+	-	-	-
46A	3	1,33	-	12,84 e	3,48 f	3,68 b	+	-	-	-	-
47A	3	1,56	-	11,29 h	3,65 e	3,09 e	+	-	-	-	-
48A	3	1,48	-	12,63 f	3,62 e	3,48 c	+	-	-	-	-
49A	1	1,34	-	12,34 f	3,61 e	3,42 c	+	-	-	+	-
50A	3	1,32	-	11,62 h	3,52 f	3,30 d	+	-	-	-	-

*Cor: Coloração das colônias de acordo com a escala de notas apresentada na Tabela 2; *C: média do comprimento de 50 conídios; *L: média da largura de 50 conídios; *C/L: relação comprimento/largura; *IVCM: índice velocidade do crescimento micelial. **Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Na caracterização cultural, verificou-se que a cor das colônias variou de branca a cinza-escuro, sendo que alguns isolados apresentaram cor branca, com nuances de cor salmão. De acordo com a escala de notas, 36% dos isolados apresentaram coloração branca/cinza, com o reverso castanho; 32% dos isolados apresentaram coloração branco/cinza, com reverso branco/castanho; 16% dos isolados apresentaram coloração cinza, com reverso castanho; 12% dos isolados apresentaram coloração branca/salmão, com reverso branco/cinza, e 4% dos isolados apresentaram coloração branca, com reverso branco.

Houve predominância de colônias de coloração branca/cinza, com topografia aérea densa e com aspecto cotonoso. Apenas 8% dos isolados apresentaram a presença de setores. Estes resultados foram parcialmente convergentes aos descritos por Sutton (1992), que descreveu a coloração das colônias de *C. gloeosporioides* como sendo branca acinzentada, a cinza escuro. Porém, com exceção dos isolados 14A, 19A, 20A, 28A, 36A e 45A, a coloração das colônias, no reverso da placa de Petri dos isolados deste trabalho, não condiz com o descrito por Sutton (1992), mas sim com a descrita por Tozze Júnior (2007), Andrade et al., (2007) e Pimenta (2009), os quais verificaram que as colônias de *Colletotrichum* avaliadas, no reverso da placa de Petri, mostrava-se coloração castanha ou salmão.

De acordo com as análises morformétricas, a amplitude das médias de comprimento dos conídios foi 9,28 µm para o isolado 11A, e 14,81 µm para o isolado 26A, enquanto que para a largura, os valores das médias foram 3,18 µm para os isolados 9A, 14A, 23A e 41A, e 4,74 µm para o isolado 24A. Segundo Sutton (1992), *C. gloeosporioides* possui conídios com dimensões entre 12 a 17 µm de comprimento, por 3,5 a 6 µm de largura, enquanto os conídios de *C. acutatum* possuem 8,5 e 16,5 µm de comprimento por 2,5 a 4 µm de largura. Desta forma, as dimensões médias dos conídios, em geral, não permitiram uma clara classificação, pois para maioria dos isolados houve sobreposição para as espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Segundo Sutton (1992) e Freeman et al., (1998), muitas das características morfológicas das espécies do gênero *Colletotrichum* são extremamente plásticas e variáveis, dependendo principalmente das condições culturais e ambientais, que, por sua vez, dificilmente são padronizadas, produzindo

formas intermediárias de conídios e variando consideravelmente o aspecto da colônia.

2.3.2. Patogenicidade cruzada

Todos os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de lesões típicas de antracnose em abacate mostraram-se patogênicos quando inoculados em abacate, reproduzindo os sintomas na forma de lesões necróticas, de coloração marrom-escura, que se tornaram depressivas conforme a colonização do tecido (Tabela 5). Posteriormente, as lesões eram tomadas pelo fitopatógeno, com a formação de pequenas pontuações (acérvulos), presença de massas de conídios e tecidos mantendo coloração alaranjada (Figura 1).

Houve baixo número de isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de lesões do tipo antracnose em frutos de abacate, patogênicos em frutos de banana, goiaba, mamão e manga. Apenas 18% dos isolados causaram sintomas em banana, 2% em goiaba, 24% em mamão e 16% em manga. Na testemunha, nenhum dos isolados causou sintomas de antracnose durante o período de avaliação do experimento.



Figura 1. Sintomas típicos de antracnose, com lesões escuras e presença de massa conidial, de cor salmão, em fruto de abacateiro 'Breda'.

Os resultados obtidos mostram-se convergentes àqueles obtidos por Giblin, Coates e Irwin (2010), os quais verificaram que isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de abacate, quando inoculados em abacate mostram-se significativamente mais agressivos do que quando inoculados em manga, e vice-versa.

Ainda que apenas um pequeno número de isolados de *Colletotrichum* provenientes de abacate tenham se mostrado patogênicos a outras frutas, estes resultados indicam que estes não apresentam especificidade quanto ao hospedeiro, convergindo com os relatos apresentados por Bonett et al., (2010). Segundo estes investigadores, inoculações cruzadas com isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de diferentes hospedeiros, resultaram em sintomas de antracnose em várias espécies de frutas, incluindo abacate, mamão, fruta-do-conde, pimentão verde, chuchu, jiló, manga e pimenta. Semelhantemente, Peres et al., (2002), Silva et al., (2006) e Lima Filho, Oliveira e Menezes (2003), ao estudarem isolados de *Colletotrichum* spp. de algumas frutíferas demonstraram que, potencialmente, infecções cruzadas podem ocorrer.

Embora os isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de abacateiros sejam capazes de causar antracnose em frutos de banana, mamão e manga, em condições de laboratório, não existe comprovação de que isto ocorre em condições naturais. Porém, considerando esta possibilidade, este fato implica em maior dificuldade no desenvolvimento de métodos de controle efetivos da doença, especialmente quando do cultivo conjunto de culturas hospedeiras de espécies de *Colletotrichum*.

2.3.3. Análise de agrupamento das características morfoculturais e teste de patogenicidade

A análise conjunta das características morfoculturais e do teste de patogenicidade cruzada, por meio do agrupamento pelo método hierárquico, interligou as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, foram agrupadas entre si. Assim, foram obtidos cinco grupos de isolados, identificados como Grupo I, Grupo II, Grupo III, Grupo IV e Grupo V (Figura 2).

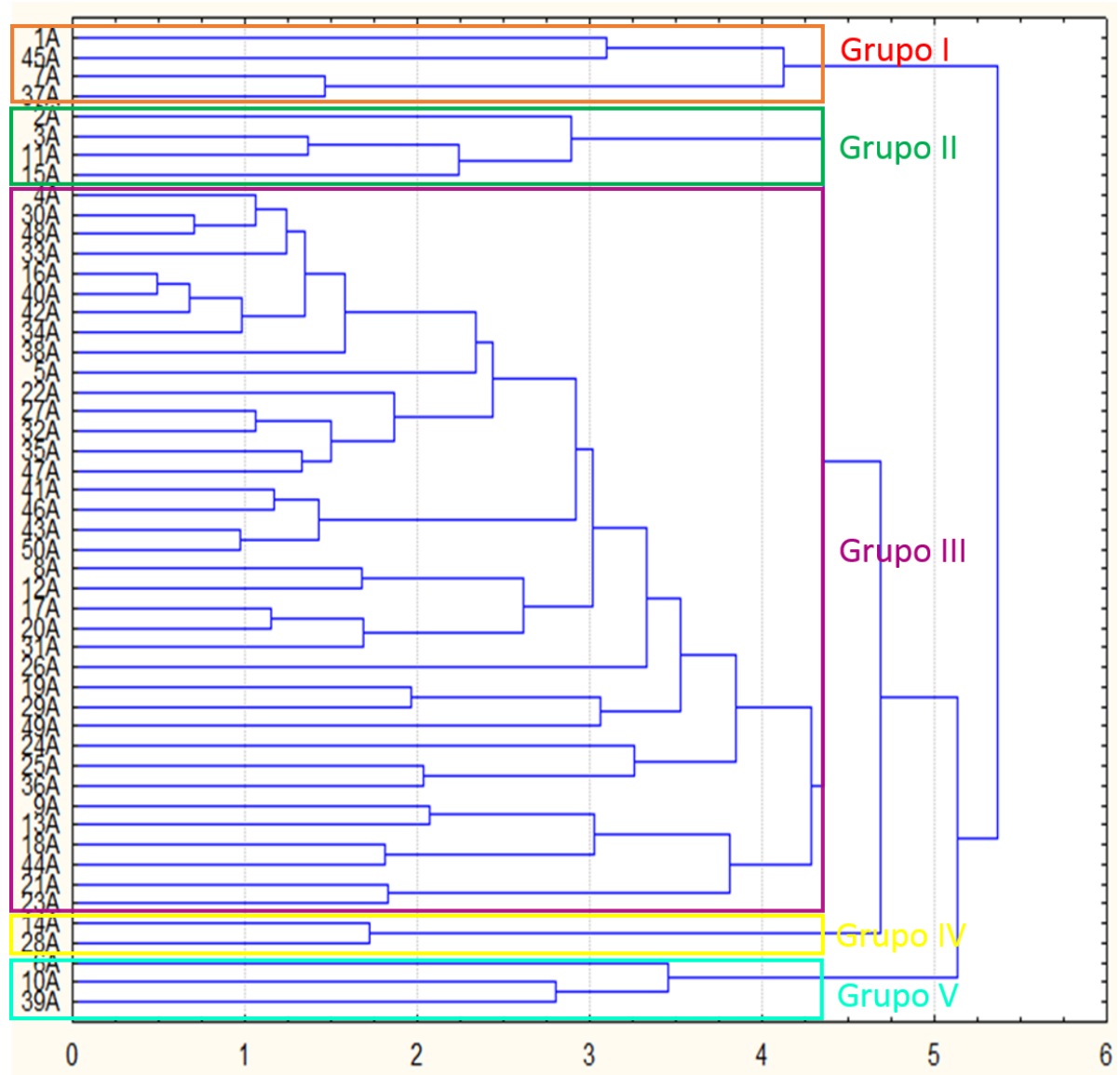


Figura 2. Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, morfometria de conídios, presença ou ausência de setor e patogenicidade cruzada.

A análise dos componentes principais possibilitou visualizar as características mais discriminantes, a qual deu origem ao agrupamento (Figura 3). O Grupo I foi composto por isolados que apresentaram a formação de setores durante o crescimento micelial. Essa característica, embora tenha influenciado na formação do grupo, não é consistente, uma vez que um mesmo isolado, quando repicado para diferentes placas de Petri contendo um mesmo meio de cultivo e sob ambiente idêntico, pode ou não apresentar setor.

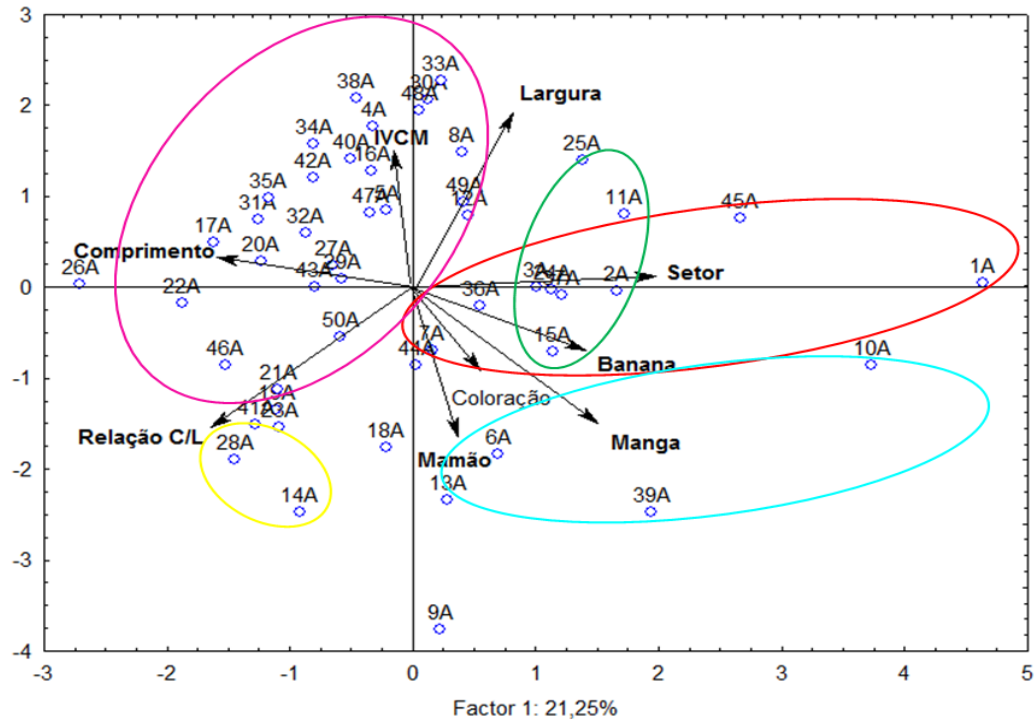


Figura 03. Biplot com destaque à projeção das variáveis coloração das colônias, morfometria dos conídios, presença e ausência de setor e patogenicidade nos componentes principais 1 e 2, com distribuição dos 50 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacateiros.

Em relação à média do comprimento dos conídios, os isolados 2A, 3A, 11A e 15A apresentaram os menores valores, formando o Grupo II. Já os isolados pertencentes ao Grupo IV apresentaram os maiores valores da relação comprimento/largura (C/L). Quanto ao teste de patogenicidade, os isolados 6A, 10A e 39A foram agrupados no Grupo V, por serem patogênicos em frutos de mamoeiro e manga, além de frutos de abacateiro.

Ainda que os aspectos morfológicos e o teste de patogenicidade tenham propiciado o agrupamento dos isolados, de um modo geral houve elevado polimorfismo entre os isolados, mesmo dentro de um mesmo grupo. Bueno, Tozze Júnior e Massola Júnior (2005) verificaram que determinadas mudanças nas variáveis ambientais foram suficientes para que um isolado previamente identificado como *C. acutatum* por técnicas moleculares, apresentasse morfometria mais próxima de *C. gloeosporioides*, e vice-versa. Este comportamento deve-se, normalmente, às influências do meio ambiente, notadamente aos aspectos

relacionados aos tipos de meios de cultivo, e também à temperatura ambiente e luminosidade (NECHET; ABREU, 2002).

2.3.4. Caracterização molecular

A análise filogenética realizada com base nas sequências nucleotídicas concatenadas das regiões ITS, ACT, GS, GAPDH, CL e β -tubulina resultou na formação de uma árvore composta por 67 táxons, sendo 50 sequências de isolados de *Colletotrichum* spp. e 17 espécies, cujas sequências foram retiradas do GeneBank para determinação do índice de similaridade. A matriz de dados conteve um total de 3.308 caracteres.

Esta análise proporcionou o agrupamento dos isolados em cinco grandes clados (Figura 4): Grupos I e II, compostos pelos isolados 04A, 25A, 39A, 47A e 48A, e 10A, 21A, 22A, 26A, 32A e 35A, respectivamente; Grupo III, formado somente por sequências retiradas do GenBank; e Grupos IV e V, constituídos tanto por sequências de nucleotídeos do isolados, quanto por sequências retiradas do GenBank.

Os Grupos I e II, embora apresentem maior proximidade filogenética entre eles, não há indicação, todavia, da proximidade com as espécies do GenBank, impossibilitando identificar a espécie responsável pela doença. Não se descarta a possibilidade destes isolados constituírem em nova espécie. Já nos Grupos IV e V foi possível identificar duas espécies de *Colletotrichum*: *C. siamense* e *C. musae*.

O isolado 37A, proveniente do município de Piraju-SP, corresponde a *C. siamense*. Esta espécie, segundo Bragança (2013), encontra-se frequentemente associada com o abacateiro no Brasil, e representa a espécie geneticamente mais variável e menos específica, em termos de hospedeiros.

Os isolados 14A, 28A, 36A e 48A foram agrupados juntamente com as sequências de *C. musae* (Grupo V), e apresentaram valor de inferência Bayesiana de 80%. De acordo com Weir et al., (2012), quanto mais próximo de 100 o valor de inferência Bayesiana, maior será a confiabilidade da topologia do clado e menor a distância de ramificação do nó que estabelece a relação da distância genética dos isolados com as espécies do GeneBank.

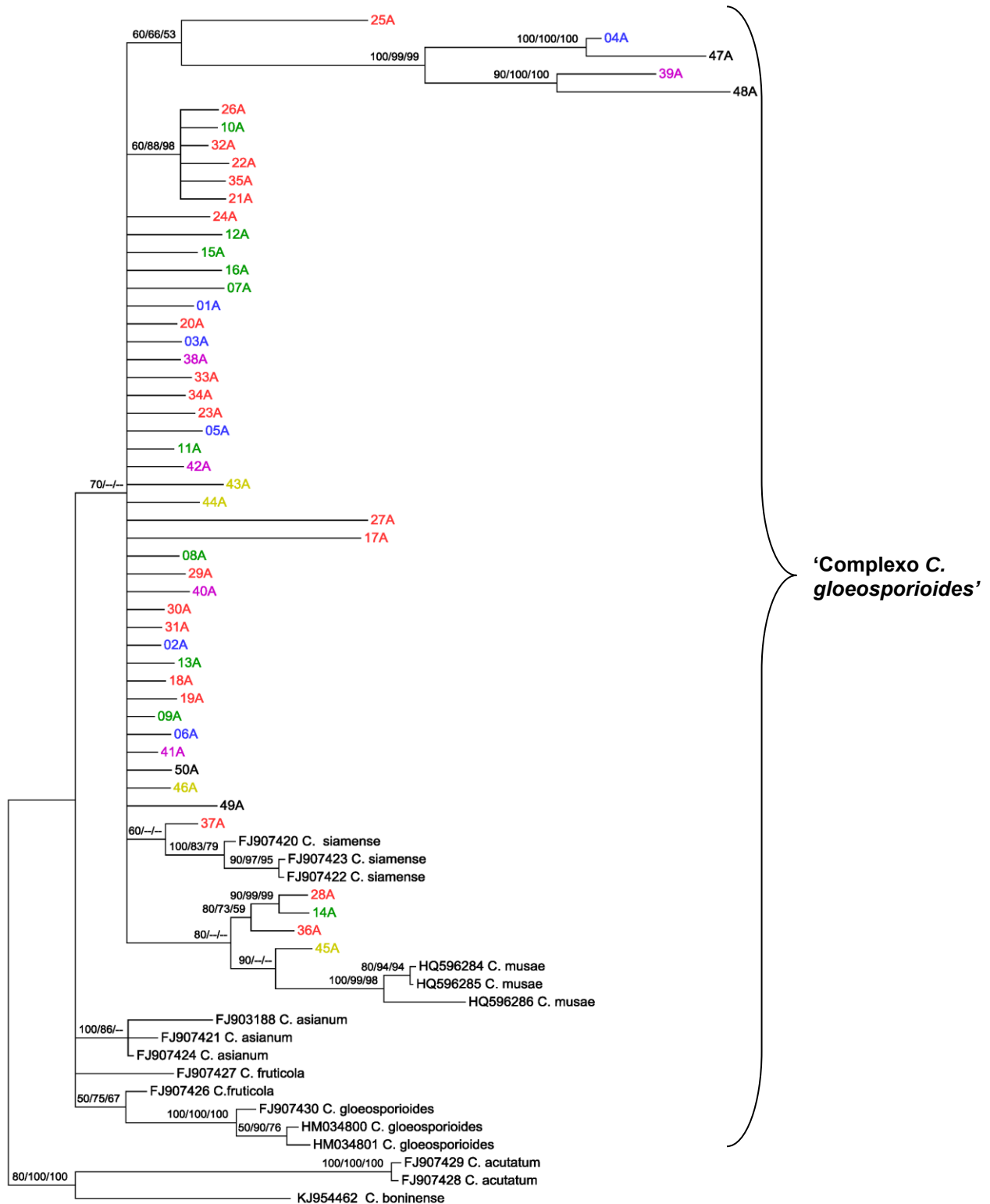


Figura 04. Árvore filogenética de inferência Bayesiana de 50 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de abacateiro. A árvore foi construída com base nas sequências das regiões ACT, TUB, ITS, GS, GAPDH e CAL. Os valores acima dos ramos representam a porcentagem da probabilidade posterior e *Bootstrap* das análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança.

De acordo com os resultados apresentados pode-se inferir que os isolados 14A, 28A, 36A, 45A pertencem à espécie *C. musae*, descartando-se, assim, a possibilidade de exclusividade da ocorrência de *C. musae* associado a sintomas de antracnose em banana, como mencionado na literatura (COUTO; MENEZES, 2004; ZAKARIA et al., 2009; ABD-ELSALAM et al., 2010). Os demais isolados não compuseram clados com espécies específicas dentro do 'complexo *C. gloeosporioides*', indicando a possibilidade desses isolados serem geneticamente distintos das espécies deste complexo. Sendo assim, não se descarta a possibilidade destes isolados constituírem novas espécies dentro do 'complexo *C. gloeosporioides*'.

De acordo com as análises não foi possível correlacionar os resultados encontrados com as variedades e regiões geográficas de coleta dos isolados. Todavia, pode-se inferir que a análise concatenada das regiões ITS1-5.8S-ITS2, ACT, GS, CL, GAPDH e da β -tubulina foram eficientes na identificação de duas espécies dentro dos isolados estudados.

2.4. CONCLUSÕES

- Existe diversidade morfocultural entre os isolados de *Colletotrichum* spp., associados a frutos de abacateiros com sintomas de antracnose.
- Os critérios morfoculturais abordados neste estudo não foram suficientes para distinguir espécies do gênero *Colletotrichum*.
- Os isolados de *Colletotrichum* spp. encontrados em frutos de abacateiros podem ser patógenos em banana, goiaba, manga e mamão.
- Além de *Colletotrichum musae* e *C. siamense*, aparentemente há duas espécies adicionais de *Colletotrichum* associadas aos sintomas de antracnose em abacate no estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. A.; ROSHDY, S.; AMIN, O. E.; RABANI, M. First morphogenetic identification of the fungal pathogen *Colletotrichum musa* (Phyllachoraceae) from imported bananas in Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 2335-2342, 2010.
- ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 9, p. 979-987, 1997.
- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003.
- AGRIANUAL 2012: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, p. 167, 2012.
- ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2015. Santa Cruz do Sul- RS: Editora Gazeta Santa Cruz, 104 p. 2015.
- AVILA-QUEZADA, G.; SILVA-ROJAS, H.V.; TELIZ-ORTIZ, D. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 1200, 2007.
- BONETT, L.P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R.G.A.; AQUINO, T.F.; BERNARDIWENZEL, J. Caracterização morfocultural e infecção cruzada de

Colletotrichum gloeosporioides agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência Guarapuava**, Guarapuava, v. 6, n. 3, p. 451-463, 2010.

BRAGANÇA, C. A. D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. 2013. 69 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2013.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes temperaturas e espectros de radiação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005, Santos. **Anais** São Paulo: SBM, p. 61. 2005.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.** 42, 225-226, 1939.

CHOI, K.J.; KIM, W.G.; KIM, H.G.; CHOI, H.W.; LEE, Y.K.; LEE, B.D.; LEE, S.Y.; HONG, S.K. Morphology, molecular phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum panacicola* causing anthracnose of Korean ginseng. **Plant Pathology**, London, v. 27, n.1, p. 1-7, 2011.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 406-412, 2004.

DORADO-PÉREZ, G. Prácticas generales de bioquímica y biología molecular. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba, España, 2012. Disponível em <<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/47%20SECUENCIACI%C3%93N%20DNA.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

EVANS, E.; NALAMPANG, S. **World, U.S. and Florida Avocado Situation and Outlook**. Food and Resource Economics Department document FE639. 2006. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/fe639>> Acesso em: 25 mar. 2009.

EWING, B.; GREEN, P: Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791, 1985.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GIBLIN, F.R.; COATES, L.M.; IRWIN, J.A.G. Pathogenic diversity of avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose and pepper spot in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 39, n. 1, p. 50-62, 2010.

GONZÁLEZ, A.F.R. **Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp, Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD**. 2007. 82 p. Monografía (Trabajo de grado em Microbiología Industrial) - Faculdade de Ciências, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007. Disponível em: <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>> Acesso em: 14 dez. 2015.

GREEN, P. **PHRAD documentation**. 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 01 jan 2016.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre. Bookman, 2005.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 147-182, 2009.

KLUGE, R.; SCARPARE FILHO, J.A.; JACOMINO, A.O.; PEIXOTO, C.P. **Distúrbios fisiológicos em frutos**. Piracicaba: FEALQ, 56 p. 2001.

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

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

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

MAIA, V. M.; SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L.; PUSCHMANN, R.; MOTA FILHO, V. J. G.; CECON, P. R. Tipos e intensidade de danos mecânicos em bananas 'prata-anã' ao longo da cadeia de comercialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 365-370, 2008.

MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; JACOMINO, A.P.; AMORIM, L. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado

atacadista de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 5-10, 2006.

MORAES, S. R. G.; TANAKA F. A. O.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guajava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal -SP, v. 35, n. 2, p. 657-664, 2013.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 26 (6): 135-1142, 2002.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 1991.

PEGG, K.G.; COATES, L.M.; KORSTEN, L.; HARDING, R.M. Foliar, fruit and soil diseases. In: WHILEY, A.W.; SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B.N. (Ed.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CAB International Press, p. 299-338. 2002.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças do abacateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Ceres, v. 2, cap. 44, p. 1-7. 2005.

PIMENTA, A.A. **Caracterização morfométrica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga**

(*Mangifera indica* L.). 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. Mrbayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19:1572–1574, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. Londres: CSHL Press. p.1448, 2001.

SANCHEZ, M. **Podridão preta do fruto do mamoeiro**. Dissertação de Mestrado. Brasília. Universidade de Brasília. 1990.

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

SILVA-ROJAS, H.V.; AVILA-QUEZADA, G. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 60, n. 5, p. 899-908, 2011.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and it Anomorph *Colletotrichum*. In BAYLEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum, biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. international, p. 1-26, 1992.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729, 2013.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 24:4876–4882, 1997.

TOZZE JÚNIOR, H. J. **Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico**. 2012. 124 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L., MASSOLA, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 270-280, 2015.

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

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

WEIR, B.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology** 73: 115–18, 2012.

ZAKARIA, L.; SAHAK, S.; ZAKARIA, M.; SALLEH, B. Characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. **Tropical Life Sciences Research**, Kedah, v. 20, p.119-125, 2009.

CAPÍTULO 3 - Caracterização morfo cultural e molecular de *Colletotrichum* spp. provenientes de bananas ‘prata’ e ‘nanica’ com sintomas de antracnose

RESUMO – O Brasil produz sete milhões de toneladas de banana, com participação de 6,9% da produção mundial. Embora o Brasil seja um importante produtor e consumidor, a bananicultura nacional enfrenta sérios problemas na fase de pós-colheita. Dentre as doenças, destaca-se a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum musae*. O presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas a banana, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies. Cinquenta isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de bananeiras ‘Prata’ e ‘Nanica’, provenientes de diferentes estados, foram submetidos às análises morfo cultural, patogenicidade cruzada e molecular. Na caracterização molecular foram sequenciadas regiões parciais dos genes da actina (ACT), glutamina sintase (GS), gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CL), β -tubulina (TUB) e ITS1-5.8S-ITS2. A diversidade morfo cultural observada nos isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de bananas com sintomas de antracnose não foi um critério capaz de distinguir espécies deste gênero. Os isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em banana podem ser patógenos também em manga, goiaba e abacate. A antracnose em banana não resulta de um único grupo monofilético, constituído por *C. musae*, sugerindo a existência de mais de uma espécie como patógeno desta cultura.

Palavras chaves: *Musa* sp., *Colletotrichum musae*; *Colletotrichum gloeosporioides*; pós-colheita.

3.1. INTRODUÇÃO

A banana ocupa primeira posição em produção mundial das frutas, com uma produção de 106,5 milhões de toneladas. O Brasil produz sete milhões de toneladas, com participação de 6,9% deste total (IBGE, 2014).

Embora o Brasil seja um importante produtor e consumidor, a bananicultura nacional enfrenta sérios problemas nas etapas de produção e pós-colheita, que limitam a sua inserção no mercado internacional, devido, basicamente, ao elevado consumo interno e às elevadas perdas na pós-colheita e na comercialização (MAIA et al., 2008).

Na fase de pós-colheita, dentre os problemas fitossanitários em banana, destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum musae* (Berk & Curtis) Arx. (COELHO et al., 2010). Esta doença representa o mais grave problema em todas as regiões produtoras do mundo (VENTURA; HINZ, 2002; CORDEIRO et al., 2005). A doença manifesta-se sob duas formas distintas, conforme o modo de infecção: infecção quiescente ou latente (fruto verde) e infecção não latente (fruto maduro). Os frutos infectados pelo fungo têm amadurecimento acelerado e, mesmo que a polpa não seja atingida, torna-se de aspecto indesejável para o consumo, inviabilizando a exportação (DEL PONTE, 2009). Os sintomas observados são lesões escuras e deprimidas, que com o progresso da doença e em condições ambientais favoráveis, como alta umidade, cobrem-se de frutificação rósea. Essas estruturas são os acérvulos, responsáveis pela produção e disseminação dos conídios (COUTO; MENEZES, 2004).

A diferenciação entre espécies de *Colletotrichum*, baseadas no hospedeiro de origem ou em sua gama de hospedeiros, pode não ser um critério confiável para fungos deste gênero, que podem infectar inúmeras espécies de plantas hospedeiras. Deste modo, diversos estudos buscam, por meio de ferramentas de pesquisa, caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum*, visando compreender a etiologia da antracnose, em diferentes hospedeiros (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR, 2007).

Os métodos convencionais para a identificação de espécies de *Colletotrichum* baseiam-se principalmente em diferenças morfológicas, como cor da colônia, tamanho e forma dos conídios, temperatura ótima, taxa de crescimento e presença

ou ausência de setas nos acérvulos (SMITH; BLACK, 1990; GUNNELL; GUBLER, 1992; SUTTON, 1992). No entanto, devido às influências ambientais sobre a estabilidade das características morfológicas e à existência de formas intermediárias, tais critérios, na maioria das situações, mostram-se insuficientes para uma diferenciação confiável entre espécies de *Colletotrichum* (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Em função disso, sobressai-se o emprego de técnicas moleculares associadas às características morfológicas e biológicas (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; LOPEZ, 2001; TOZZE JÚNIOR et al., 2004; ANDRADE et al., 2007).

Em trabalhos desenvolvidos com isolados de banana, oriundos de lesões de antracnose em frutos, com emprego de dados relativos às características fenotípicas e moleculares, verificou-se tratar de um grupo monofilético dentro do complexo "*C. gloeosporioides*", (PHOTITA et al., 2005; ZAKARIA et al., 2009; ABD-ELSALAM et al., 2010). O isolado da espécie-tipo descrita para *C. musae* foi perdido durante o processo de conservação no pericarpo de banana. Sendo assim, Su et al. (2011) em seu trabalho designaram um neótipo para *C. musae*. Segundo Udayanga et al. (2012), essa espécie apresenta alto grau de especificidade em relação ao gênero *Musa*. A análise de sequências de ácidos nucléicos é considerada a técnica mais confiável para a classificação de *Colletotrichum* (CROUCH et al., 2009; DAMM et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009; CAI et al., 2009). Dentre as regiões do genoma já empregadas nos estudos do gênero, a ITS é a que possui maior número de sequências depositadas. Assim, a análise filogenética utilizando dados desta região é uma ferramenta útil para uma identificação preliminar da espécie de *Colletotrichum* ou para colocá-lo em um complexo de espécie (CAI et al., 2009), porém, muitas vezes não é suficiente para discriminação das espécies, devido à falta de caracteres distintivos, o que resulta em árvores filogenéticas politômicas.

Em contrapartida ao apresentado, várias regiões do genoma de fungos do gênero *Colletotrichum* têm sido analisadas em conjunto com a ITS, com destaque para as de β -tubulina, Calmodulina, Glutamina sintetase, Actina e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (PRIHASTUTI et al., 2009). A viabilidade desta técnica para estudos taxonômicos de fungos do gênero *Colletotrichum* foi recentemente confirmada por Choi et al. (2011). Esses autores, ao caracterizarem isolados de *C. panacicola* de ginseng na Coreia, concluíram que essa espécie não poderia ser

distinguida de *C. higginsianum*, *C. destructivum* e *C. coccodes* por meio de características morfológicas, tampouco o poderia distinguir de *C. higginsianum* e *C. destructivum*, com análise das sequências da região ITS. Porém, uma árvore filogenética baseada em sequências combinadas de três genes (Actina, Glutamina sintetase e α -elongase) proveu variabilidade suficiente para delimitar *C. panacicola* das demais espécies de *Colletotrichum* analisadas.

Dessa forma, estudos dessa natureza, e, principalmente, a taxonomia dos agentes causais da antracnose em banana são essenciais para uma melhor compreensão do patossistema, da epidemiologia da doença e, por conseguinte, das melhorias na definição de estratégias de controle. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas à banana, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Foram obtidos 50 isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de bananeiras ‘Prata’ e ‘Nanica’, provenientes dos estados: Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Tabela 1).

Para o isolamento, os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 2,5%, por três minutos. O isolamento deu-se de forma direta, mediante remoção superficial de esporos existentes em lesões típicas de antracnose, empregando-se agulha previamente flambada. Em seguida, a massa de esporos foi plaqueada em meio batata-dextrose-ágar (BDA) contido em placas de Petri, e mantidas em estufas para B.O.D. a 25 °C $\pm$ 1 °C, durante o período de crescimento das colônias fúngicas.

Tabela 1. Procedência, variedades e identificação dos Isolados de *Colletotrichum* provenientes de bananeiras utilizados na caracterização morfofocultural e molecular.

Identificação	Localidade	Variedade
1B	Bahia	Nanica
2B		
3B		
4B		
5B		
6B	Espírito Santo	Nanica
7B		
8B		
9B		
10B		
11B	Jaboticabal-SP	Nanica
12B		
13B		
14B		
15B		
16B	Minas Gerais	Nanica
17B		
18B		Prata
19B		
20B		
21B	Pitangueiras-SP	Nanica
22B		
23B		
24B	Registro-SP	Nanica
25B		
26B		
27B		
28B		
29B		
30B		Prata
31B		
32B		
33B		
34B		
35B		
36B	Rio Grande do Norte	Nanica
37B		
38B		
39B		
40B		
41B	Rio Grande do Sul	Nanica
42B		
43B		
44B		
45B		
46B	Santa Catarina	Nanica
47B		
48B		
49B		
50B		

3.2.2. Caracterização morfocultural

Para a análise morfocultural adotou-se a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.2.2, com exceção da Tabela 2, referente à escala de notas de coloração das colônias, a qual foi modificada, sendo adotada o critério de coloração apresentada pelos isolados deste estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Grupos de classificação referentes à coloração de colônias de *Colletotrichum* spp. em meio batata-dextrose-agar.

Escala	Coloração das Colônias	
	Frente da placa de Petri	Reverso da placa de Petri
1	Branca	Branca
2	Branca acinzentado	Verde escuro
3	Salmão	Salmão
4	Branco a salmão, com pontuações escura	Salmão, com pontuações escura
5	Branco com pontuações escura	Branco, com pontuações verde escuras
6	Salmão, com pontuações salmão	Salmão, com pontuações salmão

3.2.3. Teste de patogenicidade cruzada

Para os testes de patogenicidade cruzada foi utilizada a metodologia descrita no Capítulo 2, no item 2.2.3.

3.2.4. Análise dos dados morfocultural e patogenicidade cruzada

Seguiu-se a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.2.4.

3.2.5. Caracterização molecular

Na caracterização molecular foi utilizada a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, do item 2.2.5.1 ao item 2.2.5.3, com exceção da região da actina (ACT) que, embora tenham sido sequenciadas, após a análise individual, esta região foi excluída da análise multilocus por não transmitir o mesmo sinal filogenético.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Caracterização morfocultural

Os dados relativos ao índice de velocidade de crescimento micelial, em meio BDA, além das características culturais que foram analisadas e agrupadas, encontram-se apresentados na Tabela 3. Os isolados de *Colletotrichum* spp. diferiram quanto ao IVCM obtidos no decorrer de quatro dias de avaliação. A média de crescimento foi 5,07 mm.dia⁻¹, e o isolado que apresentou o maior IVCM foi 15B (6,60 mm.dia⁻¹), enquanto o menor valor de crescimento foi observado para o isolado 17B, com 2,73 mm.dia⁻¹.

Na caracterização cultural foi possível separar os isolados em seis grupos de coloração, que variaram de branca a salmão e alguns isolados apresentaram cor branca com nuances cinzas-escuras, enquanto que outros demonstraram pontuações escuras ou salmão. Da mesma forma, foi observado o reverso da placa (Figura 1). Houve predominância de colônias de coloração branca/salmão, com topografia aérea rala e abundante presença de massas de conídios de cor laranja. As colônias desenvolveram micélios em setores regulares, que acompanharam o crescimento radial normal da colônia. A formação dos setores miceliais apareceu em alguns isolados, independente da região de origem ou variedades. Geralmente, foi observado um único setor por colônia (placa), com exceção para o isolado 18B, com até três setores formados. Estes resultados foram convergentes aos encontrados por Photita et al. (2003), que verificaram em seus isolados a presença de micélio aéreo ralo e de coloração branca, porém com abundante massa de conídios. Resultados semelhantes foram também relatados por Zakaria et al. (2009) e Abd-Elsalam et al. (2010), onde observaram, inicialmente, colônias de cor branca, tornando-se alaranjada com a idade. Por sua vez, Couto & Menezes (2004) detectaram colônias com a coloração branca, cinza-clara e cinza-escura, com reverso similar, em isolados de *C. musae*, provenientes de seis municípios do Estado de Pernambuco.

Tabela 3. Classificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de bananeira quanto a coloração das colônias, teste de patogenicidade, presença de setor, morfometria dos conídios e índice de velocidade de crescimento micelial.

Isolado	Coloração	Setor	IVCM (cm dia ⁻¹)	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Relação C/L	Teste Patogenicidade Cruzada				
							Abacate	Banana	Goiaba	Mamão	Manga
1B	5	+	1,88	11,60 e	4,63 a	2,50 d	-	+	+	-	-
2B	4	+	2,13	10,90 f	4,91 a	2,21 e	+	+	+	-	+
3B	5	+	2,13	11,31 e	4,76 a	2,37 e	-	+	+	-	-
4B	2	-	2,13	9,69 g	4,41 b	2,19 e	-	+	+	-	-
5B	4	-	2,13	12,18 c	4,15 c	2,93 c	-	+	+	-	-
6B	2	-	2,13	10,70 f	4,40 b	2,43 e	-	+	+	-	-
7B	4	-	1,70	11,90 d	4,16 c	2,86 c	-	+	+	-	-
8B	4	-	2,05	12,25 c	4,19 c	2,92 c	+	+	-	-	-
9B	1	-	1,81	12,29 c	4,68 a	2,62 d	+	+	-	-	-
10B	5	-	1,77	11,35 e	4,73 a	2,39 e	+	+	+	-	+
11B	1	-	1,35	12,30 c	4,67 a	2,63 d	+	+	-	-	-
12B	2	-	1,34	12,60 a	4,16 c	3,02 b	+	+	+	-	+
13B	2	-	1,49	12,61 a	4,13 c	3,05 b	-	+	+	-	+
14B	4	-	1,53	12,00 d	4,98 a	2,40 e	-	+	+	-	+
15B	4	-	2,13	11,90 d	4,18 c	2,84 c	-	+	+	-	+
16B	2	-	1,21	10,70 f	4,40 b	2,43 e	-	+	+	-	-
17B	2	-	1,20	12,53 b	4,13 c	3,03 b	-	+	-	-	+
18B	2	+	1,09	12,61 a	4,21 c	2,99 b	-	+	+	-	+
19B	4	-	2,13	12,86 a	4,64 a	2,77 c	-	+	-	-	+
20B	4	-	2,15	10,87 f	4,86 a	2,23 e	+	+	+	-	-
21B	4	-	2,13	11,36 e	3,75 d	3,02 b	+	+	+	-	-
22B	4	-	1,69	12,19 c	4,25 c	2,86 c	-	+	-	-	-
23B	4	-	1,79	12,28 c	4,23 c	2,90 c	-	+	-	-	-
24B	5	-	1,63	11,50 e	4,58 b	2,51 d	+	+	+	-	-
25B	5	-	1,85	11,38 e	4,32 c	2,63 d	+	+	+	-	-
26B	4	-	1,78	11,47 e	3,68 d	3,11 b	-	+	+	-	+
27B	4	-	1,68	12,88 a	4,64 a	2,77 c	-	+	+	-	-
28B	4	-	1,73	11,00 f	4,98 a	2,20 e	-	+	+	-	-
29B	4	-	1,79	11,20 e	4,86 a	2,30 e	-	+	+	-	-
30B	3	-	1,70	12,41 b	4,65 a	2,66 d	+	+	+	-	-
31B	1	-	1,75	12,31 c	4,71 a	2,61 d	+	+	+	-	-
32B	4	-	2,13	11,36 e	3,69 d	3,07 b	+	+	+	-	-
33B	3	-	1,75	12,38 b	4,67 d	2,65 a	+	+	+	-	-
34B	4	-	1,88	12,23 c	4,16 c	2,93 c	+	+	+	-	+
35B	3	-	2,13	12,44 b	4,69 a	2,65 d	+	+	+	-	+
36B	4	-	2,13	12,26 c	4,38 b	2,79 c	+	+	+	-	+
37B	4	-	2,13	12,40 b	4,23 c	2,93 c	+	+	+	-	+
38B	3	-	1,76	12,46 b	4,43 b	2,81 c	+	+	+	-	+
39B	3	-	1,81	12,54 b	4,18 c	3,00 b	+	+	+	-	+
40B	4	-	1,85	12,43 b	4,38 b	2,83 c	+	+	+	-	+
41B	3	-	1,75	12,62 a	4,46 b	2,82 c	+	+	-	-	-
42B	3	-	1,70	12,43 b	4,42 b	2,81 c	-	+	-	-	-
43B	3	-	1,55	12,51 b	4,49 b	2,78 c	-	+	-	-	-
44B	3	-	1,19	12,47 b	4,65 a	2,68 d	-	+	-	-	-
45B	3	-	1,66	12,43 b	4,51 b	2,75 c	-	+	+	-	+
46B	2	-	2,10	12,65 a	4,21 c	3,00 b	-	+	+	-	+
47B	1	-	1,90	12,38 b	4,35 c	2,84 c	-	+	+	-	+
48B	2	-	1,98	10,76 f	4,31 c	2,49 d	-	+	+	-	+
49B	2	-	1,50	10,84 f	4,56 b	2,37 e	-	+	+	-	+
50B	2	-	1,45	10,74 f	4,42 b	2,42 e	-	+	+	-	+

*C: média do comprimento de 50 conídios; *L: média da largura de 50 conídio; *C/L: relação comprimento/largura; *IVCM: índice velocidade do crescimento micelial. **Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

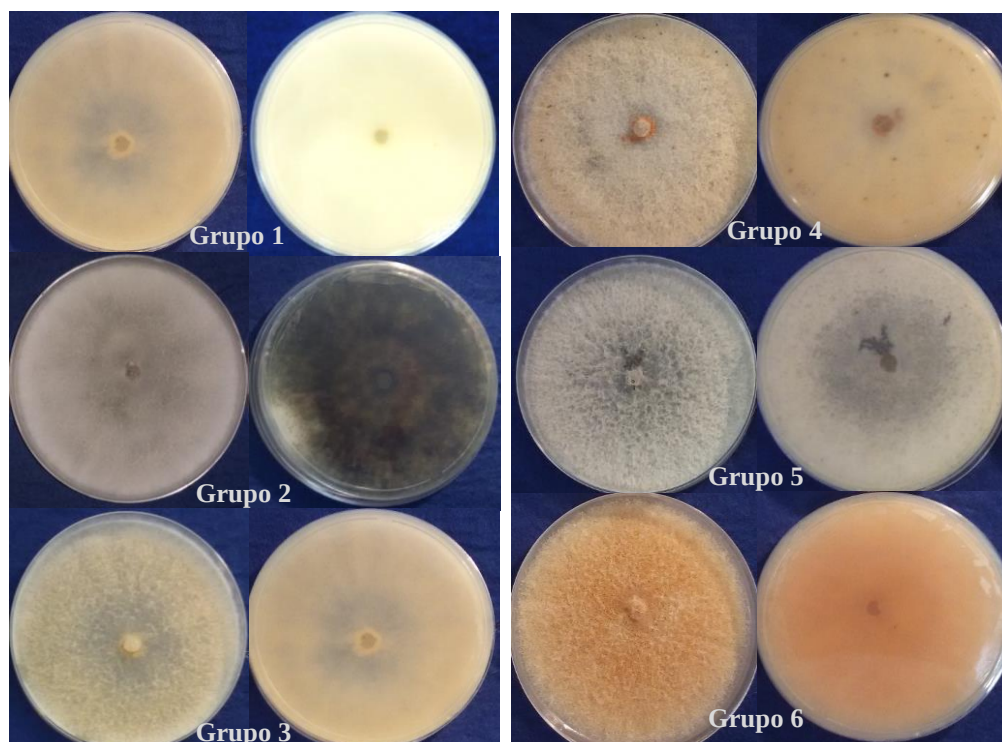


Figura 1. Vista parcial das colônias de *Colletotrichum* spp. (frente e reverso da placa de Petri) provenientes de bananas 'Nanica' e 'Prata'. As descrições dos grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 estão apresentadas na Tabela 2.

Em relação ao comprimento e largura dos conídios, a amplitude das médias de comprimento foram 10,7 e 12,88 μm , enquanto que para a largura, os valores foram 3,75 e 4,98 μm , e a relação C/L, 2,19 e 3,11, com média geral ($n = 2500$) de 11,9; 4,42 e 2,7 μm , para comprimento, largura e relação C/L, respectivamente. Esses resultados são condizentes aos apresentados por Sutton (1992), Couto; Menezes (2004), Photita et al. (2005), Zakaria et al. (2009) e Abd-Elsalam et al., (2010). De acordo com a classificação proposta por Tozze Júnior (2007), não foi possível estabelecer um agrupamento quanto ao formato de conídios, uma vez que um único isolado apresentou diferentes formatos (Figura 2). Segundo Sutton (1992) e Freeman et al. (1998), muitas das características morfológicas das espécies do gênero *Colletotrichum* são extremamente plásticas e variáveis, dependendo principalmente das condições culturais e ambientais, que, por sua vez, dificilmente são padronizadas, produzindo formas intermediárias de conídios e variando consideravelmente o aspecto da colônia.

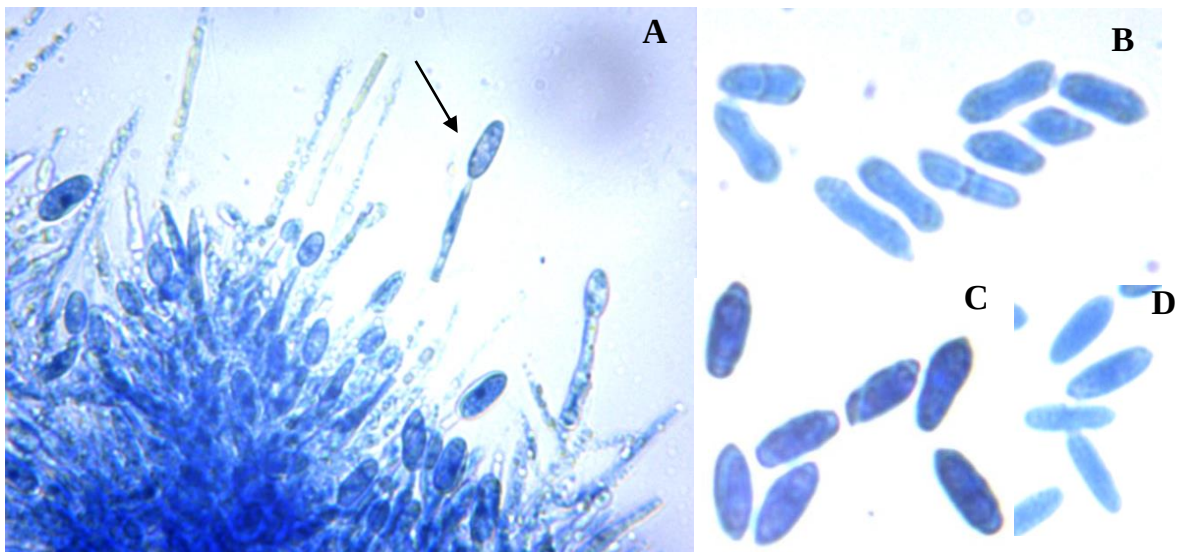


Figura 2. Vista parcial de estruturas do fungo do gênero *Colletotrichum*. **A:** hifas, conídios e conidióforos; **B, C e D:** conídios de diferentes formatos.

3.3.2. Patogenicidade cruzada

No teste de patogenicidade, todos os isolados foram patogênicos em frutos de bananas, induzindo à produção de sintomas típicos da antracnose. Esses sintomas mostravam-se na forma de lesões necróticas, de coloração marrom-escura, que se tornaram deprimidas conforme a colonização do tecido. Posteriormente, as lesões evidenciaram o sinal do fitopatógeno, com a formação de pequenas pontuações (acérvulos), com a presença de massas de conídios, de coloração alaranjada (Figura 3). Para goiaba, 78% dos isolados causaram sintomas de antracnose, enquanto que, para abacate e manga as porcentagens de frutos com sintomas foram de 42 e 46, respectivamente. Em frutos de mamão, nenhum dos isolados resultou na produção de sintomas de antracnose. Sendo assim, os isolados provenientes de frutos com sintomas de antracnose não apresentam especificidade quanto ao hospedeiro, discordando de Udayanga et al. (2012), que em seu trabalho relata alto grau de especificidade deste patógeno ao gênero *Musa*.



Figura 3. Sintomas típicos de antracnose, com lesões escuras e presença de massa condial, de cor salmão, em fruto de banana 'Prata'.

3.3.3. Análise de agrupamento das características morfo culturais e teste de patogenicidade

A análise conjunta das características morfo culturais e dos testes de patogenicidade cruzada, por meio do agrupamento pelo método hierárquico, resultou na formação de seis grupos de isolados, caracterizados como: grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV, grupo V e grupo VI (Figura 4). Estes grupos estão representados na Figura 4, onde, por meio da análise de componentes principais, é possível visualizar os elementos mais discriminantes.

O grupo I foi composto por isolados que se enquadraram na escala de coloração de nota 4, com exceção do isolado 39B, o qual apresentou características semelhantes àsquelas de nota 3. Em relação ao teste patogenicidade, este grupo foi o que exibiu maior diversidade patogênica, sendo patogênico em frutos de abacate, banana, goiaba e manga, enquanto que o grupo IV, contrariamente, foi o que apresentou menor diversidade, sendo patogênico apenas para frutos de goiaba e

banana, embora o isolado 19B tenha, também, sido patogênico em frutos de banana e manga. Já o grupo III foi composto, em sua maioria, por isolados que demonstraram patogenicidade em frutos de abacate.

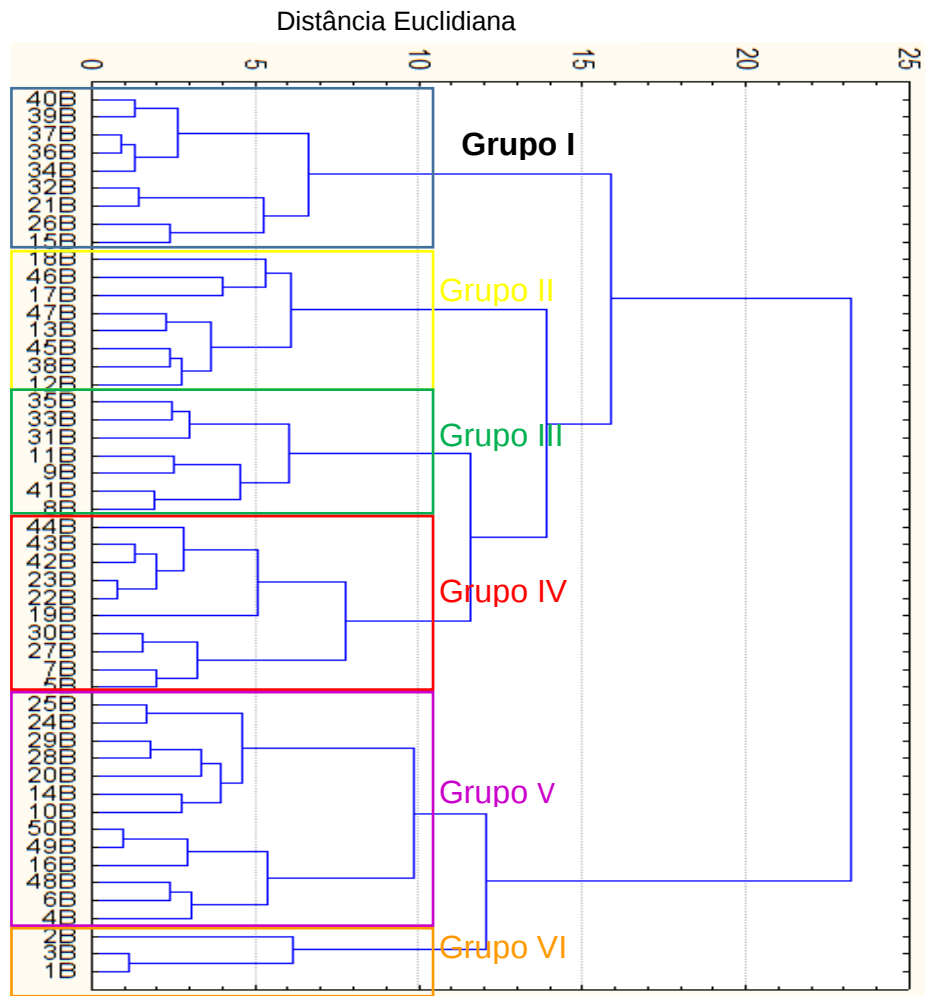


Figura 4. Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, presença ou ausência de setores, IVCM, morfometria dos conídios e comportamento patogênico dos isolados.

A análise dos componentes principais possibilitou visualizar as características mais discriminantes, a qual deu origem ao agrupamento (Figura 5). Os isolados que exibiram características mais semelhantes em relação a morfologia dos conídios (comprimento e relação C/L) foram agrupados no grupo II, enquanto que aqueles

que contavam com a presença de setor compuseram o grupo VI. O grupo V foi o que se mostrou mais polimórficos, dificultando a caracterização deste grupo.

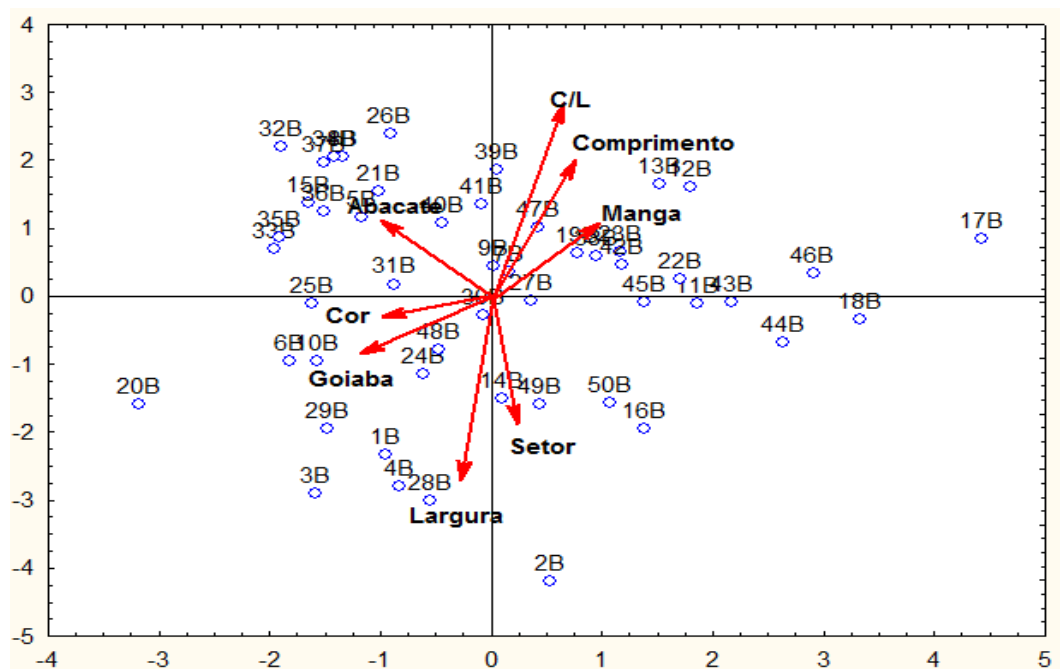


Figura 5. Biplot com representação da projeção de variáveis morfológicas representadas por: coloração das colônias, presença ou ausência de setores, IVCM, morfometria dos conídios e comportamento patogênico dos isolados, nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com a discriminação dos 50 isolados de *Colletotrichum* spp.

Embora os aspectos morfoculturais tenham propiciado à geração de um agrupamento, de um modo geral, houve elevado polimorfismo entre os isolados e/ou espécies de *Colletotrichum* spp. dentro de um mesmo grupo. Em alguns isolados avaliados, mesmo mediante emprego de sub-colônias, oriundas de uma colônia em comum, foi normal a constatação de culturas com características muito diversas àquela original. Tais dados demonstraram, assim, que as características morfoculturais dos isolados avaliados não foram suficientes para discriminar espécies de *Colletotrichum*, divergindo de outros investigadores (ANDRADE et al., 2007; MEHTA, MEHTA 2010), e mostrando-se convergentes parcialmente aos resultados obtidos por Su et al. (2011) e Cai et al. (2009), os quais tornaram evidente

a necessidade do emprego conjunto de características culturais e morfométricas, associadas a estudos moleculares, quando do estudo de taxonomia de fungos do gênero *Colletotrichum*.

3.3.4. Caracterização molecular

A análise multilocus concatenada resultou numa árvore filogenética composta por 50 isolados de *Colletotrichum* spp. e 16 sequências obtidas no GeneBank para determinação do índice de similaridade. Na Figura 6 pode-se observar a formação de seis grupos distintos: Grupo I, II e IV - composto por isolados de diferentes localidades; Grupo V e VI – formados por sequências de espécies do ‘Complexo *C. gloeosporioides*’ obtidas do GeneBank e Grupo III - constituído tanto de sequências de *C. musae* retiradas do GeneBank, quanto sequências de isolados de *Colletotrichum* provenientes de frutos com sintomas de antracnose.

O grupo III indica que os isolados 4B, 10B, 14B, 16B, 17B, 19B, 20B, 23B, 25B, 26B, 27B, 28B, 30B, 31B, 32B, 33B, 34B e 35B apresentam maior proximidade filogenética a espécie *C. musae*, com valores de inferência Bayesiana e porcentagens de Bootstrap para MP e MV iguais a 80, 71 e 82, respectivamente, sugerindo que estes isolados pertençam a esta espécie. De acordo com Weir et al. (2012), quanto maior o valor de inferência Bayesiana, maior será a confiabilidade na topologia do clado e menor a distância de ramificação do nó que estabelece a relação da distância genética dos isolados com as espécies do GeneBank.

Embora os valores de inferência Bayesiana dos grupos I, II e IV não tenham sido próximos a 100, não se descarta a possibilidade, de que tais isolados destes grupos constituam-se em espécies novas de patógeno associados a sintomas de antracnose em frutos de banana, nas condições brasileiras. Tais resultados são semelhantes aos obtidos por Prihastuti et al. (2009) e Phoulivong et al. (2010), que fizeram distinção de espécies de *Colletotrichum* dentro do ‘Complexo *C. gloeosporioides*’, mediante o emprego da análise multilocus.

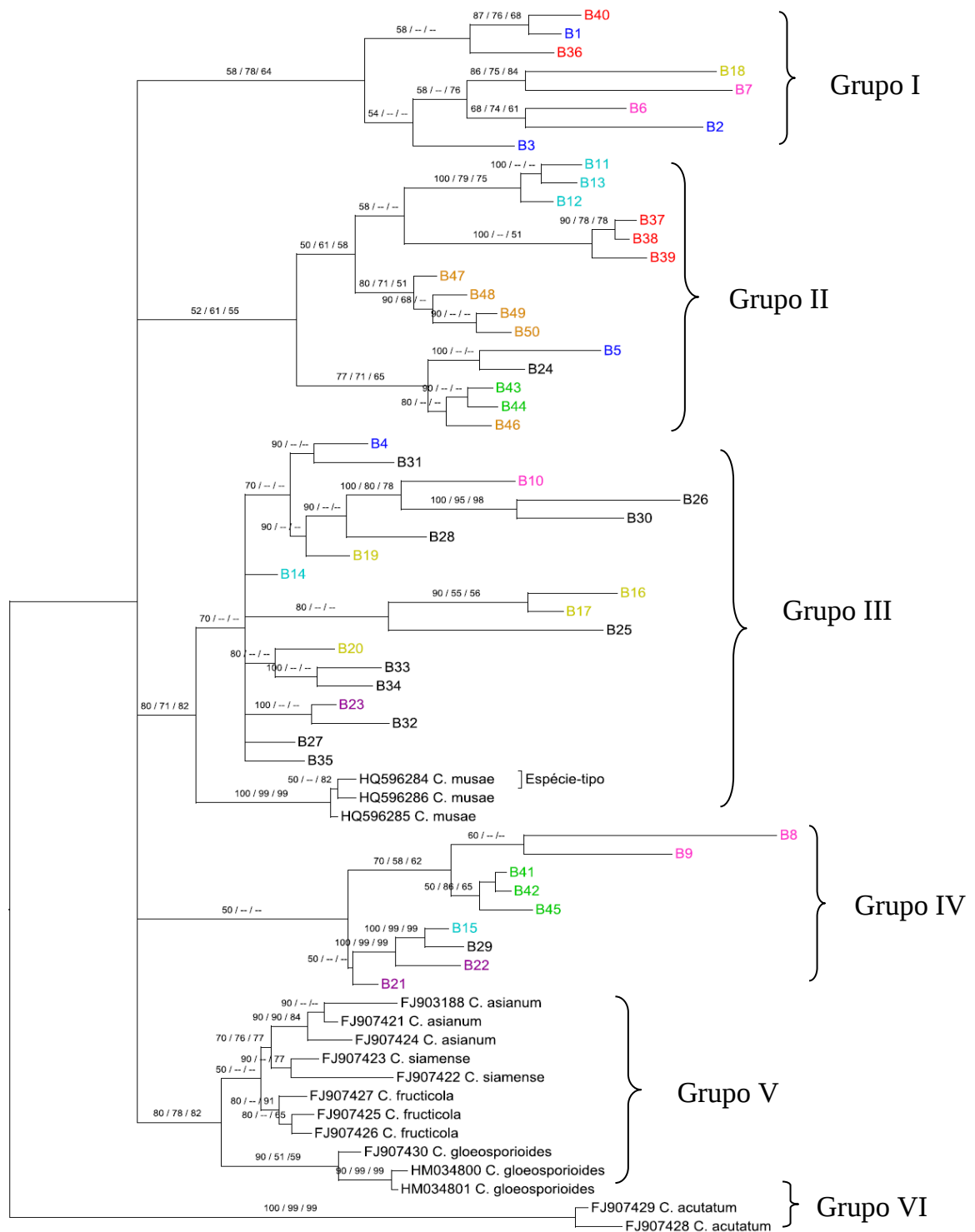


Figura 6. Árvore filogenética de inferência Bayesiana dos 50 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de banana. A árvore foi construída com base nas sequências das regiões TUB, ITS, GS, GAPDH e CAL. Os valores acima dos ramos representam a porcentagem da probabilidade posterior e Bootstrap da Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança.

Com base nas inferências filogenéticas apresentadas, os isolados provenientes de frutos de banana com sintomas de antracnose não formaram um grupo monofilético com as sequências de *C. musae*, divergindo parcialmente do trabalho de Su et al. (2011), descartando-se, assim, a possibilidade de exclusividade da ocorrência de *C. musae* associado a sintomas de antracnose, como mencionado na literatura brasileira (COUTO; MENEZES, 2004; ZAKARIA et al., 2009; ABD-ELSALAM et al., 2010).

3.4. CONCLUSÕES

- A diversidade morfo cultural observada nos isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de bananas com sintomas de antracnose, não foi um critério capaz de distinguir espécies deste gênero.
- Os isolados de *Colletotrichum* spp. encontrados na banana podem ser patógenos também em manga, goiaba e abacate.
- O agente causal da antracnose em banana não é constituído por um único grupo monofilético, *C. musae*, sugerindo a existência de mais de uma espécie como patógeno desta cultura.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. A.; ROSHDY, S.; AMIN, O. E.; RABANI, M. First morphogenetic identification of the fungal pathogen *Colletotrichum musa* (Phyllachoraceae) from imported bananas in Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 2335-2342, 2010.
- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003.
- ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ARX, J. A. von. Die arten der gattung *Colletotrichum* Corda. **Journal of Phytopathology**, Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, v. 29, n. 4, p. 413-468, 1957.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E. H. C; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Divers** 39:183–204, 2009.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 91: 553–556, 1999.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 42, 225-226, 1939.

CHOI, K.J.; KIM, W.G.; KIM, H.G.; CHOI, H.W.; LEE, Y.K.; LEE, B.D.; LEE, S.Y.; HONG, S.K. Morphology, molecular phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum panacicola* causing anthracnose of Korean ginseng. **Plant Pathology**, London, v. 27, n.1, p. 1-7, 2011.

COELHO, A. F. S.; DIAS, M. S. C.; RODRIGUES, M. L. M.; LEAL, P. A. M. Controle pós-colheita da antracnose da banana-prata anã tratada com fungicidas e mantida sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 1004-1008, 2010.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 406-412, 2004.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5, p. 648-656, 2009.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 45-87, 2009.

DEL PONTE, E. M. (Ed.). **Fitopatologia.net** - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. 2009. Disponível em: Acesso em: 10 out. 2015.

EMBRAPA. Sistemas de produção 4. **Sistema de Produção da Bananeira Irrigada**. 2. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro, 212p, 1997.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 39:783-791, 1985.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GUNNELL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**. 84(2):157–165, 1992.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre. Bookman, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Prod. agric., Rio de Janeiro, v. 37, p.1-91, 2014.

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

LOPES, G. M. B.; NASCIMENTO, S. M.; SILVA JUNIOR, J. F.; GONÇALVES, W. M. **Difusão de tecnologia para o sistema produtivo de Banana na Zona da Mata Norte de Pernambuco: a educação rural como eixo estratégico**. Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 51 p. (IPA. Documentos, 29), 2002.

MAIA, V. M.; SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L.; PUSCHMANN, R.; MOTA FILHO, V. J. G.; CECON, P. R. Tipos e intensidade de danos mecânicos em bananas 'prata-anã' ao longo da cadeia de comercialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 365-370, 2008.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

MORAES, S. R. G.; TANAKA F. A. O.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guajava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 35, n. 2, p. 657-664, 2013.

PHOTITA, W.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Saprobitic fungi on dead wild banana. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 85, n. 1, p. 345-356, 2003.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; ABD-ELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity** 44:33-43, 2010.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN H., MCKENZIE, E.H.C.; HY, DE K.D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity** 39:89–109, 2009.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. Mrbayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19:1572–1574, 2003.

SANCHEZ, M. **Podridão preta do fruto do mamoeiro**. Dissertação de Mestrado. Brasília. Universidade de Brasília. 1990.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 1 p. 69-76, 1990.

SU, Y. Y.; NOIREUNG, P.; LIU, F.; HYDE, K. D.; MOSLEM, M. A. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. **Mycoscience** 52:376–382, 2011.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and it Anomorph *Colletotrichum*. In BAYLEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum, biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. international, p. 1-26, 1992.

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

UDAYANGA, D.; LIU, X.Z.; CROUS, P.W.; MCKENZIE, E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (Phomopsis). **Fungal Diversity** 56:157–171, 2012.

VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIN, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras.** Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda., v. 2, p. 839-938, 2002.

WEIR, B.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology** 73: 115–18, 2012.

ZAKARIA, L.; SAHAK, S.; ZAKARIA, M.; SALLEH, B. Characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. **Tropical Life Sciences Research**, Kedah, v. 20, p.119-125, 2009.

ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CAPÍTULO 4 – Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de goiabeira com sintomas de antracnose

RESUMO – O Brasil, com uma produção média de 345,3 mil toneladas de goiaba por ano, exportou mais de seis mil toneladas da fruta em 2014, sendo o terceiro maior produtor mundial. O estado de São Paulo é o maior produtor do país, com uma participação de 125,5 mil toneladas. Em meio aos vários entraves que afetam a cultura, a antracnose é um dos mais importantes. Esta doença pode causar danos severos na maturação e pós-colheita. O presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas à goiaba, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas. Deste modo, cinquenta isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de goiabeiras, provenientes de diferentes municípios, foram submetidos às análises morfo cultural, molecular e patogenicidade cruzada. Na caracterização molecular foram sequenciadas regiões parciais dos genes da actina (ACT), glutamina sintase (GS), gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CL), β -tubulina (TUB) e ITS1-5.8S-ITS2. A caracterização cultural e morfológicas não se mostrou em uma alternativa confiável para a identificação de espécies de *Colletotrichum*. Os isolados encontrados em frutos de goiabeiras podem ser patógenos também em abacate, banana, manga e mamão, demonstrando baixa especificidade. Além de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, *C. siamense* e *C. musae* são também patógenos responsáveis por sintomas de antracnose em frutos de goiaba. Não foi observada relação entre origem geográfica e hospedeiro (variedade) entre os 50 isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados.

Palavras chave: *Psidium guajava*, *Colletotrichum musae*; *Colletotrichum siamense*; pós colheita.

4.1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de goiaba (*Psidium guajava*) concentra-se principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste, o que representa 46,7 e 42,2%, respectivamente, da produção nacional. O estado de São Paulo é o maior produtor, com uma participação de 125,5 mil toneladas, seguido por Pernambuco (107,2 mil t), Minas Gerais (15,9 mil toneladas), Ceará (12,6 mil toneladas) e Rio de Janeiro (11,7 mil toneladas) (IBGE, 2014).

A goiaba ocupa posição de destaque entre as frutas tropicais e subtropicais, já que apresenta elevados teores de vitaminas C e A, e teores satisfatórios de vitaminas do complexo B, principalmente tiamina (B1), riboflavina (B2) e niacina. Os elevados teores de fibra, proteínas, açúcares totais e de elementos minerais, fazem da goiaba uma das mais completas e equilibradas frutas no que diz respeito a valor nutritivo (PEREIRA, 1995; MANICA et al., 1998).

No estado de São Paulo, uma grande parcela dos frutos de goiaba produzidos é destinada à industrialização. Entretanto, um crescimento significativo tem sido observado no mercado de frutas *in natura* (TOKAIRIN; CAPPELLO; SPOSITO, 2014). A goiaba é uma fruta altamente perecível quando comercializada *in natura* e exige uma rápida colocação no mercado. O incremento do consumo da goiaba *in natura*, nos principais mercados consumidores do país, está condicionado à melhoria no nível de qualidade do produto.

Em meio às várias doenças que afetam a cultura, a antracnose é uma das mais importantes, pois pode causar danos severos na maturação e pós-colheita. Nos frutos aparecem pequenas lesões deprimidas, encharcadas, de coloração marrom, principalmente em locais danificados por insetos. As lesões são de coloração marrom-clara que, com o tempo, crescem e ficam mais deprimidas, chegando a atingir mais de 1,5 cm em diâmetro. Em local com alta umidade, uma massa de esporos de cor róseo-avermelhada pode desenvolver sobre o centro de lesão (JUNQUEIRA et al., 2001; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005; LIM; MANICOM, 2003).

Fungos do gênero *Colletotrichum* possuem a habilidade de causar infecção latente ou quiescente. Além disso, o micélio permanece viável por longo período de tempo em sementes infectadas, restos culturais e frutos, manifestando-se logo que

as condições se tornarem favoráveis para o seu desenvolvimento, o tornando um sério problema também na pós-colheita (SUTTON, 1992).

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz & Sacc. (s. lat.) foi, por muito tempo, considerado o único agente causal da antracnose em goiabeiras (JUNQUEIRA; COSTA., 2002). No entanto, Peres et al. (2002) identificaram *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds associado a lesões de antracnose em goiaba.

Há, segundo a literatura, cerca de 900 espécies descritas ou transferidas para o gênero *Colletotrichum*, o que faz com que sua taxonomia seja muito complexa. Somente para a espécie *C. gloeosporioides* são citadas cerca de 600 sinónimas (VON ARX, 1957; BAILEY et al., 1992).

Diversos autores utilizaram caracteres morfoculturais para identificação de espécies de *Colletotrichum*. Goes e Kimati (1997) agruparam e identificaram espécies de *Colletotrichum* associadas a citros. Os isolados que apresentaram colônias de coloração cinza, conídios ligeiramente maiores e crescimento rápido em meio de cultura foi classificado como *C. gloeosporioides*, ao passo que os isolados que apresentaram colônias de coloração alaranjada, conídios menores e crescimento mais lento, foi classificado como *C. acutatum*. Esses autores também verificaram que somente os isolados de *C. acutatum* reproduziram os sintomas de queda prematura dos frutos.

Bernstein et al. (1995) puderam separar 72 isolados de *Colletotrichum* provenientes de pêssago, maçã, morango e outros hospedeiros, em dois grupos por meio de características morfológicas e culturais. O grupo que apresentou colônias de coloração rosada a alaranjada foi identificado como sendo *C. acutatum* e apresentou conídios com formato fusiforme. Já o outro grupo de isolados apresentou colônias acinzentadas, conídios com extremidades arredondadas, identificado como *C. gloeosporioides*.

Embora os critérios morfoculturais tenham discriminado espécies do gênero *Colletotrichum*, não raras vezes, geravam confusões de interpretações que dificultava a identificação. Essas dificuldades encontradas nas identificações das espécies de *Colletotrichum* com base em critérios clássicos de taxonomia estão relacionadas à grande variabilidade desse fungo em diferentes condições ambientais

(MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992; SUTTON, 1992; WALLER, 1992). Em diversos casos, encontra-se uma grande variabilidade entre isolados identificados dentro da mesma espécie (ADASKAVEG; HARTIN, 1997; ADASKAVEG; FORSTER, 2000; LOPEZ, 2001; MENEZES, 2002; TOZZE JÚNIOR, 2007).

Atualmente, com o advento de técnicas moleculares mais sensíveis, juntamente com dados morfo culturais, testes de patogenicidade, grupos de compatibilidade vegetativa e possível presença do teleomorfo passaram a ser caracteres fundamentais para a revisão e descrição desses táxons (SMITH; BLACK, 1990; SUTTON, 1992; GUNNEL; GUBLER, 1992; TANAKA; PASSOS, 1998; FERNANDES et al., 2002; TOZZE JÚNIOR et al., 2006). Em estudo envolvendo espécies de *Colletotrichum* spp. associadas ao cafeeiro na Colômbia, a análise filogenética conjunta de sequências das regiões ITS e β -tubulina demonstrou ser mais confiável que a análise separada desses genes (GONZÁLEZ, 2007). Hyde et al. (2009), tendo como base critérios morfológicos associados à análise de sequência de múltiplos genes sugeriram a existência de 66 espécies do gênero *Colletotrichum*.

Em detrimento a problemática supracitada, estudos de caracterização baseados na combinação de métodos convencionais e técnicas moleculares são fundamentais para a correta identificação e conhecimento das relações filogenéticas existente entre isolados de um determinado patógeno (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; LOPEZ, 2001; TOZZE JÚNIOR et al., 2006).

Dessa forma, estudos relacionados a taxonomia dos agentes causais de antracnose em goiaba são essenciais para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença e, por conseguinte, melhorias na definição de estratégias de controle desta doença. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas à goiaba, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados *Colletotrichum* spp.

Foram obtidos 50 isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos de goiabeiras, cujas as procedência e variedades estão apresentadas na Tabela 1. Para o isolamento foi utilizada a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.2.1.

Tabela 1. Procedência, variedades e identificação de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados na caracterização morfo cultural e molecular.

Localidade	Variedade	Identificação
Campinas-SP	Paluma	1G
		2G
		3G
		4G
Jaboticabal -SP*	Paluma	5G
		6G
		7G
		8G
		9G
		10G
Louveira-SP	Paluma	11G
		12G
		13G
		14G
Monte Alto-SP	Tailandesa	15G
		16G
	Paluma	17G
		18G
		19G
		20G
Itápolis-SP	Paluma	21G
		22G
		23G
		24G
Pirangi-SP	Paluma	25G
		26G
		27G
		28G
		29G
São Lourenço do Turvo-SP	Paluma	30G
		31G
		32G
		33G
		34G
Taquaritinga-SP	Paluma	35G
		36G
		37G
		38G
		39G
Vista Alegre do Alto-SP	Tailandesa	40G
		41G
		42G
		43G
	Paluma	44G
		45G
		46G
Valinhos-SP	Paluma	47G
		48G
		49G
		50G

4.2.2. Caracterização morfocultural

Para a análise dos dados morfoculturais foi utilizado a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.2.2, com exceção da tabela de escala de notas de coloração das colônias que foi modificada de acordo com a coloração apresentada pelos isolados obtidos de frutos de goiabeiras (Tabela 2).

Tabela 2. Escala de notas referentes à coloração de colônias (frente e reverso da placa de Petri) de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de goiabeiras, em meio de cultura batata-dextrose-ágar, mantido a 25°C ±1°C.

Escala	Coloração das Colônias	
	Frente da placa de Petri	Reverso da placa de Petri
1	Branco	Branco
2	Branco	Cinza
3	Cinza	Branco/Castanho
4	Branco/Cinza	Preto
5	Branco/Salmão	Branco/Cinza

4.2.3. Teste de patogenicidade cruzada

Para os testes de patogenicidade cruzada foi utilizada metodologia semelhante à descrita no Capítulo 2, no item 2.2.3, porém adequando para frutos de goiaba.

4.2.4. Análise dos dados morfoculturais e patogenicidade cruzada

Para a análise multivariada, segue a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.2.4.

4.2.5. Caracterização molecular

Na caracterização molecular, a metodologia utilizada foi a mesma descrita no Capítulo 2, do item 2.2.5.1 ao item 2.2.5.3, com exceção da região Glutamina sintase (GS). Embora esta região tenha sido sequenciada, após a análise individual, não foi considerada na análise multilocus por não transmitir o mesmo sinal filogenético.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Caracterização morfocultural

Os dados relativos ao índice de velocidade de crescimento micelial, em meio BDA, além das características morfoculturais e teste de patogenicidade cruzada que foram analisadas e agrupadas, encontram-se apresentados na Tabela 3. Os isolados de *Colletotrichum* spp. diferiram estatisticamente quanto ao IVCM obtidos no decorrer de cinco dias de avaliação. A média de crescimento dos isolados foi 1,54 cm dia⁻¹, e o isolado que apresentou o maior IVCM foi o 40G (1,89 cm dia⁻¹), enquanto que o isolado que apresentou o menor IVCM foi o 23G (1,18 cm dia⁻¹).

Todos os isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos de goiaba avaliados neste estudo apresentaram IVCM superior a 1 cm dia⁻¹ que, segundo Adaskaveg e Hartin (1997), assemelham àquele apresentado por *C. acutatum*. De acordo com esses investigadores, os isolados que apresentaram taxa de crescimento inferior a 1 cm.dia⁻¹, foram categorizados como *C. acutatum*, enquanto que os de taxa de crescimento superior a 1 cm dia⁻¹ foram classificados como *C. gloeosporioides*.

Na caracterização cultural, as colônias variaram de branca a cinza, e alguns isolados apresentaram coloração branca, com nuances salmão. De acordo com a escala de notas e considerando somente o verso da placa de Petri, 48% dos isolados apresentaram colônias de coloração branca, 38% dos isolados apresentaram coloração cinza e apenas 7% dos isolados apresentaram coloração branca/salmão. A presença de setor foi observada em apenas 10% dos isolados avaliados.

De acordo com a coloração visualizadas nas colônias, as características se enquadram tanto para *C. gloeosporioides* quanto para *C. acutatum*. No entanto, a caracterização baseada apenas nas características descritivas das colônias, não permite afirmar a que espécie pertence cada isolado, dada inconsistência desses caracteres para fins taxonômicos (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; PERES et al., 2002; TOZZE JÚNIOR, 2007; ANDRADE et al., 2007)

Tabela 3. Valores relativos a cor de colônias (segundo notas estabelecidas), IVCN (em cm.dia⁻¹), presença de setor, morfometria dos conídios e resultados de testes de patogenicidade com isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de goiabas com sintomas de antracnose, obtidas em diversos municípios do estado de São Paulo.

Isolado	Coloração IVCN (cm dia-1)	Setor	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Relação C/L	Teste de Patogenicidade				
						Abacate	Banana	Goiaba	Manga	Mamão
1G	1	1,47b	-	12,03 b	3,35 b	3,67 b	-	-	+	-
2G	4	1,34b	-	13,38 a	4,22 a	3,20 c	+	+	+	+
3G	2	1,38 b	-	13,62 a	4,18 a	3,35 c	-	-	+	-
4G	1	1,37 b	+	12,45 b	3,86 b	3,27 c	-	-	+	-
5G	4	1,32 b	-	12,98 b	3,23 b	4,05 a	-	-	+	-
6G	1	1,41 b	-	13,69 a	4,24 a	3,24 c	-	-	+	-
7G	1	1,38 b	-	14,51 a	3,73 b	3,90 a	-	-	+	-
8G	4	1,46 b	-	14,23 a	4,18 a	3,46 b	+	+	+	-
9G	1	1,48 b	-	13,59 a	4,04 a	3,41 b	-	+	+	-
10G	1	1,41 b	+	11,13 b	4,56 a	2,46 c	+	+	+	+
11G	1	1,44 b	-	11,69 b	4,31 a	2,71 c	-	+	+	-
12G	4	1,49 b	-	12,28 b	4,53 a	2,72 c	+	+	+	-
13G	2	1,42 b	-	11,91 b	4,31 a	2,77 c	-	-	+	+
14G	1	1,41 b	-	11,74 b	4,33 a	2,73 c	-	-	+	+
15G	4	1,42 b	-	11,79 b	4,43 a	2,69 c	-	-	+	+
16G	4	1,45 b	-	12,14 b	4,38 a	2,78 c	-	-	+	-
17G	4	1,51 b	-	12,41 b	4,32 a	2,87 c	-	-	+	+
18G	4	1,3 b	+	12,49 b	4,50 a	2,77 c	-	-	+	+
19G	1	1,37 b	-	11,47 b	4,37 a	2,63 c	-	-	+	+
20G	1	1,87 a	-	14,26 a	4,43 a	3,24 c	+	+	+	-
21G	1	1,39 b	-	12,87 b	4,16 a	3,12 c	+	+	+	-
22G	4	1,41	-	11,96 b	4,06 a	2,98 c	-	-	+	-
23G	1	1,18 b	-	12,04 b	4,06 a	2,99 c	-	-	+	-
24G	2	1,64 a	-	11,64 b	4,57 a	2,58 c	+	+	+	-
25G	4	1,75 a	-	11,58 b	4,23 a	2,75 c	+	+	+	-
26G	4	1,72 a	-	12,49 b	4,22 a	3,01 c	-	-	+	+
27G	4	1,74 a	-	13,95 a	4,05 a	3,50 b	-	-	+	-
28G	1	1,91 a	-	13,29 a	3,29 b	4,06 a	-	-	+	-
29G	1	1,66 a	-	12,29 b	4,13 a	3,02 c	-	+	+	-
30G	3	1,8 a	-	12,17 b	3,81 b	3,23 c	-	-	+	-
31G	4	1,66 a	-	12,20 b	3,62 a	2,75 a	+	-	+	-
32G	1	1,65 a	-	14,43 a	3,53 b	4,11 a	+	-	+	-
33G	1	1,65 a	-	14,30 a	3,16 b	4,59 a	+	-	+	-
34G	5	1,79 a	-	13,54 a	4,13 a	3,35 c	+	-	+	+
35G	5	1,38 b	-	14,49 a	3,74 b	4,06 a	+	-	+	+
36G	5	1,47 b	-	13,70 a	3,86 b	3,57 b	+	-	+	+
37G	5	1,53 b	-	11,94 b	4,14 a	2,94 c	-	-	+	+
38G	3	1,85 a	-	11,97 b	3,61 b	3,43 b	+	-	+	-
39G	1	1,43 a	-	12,24 b	3,87 b	3,20 c	-	-	+	+
40G	3	1,88 a	-	11,98 a	4,47 a	2,70 c	+	+	+	+
41G	1	1,64 a	-	14,15 a	4,05 a	3,56 b	+	+	+	-
42G	1	1,45 b	+	13,81 a	4,37 a	3,19 c	-	-	+	-
43G	4	1,51 b	+	14,73 a	3,97 a	3,91 a	-	-	+	-
44G	4	1,62 a	-	13,08 a	4,13 a	3,22 c	-	-	+	-
45G	5	1,36 b	-	11,94 b	4,05 a	2,98 c	-	-	+	+
46G	5	1,43 b	-	12,63 b	3,28 b	3,89 a	-	-	+	-
47G	1	1,46 b	-	14,05 a	3,93 a	3,69 b	-	-	+	-
48G	1	1,7 a	-	11,91 b	4,51 a	2,65 c	-	-	+	+
49G	5	1,7a	-	11,55 b	4,02 a	3,03 c	-	-	+	+
50G	3	1,69 a	-	11,94 b	4,22 a	2,84 c	-	-	+	+

*Coloração das colônias de acordo com a escala de notas apresentada na Tabela 2; *C: média do comprimento de 50 conídios; *L: média da largura de 50 conídios; *C/L: relação comprimento/largura; *IVCM: índice velocidade do crescimento micelial. **Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Houve diferença estatística significativa entre os isolados quanto ao comprimento e a relação comprimento/largura dos conídios (Tabela 3). O isolado 10G foi o que apresentou a menor média de comprimento (11,14 μm) e maior média de largura (4,57 μm) dos conídios e, conseqüentemente, a menor relação comprimento/largura (2,47). O isolado 43G, contrariamente, apresentou a maior média de comprimento de conídios (14,74 μm), enquanto o isolado 33G foi o que apresentou menor média de largura (3,16 μm) dos conídios. A variação da relação comprimento/largura (C/L) foi de 2,47 (isolado 10G) a 4,59 (isolado 33G).

Furtado et al. (1999), estudando a morfometria de isolados de *C. gloeosporioides* em seringueira, verificaram que as médias da relação comprimento/largura variavam de 3,16 a 4,15 μm , sendo considerando mais ovalados os isolados que apresentavam relações C/L menores. Da mesma forma Veras, Gasparotto e Menezes (1997) observou que o tamanho dos conídios pela relação C/L pode ser um bom parâmetro, indicando que quanto maior o quociente dessa relação, mais longos e delgados são os conídios e vice-versa.

A classificação segundo Sutton (1992), para as dimensões médias de conídio não permitem classificar os isolados deste estudo, uma vez que, há sobreposição dentro da faixa em que se classifica as espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Embora muitas das características morfológicas das espécies do gênero *Colletotrichum* sejam extremamente plásticas e variáveis, dependendo principalmente das condições culturais e ambientais, não se descarta a possibilidade de existências de outras espécies relacionadas com os isolados apresentados.

4.3.2. Patogenicidade cruzada

Todos os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de lesões típicas de antracnose em frutos de goiabas mostraram-se patogênicos quando inoculados em frutos de goiaba da variedade 'Paluma' (Tabela 3). Após 10 dias da inoculação foram observados os sintomas, com presença de manchas encharcadas, de coloração marrom, que evoluíram para marrom escuro, com conseqüente aumento de tamanho, ligeiramente deprimidas e presença de massa conidial, na cor laranja (Figura 1).



Figura 1. Sintomas típicos de antracnose, com lesões escuras e presença de massa conidial, de cor salmão, em fruto de goiabeira 'Paluma' após 10 dias da inoculação, sob condições de laboratório.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de goiaba, quando inoculados em frutas de abacate, banana, mamão e manga (Figura 2) apresentaram baixa porcentagem de frutos com sintomas de antracnose, sendo de apenas 34% em abacate, 26% em banana, 36% em mamão e 16% em manga.

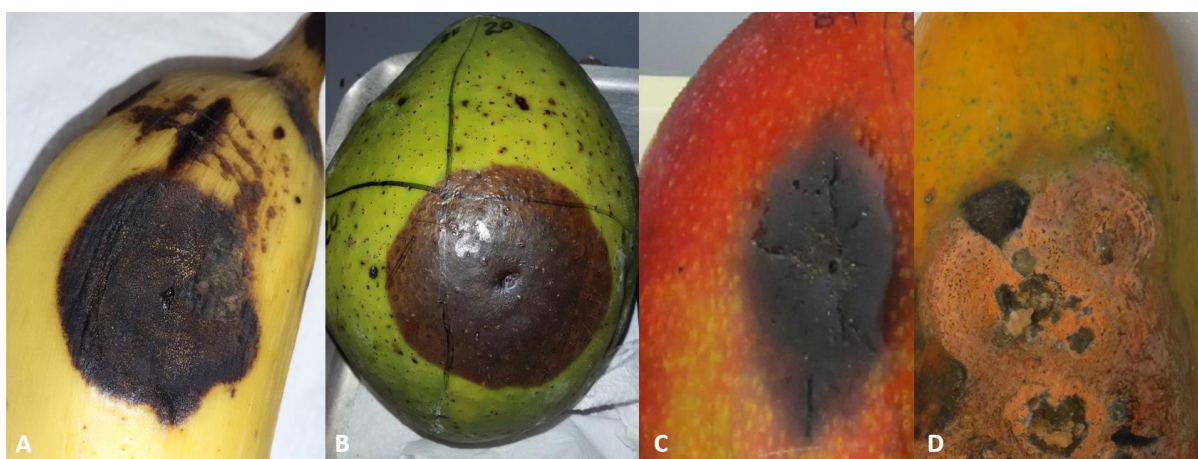


Figura 2. Vista parcial dos frutos de banana (A), abacate (B), Manga (C) e mamão (D) inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de goiabeiras com sintomas de antracnose.

Ainda que os sintomas de antracnose não tenham sido reproduzidos na totalidade dos frutos inoculados, os resultados de patogenicidade observados indicam baixa especificidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de frutos de goiaba.

Sendo assim, os isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de goiabeiras não apresentam especificidade quanto ao hospedeiro, fato este constatado por diversos autores em trabalhos envolvendo teste de patogenicidade cruzada em frutíferas (Peres et al., 2002; Lima Filho, Oliveira e Menezes, 2003; Silva et al., 2006; TAKAHASHI, 2008; BONETT et al., 2010)

Segundo Tozze Júnior (2012), essa informação é de grande importância para a determinação de estratégias de controle da antracnose, pois a falta de especificidade do patógeno ao hospedeiro implica em maior dificuldade no desenvolvimento de métodos de controle efetivos da doença, especialmente, quando na área de produção existe associação de culturas hospedeiras do patógeno.

4.3.3. Análise de agrupamento das características morfoculturais e teste de patogenicidade

A análise conjunta das características morfoculturais e do teste de patogenicidade cruzada por meio do agrupamento usando o método hierárquico, interligou as amostras por suas associações, gerando um dendrograma onde amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, foram agrupadas entre si, resultando na formação de sete grupos de isolados, identificados como Grupos I, II, III, IV, V, VI e VII (Figura 3).

A análise dos componentes principais possibilitou visualizar as características mais discriminantes (Figura 4). A característica que influenciou à formação do Grupo I foi a relação comprimento/largura. O Grupo II apresentou isolados que foram patogênicos em frutos de mamão, porém não apresentaram patogenicidade em frutos de abacate. Os isolados 31G e 38G apresentaram valores de média de comprimento e largura de conídios próximos, caracterizando a formação do Grupo III.

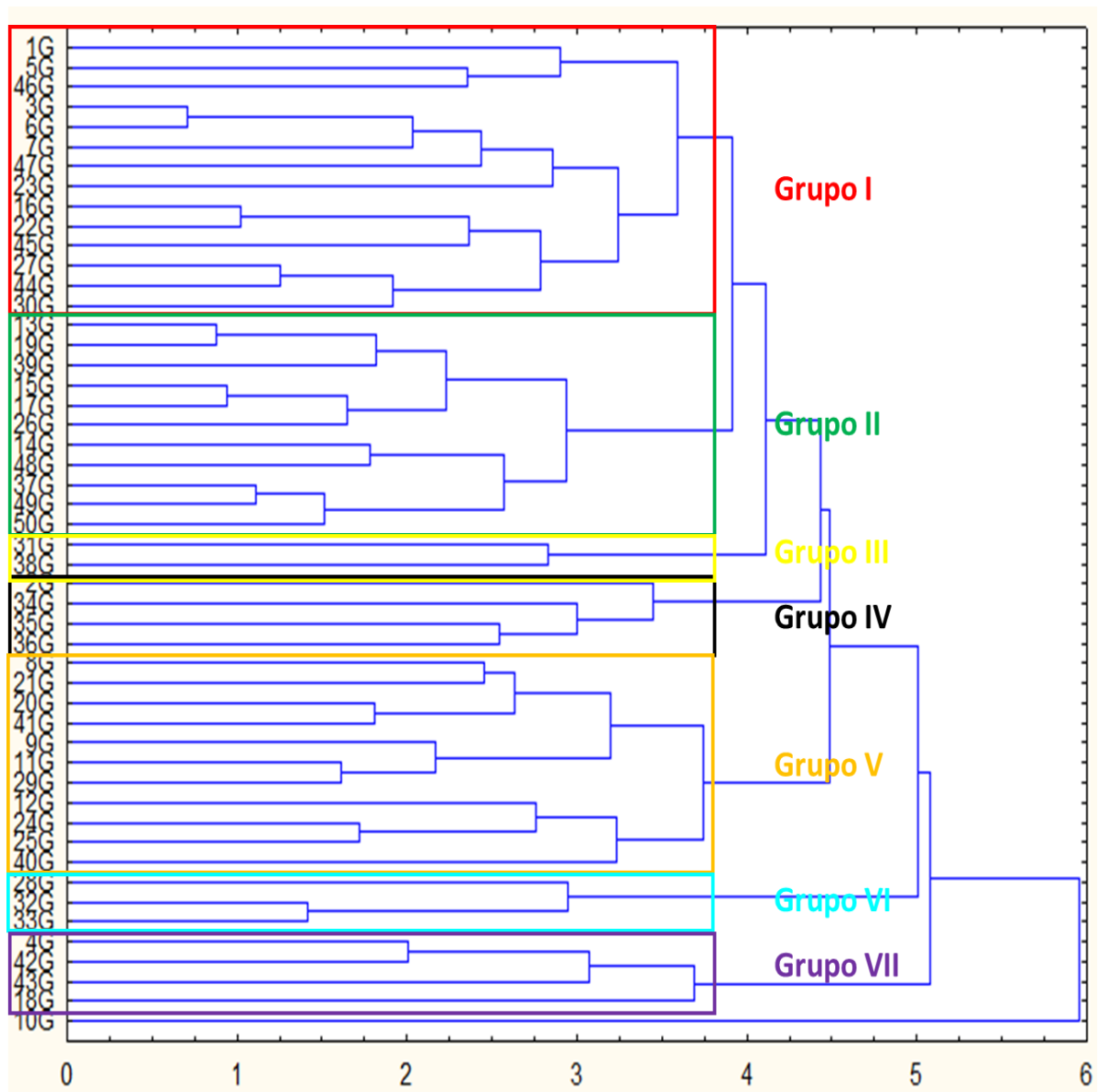


Figura 3. Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, morfometria de conídios, presença ou ausência de setor e resultados dos testes de patogenicidade cruzada.

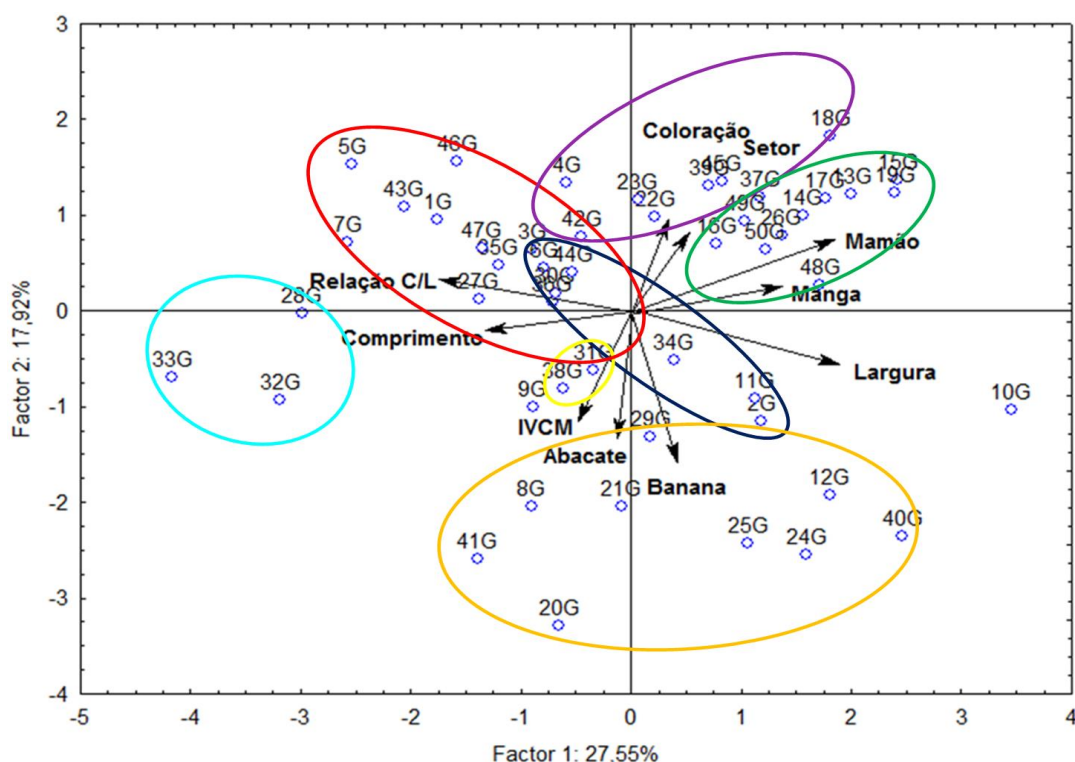


Figura 4. Biplot mostrando a projeção das variáveis coloração das colônias, morfometria dos conídios, presença e ausência de setor e patogenicidade nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com distribuição dos 50 isolados de *Colletotrichum* spp.

O Grupo V foi constituído por isolados que se mostraram patogênicos em frutos de abacate e banana. Já o Grupo VI, compostos pelos isolados 28G, 32G e 33G apresentaram os valores de comprimento dos conídios e relação comprimento/largura próximos. O Grupo VII foi formado por isolados que apresentaram setor em colônias existentes em meio de cultivo BDA, em placas de Petri. Exceção foi observada ao isolado 10G, que embora, tenha apresentado setor, foi o único isolado que se mostrou patogênico quando inoculado em frutos de abacate, banana, goiaba, mamão e manga.

Ainda que, os aspectos morfoculturais e o teste de patogenicidade tenham propiciado o agrupamento dos isolados, de um modo geral houve elevado polimorfismo entre os isolados e/ou espécies de *Colletotrichum* spp. dentro de um

mesmo grupo. Bueno, Tozze Júnior e Massola Júnior (2005) verificaram que determinadas mudanças nas variáveis ambientais são suficientes para que um isolado identificado por técnicas moleculares como sendo *C. acutatum* apresentasse morfometria mais próxima de *C. gloeosporioides*, e vice e versa. Este comportamento deve-se, normalmente, às influências relativas aos tipos de meios de cultivo, temperatura ambiente e luminosidade (NECHET; ABREU 2002; MAIA et al., 2011).

4.3.4. Caracterização molecular

A análise filogenética realizada com base nas sequências nucleotídicas concatenadas das regiões ITS, ACT, GAPDH, CL e β -tubulina resultou na formação de uma árvore composta por 67 táxons, sendo: 50 sequências de isolados de *Colletotrichum* spp. e 17 espécies, cujas sequências foram retiradas do GeneBank para determinação do índice de similaridade. A matriz de dados conteve um total de 2.013 caracteres. Esta análise proporcionou o agrupamento dos isolados em dois grandes clados (Figura 5). As espécies *C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. acutatum* e *C. boninense* formaram clados independentes e distintos entre si e quanto aos demais isolados avaliados. Por outro lado, com exceção dos isolados 29G e 40G, integrantes na espécie *C. musae*, todos os demais compartilharam o grupo constituído por *C. siamense*, com identificação dos mesmos neste grupo.

Bragança (2013) e Phoulivong (2010) relataram que isolados de *C. siamense* quando inoculados em frutos de goiabeiras são patogênicos. No entanto, não há relatos na literatura desta espécie associada antracnose da goiabeira, sendo este o primeiro relato.

Os isolados 29G e 40G agruparam-se com a espécie *C. musae*, com valores de inferência bayesiana e *Bootstrap* para os métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança de 80, 96 e 99%, respectivamente. Considerando que quanto mais próximo de 100%, maior a confiança na topologia inferida, tem-se, assim, que estes isolados pertencem à espécie *C. musae*.

A espécie *C. musae* não é relatada na literatura como agente causal da antracnose em goiaba. Porém, no capítulo 3 deste estudo, mediante o teste de patogenicidade realizado com espécies de *Colletotrichum* spp. provenientes de

frutos de bananeiras com sintomas de antracnose, foi verificado que fungos dessa espécie foram patogênicos quando inoculados em frutos de goiabeira da variedade Paluma. O mesmo ocorre com a espécie *C. siamense*, a qual mostra-se associada a antracnose em frutos de abacate (BRAGANÇA, 2013) mas que, no entanto, mostraram-se patogênicos quando inoculados em frutos de goiaba (Capítulo 2, item 2.3.3).

Ainda que as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* sejam descritas como agentes causais de sintomas de antracnose em diversas partes do mundo e também no Brasil (JUNQUEIRA; COSTA, 2002; PICCININ et al., 2005), no presente estudo essas espécies não foram detectadas. Aparentemente, ou estas espécies não são tão frequentes junto aos pomares de goiabeiras no estado de São Paulo, ou a amostragem realizada no presente estudo não foi suficientemente representativa a ponto de detectá-las.

Não foi observada relação entre origem geográfica e hospedeiro (variedades) entre os 50 isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em goiabeira no estado de São Paulo.

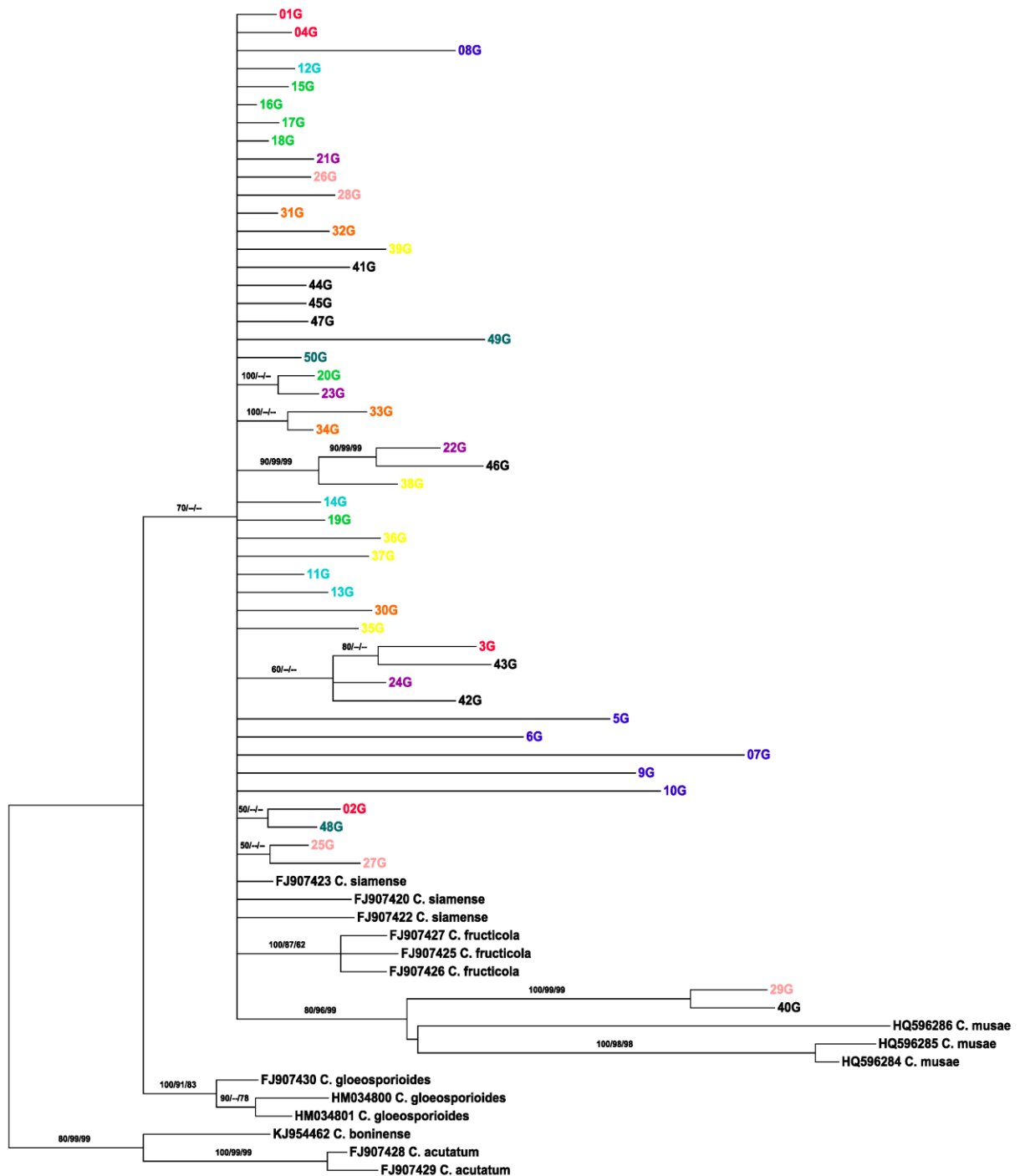


Figura 5. Árvore filogenética de inferência Bayesiana dos 50 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de goiabeiras. A árvore foi construída com base nas sequências das regiões ACT, TUB, ITS, GAPDH e CAL. Os valores acima dos ramos representam a porcentagem da probabilidade posterior e *Bootstrap* das análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança.

4.4. CONCLUSÕES

- Existe diversidade morfocultural entre os isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de goiabeira com sintomas de antracnose.
- Os critérios morfoculturais abordados neste estudo não foram suficientes para distinguir espécies do gênero *Colletotrichum*.
- Além de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, *C. siamense* e *C. musae* são também patógenos responsáveis por sintomas de antracnose em frutos de goiabeiras.
- Os isolados de *Colletotrichum* spp. encontrados em frutos de goiabeiras podem ser patógenos em abacate, banana, manga e mamão.

REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J.E.; FORSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed). *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions*. St. Paul: American Phytopathological Society, p. 317-336, 2000.
- ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 9, p. 979-987, 1997.
- ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CAB International, 388 p.,1992.
- BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 5, p. 478- 482, 1995.
- BONETT, L.P.; ALMEIDA, M.; GONÇÁLVES, R.G.A.; AQUINO, T.F.; BERNARDIWENZEL, J. Caracterização morfo cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência Guarapuava**, Guarapuava, v. 6, n. 3, p. 451-463, 2010.
- BRAGANÇA, C. A. D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. 2013. 69 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes temperaturas e espectros de radiação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005, Santos. **Anais** São Paulo: SBM, p. 61, 2005.

FERNANDES, M.C.A.; SANTOS, A.S.; RIBEIRO, R.L.D. Sensibilidade ao fungicida benomyl in vitro de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 89-95, 2002.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

FURTADO, E.L.; BACH, E.E.; KIMATI, H.; MENTEN, J.O.M.; SILVEIRA, J.A. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 3, p. 222-228, 1999.

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

GONZÁLEZ, A.F.R. **Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp, Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD.** 2007. 82 p. Monografía (Trabajo de grado em Microbiología Industrial) - Faculdade de Ciências, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007. Disponível em: <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>> Acesso em: 14 dez. 2015.

GUNNEL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, Lancaster, v. 84, n. 2, p., 157-165, 1992.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 147-182, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola. 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=161&3z=t&o=11&i=P>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.; PEREIRA, M.; LIMA, M.M.; CHAVES, R.C. **Doenças da goiabeira no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 31 p. (Circular Técnica, 15). 2001.

JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, H. Controle das doenças da goiabeira In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed.) **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p., 1247-1277. 2002.

LIM, T.K.; MANICOM, B.Q. Diseases of guava. In: PLOETZ, R.C. **Diseases of tropical fruit crops**. Wallingford: University of Florida, p. 275 -289., 2003.

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

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

MAIA, V. M.; SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L.; PUSCHMANN, R.; MOTA FILHO, V. J. G.; CECON, P. R. Tipos e intensidade de danos mecânicos em bananas 'prata-anã' ao longo da cadeia de comercialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 365-370, 2008.

MANICA, I.; KIST, H.; MICHELETTO, E.L.; KRAUSE, C.A. Competição entre quatro cultivares e duas seleções de goiabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1305-1313, 1998.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 27, p. 23-27. Suplemento. 2002.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98. n. 1/3, p. 137-144, 1992.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 26 (6):1135-1142, 2002.

PEREIRA, F.M. **Cultura da goiabeira**. Jaboticabal, SP: Funep, 47 p., 1995.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças do abacateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Ceres, v. 2, cap. 44, p. 1-7. 2005.

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

SMITH, B.J.; BLACK, L.L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, n. 1, p. 69-76, 1990.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and it Anomorph *Colletotrichum*. In BAYLEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum, biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. international, p. 1-26, 1992.

TAKAHASHI, L. M. **IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* DE ATEMÓIA (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), POR MEIO DE CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, CULTURAL E MORFOLÓGICA**. 2008. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2008.

TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A.; BETTI, J.A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* ao benomyl na cultura do morango no estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 139-146, 1997.

TOZZE JÚNIOR, H. J. **Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-**

penetração e monocíclicos e controle químico. 2012. 124 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

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

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

VERAS, S.M.; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisiomorfológica de *Colletotrichum graminicola* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 297-305, 1997.

VON ARX, J.A. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathol. Zeitschrift* 29: 413-468, 1957.

WALLER, J.M. N diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J.A; JEGER, M. J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Oxon: CAB Int., p. 167-185. 1992.

CAPÍTULO 5 – Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de mangueira com sintomas de antracnose

RESUMO – O Brasil produz em média 1,2 milhões de toneladas de manga por ano, em uma área de 76 mil hectares. A produção brasileira está distribuída principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste. As doenças são responsáveis por grandes perdas na cultura da manga. A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., é uma das doenças mais frequentes e que, em geral, causa as maiores perdas econômicas em áreas produtoras de manga, no mundo. O presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas aos frutos de mangueiras, de diversas variedades e locais do estado de São Paulo, bem como estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas. Cinquenta isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de mangueiras foram submetidos a análises morfo cultural, molecular e de patogenicidade cruzada. Na caracterização molecular foram sequenciadas regiões parciais dos genes da actina (ACT), glutamina sintase (GS), gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CL), β -tubulina (TUB) e ITS1-5.8S-ITS2. A caracterização cultural e morfológica não proporcionou resultados confiáveis para a identificação dos isolados de *Colletotrichum* avaliados. Os isolados de *Colletotrichum* spp. encontrados em frutos de mangueiras podem ser patógenos também em abacate, banana, goiaba e mamão, demonstrando a sua baixa especificidade fisiológica. A antracnose em frutas de mangueira, no estado de São Paulo, está associada às espécies *C. asianum* e *C. dianesii*. A análise molecular e morfo cultural não apontaram relação entre origem geográfica e hospedeiro (variedade) nos 50 isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados.

Palavras chave: *Mangifera indicae*, *Colletotrichum asianum*, *Colletotrichum dianesii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, pós colheita.

5.1. INTRODUÇÃO

As áreas de cultivo de manga no Brasil estão distribuídas principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste, sendo o estado da Bahia o maior produtor, com 37,65% da área, seguido por São Paulo, com participação de 18,42%, Pernambuco com 18,41% e Minas Gerais com 11,32% (AGRIANUAL, 2014). O Brasil exportou 47.969 toneladas de manga em 2014, gerando uma receita de 122.009 dólares (MDIC/SECEX, 2014). O potencial para sua exploração comercial, especialmente às exportações, é grande, porém, são muitos os problemas a serem superados. Dentre esses incluem-se os de natureza fitossanitário, notadamente as doenças fúngicas.

As doenças fúngicas são responsáveis por grandes perdas nesta cultura, principalmente no período pós-colheita. A intensificação do cultivo e algumas práticas de manejo de cultivo não adequadas têm propiciado a existência de problemas fitossanitários e, conseqüentemente, perdas na produção, que podem ser quantitativas, com redução na produção, e qualitativas, depreciando a qualidade dos frutos. Dentre as doenças, destaca-se a antracnose, cujo agente causal causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, uma das doenças mais frequentes e, que em geral, causa as maiores perdas econômicas em áreas produtoras de manga no mundo (BATISTA; BARBOSA, 2008).

A antracnose é mais severa em condições chuvosas, sob temperaturas elevadas e alta umidade. Incide em todos os órgãos aéreos da planta como ramos, folhas, flores e frutos. Nas folhas, a antracnose aparece como pontos necróticos irregulares em ambos os lados das folhas da mangueira. As lesões coalescem e muitas vezes formam grandes áreas necrosadas. As lesões se desenvolvem principalmente em tecidos jovens (SILVA, FONSECA, MOREIRA, 2002). As flores infectadas enegrecem, seguido de secamento do pedúnculo e prejudicando a panícula, e por consequência a frutificação. Na ráquis da inflorescência e suas ramificações, aparecem manchas de coloração marrom escuras, profundas e secas, alongadas no sentido longitudinal, destruindo grande número de flores. Sob condições favoráveis, o fungo pode invadir os ramos e causar a sua morte descendente (PLOETZ et al., 1994). Quando a infecção é em frutos, o patógeno pode permanecer quiescente e os sintomas surgirem apenas durante a pós-colheita. Durante o amadurecimento, manchas marrom-escuras a pretas, geralmente

arredondadas e levemente deprimidas podem se desenvolver em qualquer parte do fruto. Com a evolução dos sintomas, as manchas se tornam maiores, deprimidas, com pequenas rachaduras em certos casos, levando ao apodrecimento do fruto. Um segundo tipo de sintoma é a “mancha em lágrima”, que são regiões lineares necrosadas nos frutos, que podem ou não estar associadas a rachaduras superficiais ou podem se desenvolver em largura, causando fendas profundas que se estendem da epiderme à polpa (NELSON, 2008).

A disseminação do patógeno pode ocorrer a partir de lesões em folhas, panículas ou frutos que servem como fonte de inóculo para infecção em órgãos sadios. Essa disseminação ocorre principalmente por respingos de água (chuva, orvalho ou irrigação). O patógeno também sobrevive sob lesões em folhas velhas, ramos verdes ou secos, inflorescências ou panículas presas à planta. A infecção ocorre principalmente na presença de água livre ou umidade relativa acima de 90%, sendo que a infecção depende da temperatura (EMBRAPA, 2015).

Segundo a literatura, o número de espécies de *Colletotrichum* associados aos sintomas de antracnose, nas diversas culturas e grande. Sutton (1980) considerou 22 espécies, adotando para a distinção os critérios taxonômicos de morfologia de conídios, apressórios e as características culturais das colônias. Em 1992, com base nos padrões utilizados no trabalho anterior e na especificidade do hospedeiro, esse mesmo autor reconheceu a existência de 39 espécies, incluindo uma variedade e oito *formae speciales*.

Hyde et al., (2009) forneceram uma visão geral de 66 espécies de *Colletotrichum* que estão em uso corrente, descrevendo-as com base na morfologia e uma abordagem filogenética multilocus.

Com a publicação do trabalho de Cannon et al. (2012), mais 41 espécies foram introduzidas no gênero *Colletotrichum*, elevando o número para mais de 100 espécies. Weir et al., (2012) descreveram 22 espécies dentro do ‘Complexo *C. gloeosporioides*’: *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides sensu strictu*, *C. horii*, *C. kahawae subsp. kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. xanthorrhoeae*, *C. aenigma*, *C. aeschynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. clidemiae*, *C. kahawae*

subsp. ciggaro, *C. salsolae*, e *C. ti*. Ainda em 2012, esses autores caracterizaram as espécies do 'Complexo *C. acutatum*' e 'complexo *C. boninense*'.

A espécie *C. gloeosporioides* foi mencionada, por muito tempo, como a principal espécie associada a sintomas de antracnose em frutíferas no mundo (JEFFRIES et al., 1990; PRUSKY; KEEN, 1993; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; PLOETZ, 2003). No entanto, Phoumivong et al., (2010) foram capazes de mostrar, por meio de análises filogenética multilocus, que *Colletotrichum gloeosporioides* não era o patógeno exclusivo dos sintomas de antracnose nas fruteiras tropicais.

No Brasil, a antracnose da mangueira era atribuída exclusivamente ao *C. gloeosporioides* (Santos Filho e Matos 2003; Ribeiro 2005). Porém, em 2013, Lima e colaboradores, em um estudo filogenético realizado com isolados obtidos de pomares do Nordeste brasileiro, relataram que a antracnose da mangueira estava associada a cinco espécies: *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. karstii*, e uma nova espécie, denominada *C. dianesii*.

Colletotrichum é um gênero que apresenta uma taxonomia complexa, com necessidade de revisão (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; JOHNSTON, 2000; JOHNSTON et al., 2008; CANNON et al., 2012; Damm et al., 2012). Para elucidar essa questão, pesquisadores têm utilizado, além de estudos morfológicos, outras metodologias como dados de sequências do DNA, características culturais, fisiológicas e de patogenicidade, além da compatibilidade vegetativa, as quais constituem-se em pontos importantes para uma identificação completa e correta das espécies (SUTTON, 1992; CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009; PRIHASTUTI et al., 2009)

A análise filogenética utilizando dados de várias regiões do genoma em conjunto tem demonstrado resultados importantes para elucidar questões filogenéticas. A viabilidade desta técnica para estudos taxonômicos de fungos do gênero *Colletotrichum* foi confirmada por Lima et al. (2013).

De maneira geral, a correta identificação e caracterização das espécies de fungos associadas às doenças, incluindo a antracnose, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, incluindo o melhor entendimento da epidemiologia da doença. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente as espécies de *Colletotrichum* associadas

aos frutos de mangueiras de diferentes variedades e municípios do estado de São Paulo e de Petrolina-PE, bem como, estabelecer relações filogenéticas entre as espécies identificadas.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados *Colletotrichum* spp.

Foram obtidos 50 isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos de mangueiras das variedades Adams, Bourbon, Bourbon Vermelha, Coração de Boi Stein, Espada Vermelha, Espada Staill, Palmer, Haden TR, Haden 2H, Haden, Imperial, Natalina, Rosa, Ubá e Titan, provenientes dos municípios de Aguaí, Campinas, Fernandópolis, Jales, Jardinópolis, Monte Alto, Mogi Mirim, Pindorama, Pirangi, São Lourenço do Turvo, Taquaritinga, Vista Alegre do Alto e Votuporanga todos pertencentes ao estado de São Paulo, e de Petrolina, Estado de Pernambuco (Tabela 1).

Os frutos coletados foram desinfestados com hipoclorito de sódio 2,5%, por três minutos. Posteriormente, os frutos foram secos com papel toalha e depositados em bandejas de alumínio, mantidos à temperatura 25°C. Os isolamentos foram realizados com base em duas metodologias: i) a partir de tecidos vegetais apresentando lesões típicas de antracnose em frutos, a partir das quais fragmentos do tecido lesionado foram desinfestados e depositados em meio de cultivo batata-dextrose-água (BDA); ii) isolamento direto - mediante remoção superficial de esporos existentes em frutos com lesões típicas de antracnose, empregando-se agulha previamente flambada, e posterior deposição da massa de esporos em meio de cultivo BDA. Em ambos os métodos, as placas de Petri foram mantidas em estufas para B.O.D. a 25 °C $\pm$ 1°C, durante o período de crescimento das colônias fúngicas. Após sete dias de incubação foram selecionadas as colônias típicas de *Colletotrichum* spp., seguido de repicagem e, posteriormente, da identificação, tomando como referência aspectos culturais e morfofisiológicos descritos por Sutton (1992). Posteriormente, culturas monospóricas foram realizadas para cada isolado, seguido de seu armazenamento em frascos do tipo penicilina contendo água

esterilizada (CASTELLANI, 1939) e armazenados sob refrigeração à temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1. Procedência, variedades de manga e identificação de isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados na caracterização morfo cultural e molecular.

Localidade	Variedade	Isolados
Aguai-SP	Palmer	1M
		2M
		3M
Campinas-SP	Palmer	4M
		5M
		6M
Fernandópolis-SP	Palmer	7M
		8M
Jales-SP	Palmer	9M
		10M
Jardinópolis-SP	Palmer	11M
		12M
		13M
Monte Alto-SP	Espada Vermelha	14M
	Palmer	15M
		16M
Mogi Mirim-SP	Palmer	17M
		18M
Petrolina-PE	Palmer	19M
		20M
Pindorama-SP	Palmer	21M
	Haden TR	22M
	Haden 2H	23M
	Haden	24M
	Adams	25M
	Rosa	26M
	Ubá	27M
	Rosa Bourbon	28M
Pirangi-SP	Palmer	29M
		30M
		31M
São Lourenço do Turvo - SP	Palmer	32M
		33M
		34M
Taquaritinga-SP	Palmer	35M
		36M
		37M
Vista Alegre do Alto-SP	Palmer	38M
		39M
		40M
Votuporanga-SP	Espada Vermelha	41M
	Espada Stail	42M
	Imperial	43M
	Palmer	44M
	Bourbon Vermelha	45M
	Ubá	46M
	Haden 2H	47M
	Coração de Boi Stein	48M
	Titan	49M
	Natalina	50M

5.2.2. Caracterização morfocultural

Para a análise morfocultural adotou-se a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.2.2, com exceção da Tabela de escala de notas de coloração das colônias, a qual foi modificada, sendo adotada o critério de coloração apresentada pelos isolados deste estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Escala de notas referentes à coloração de colônias (frente e reverso da placa de Petri) de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de mangueiras, em meio de cultura batata-dextrose-ágar, mantido a 25°C $\pm$ 1°C.

Escala	Coloração das colônias	
	Frente da placa de Petri	Reverso da placa de Petri
1	Branco	Branco
2	Cinza	Branco/Castanho/Preto
3	Branco/Cinza	Preto
4	Branco	Cinza
5	Branco/Cinza	Branco
6	Branco	Branco/Castanho/Preto
7	Cinza/Preto	Cinza/Preto
8	Branco/Cinza	Branco/Cinza/Preto
9	Branco/Cinza/Preto	Branco/Cinza/Preto

5.2.3. Teste de patogenicidade cruzada

Para os testes de patogenicidade cruzada foi utilizada a metodologia descrita no Capítulo 2, no item 2.2.3.

5.2.4. Análise dos dados morfocultural e patogenicidade cruzada

Seguiu-se a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.2.4.

5.2.5. Caracterização molecular

Na caracterização molecular foi utilizada a mesma metodologia descrita no Capítulo 2, do item 2.2.5.1 ao item 2.2.5.2, com exceção das regiões da actina

(ACT), glutamina sintase (GS) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPGH) que, embora tenham sido sequenciadas, após as análises individuais estas regiões foram excluídas da análise multilocus por não transmitirem o mesmo sinal filogenético. No item 2.2.5.3, na Tabela 4, foram acrescentadas as sequências das espécies: *Colletotrichum diancesii*, *Colletotrichum karstii* e *Colletotrichum tropicale*, cujos números de acesso no GenBank encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição das unidades taxonômicas operacionais de *Colletotrichum* spp. utilizadas nas análises filogenéticas.

	ACT	TUB	CAL	GS	GPDH	ITS
C. gloeosporioides	FJ907430	FJ907445	FJ917512	FJ972589	FJ972582	FJ972609
	HM034800	HM034810	HM034802	-	HM034806	HM034808
	HM034801	HM34811	HM34803	-	HM34807	HM34809
C. asianum	FJ903188	FJ907434	FJ917501	FJ972586	FJ972571	FJ972506
	FJ907424	FJ907439	FJ917506	FJ972595	FJ972576	FJ972612
	FJ907421	FJ907436	FJ917503	FJ972598	FJ972573	FJ972615
C. siamense	FJ907420	FJ907434	FJ917502	FJ972599	FJ972572	FJ972604
	FJ907423	FJ907438	FJ917505	FJ972596	FJ972575	FJ972613
	FJ907422	FJ907437	FJ917504	FJ972597	FJ972574	FJ972674
C. fruticola	FJ907427	FJ7442	FJ917509	FJ972592	FJ972579	FJ972611
	FJ907425	FJ907440	FJ917507	FJ972594	FJ972577	FJ972602
	FJ907426	FJ907441	FJ917508	FJ972593	FJ972578	FJ972603
C. acutatum	FJ907428	FJ907443	FJ917510	FJ972591	FJ972580	FJ972601
	FJ907429	FJ907444	FJ917511	FJ972590	FJ972581	FJ972610
C. musae	HQ596284	HQ596280	-	HQ596258	HQ59299	HQ596292
	HQ596285	HQ596281	HQ596296	HQ596289	HQ596300	QH596293
	HQ596286	HQ596282	HQ596297	HQ596290	HQ596301	HQ596294
	HQ596287	HQ596283	HQ596298	HQ596291	HQ596302	HQ596295
C. boninense	KJ954462	KP119720	JX009741	KJ955039	KJ954890	KJ955189
C. diancesii	-	KC517250	KC517205	-	-	KC329775
C. karstii	-	KC 517292	KC533743	-	-	KC295235
C. tropicale	KC533727	KC517259	KC517214	KC430866	KC517182	KC430866
	KC533730	KC517262	KC517217	KC430870	KC517185	KC329788

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Caracterização morfofocultural

Os dados relativos ao índice de velocidade de crescimento micelial, em meio BDA, além das características morfo culturais e teste de patogenicidade cruzada que foram analisadas e agrupadas, e estão apresentados na Tabela 4. Os isolados de *Colletotrichum* spp. não diferiram estatisticamente quanto ao índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) obtidos no decorrer de cinco dias de avaliação. A média de crescimento dos isolados foi 1,41 cm dia⁻¹, e os isolados que apresentaram o maior IVCM foram o 13M e 47M (1,61 cm dia⁻¹), enquanto que o isolado que apresentou o menor IVCM foi o 11M (1,10 cm dia⁻¹). Todos os isolados deste estudo apresentaram IVCM superior a 1 cm.dia⁻¹, que segundo Adaskaveg e Hartin (1997), enquadraram-se àquelas características descritas para *C. gloeosporioides*. Embora este critério tenha sido utilizado por alguns autores, ele mostra-se falho devido as diversas variáveis a que está associado, como por exemplo fotoperíodo, forma de preparo do meio de cultura, temperatura, entre outras.

Na caracterização cultural a coloração das colônias foi bastante heterogênea, mostrando-se branca, cinza, castanha a preta, com predominância das cores branca e cinza. Entretanto, nos primeiros dias de cultivo todas as colônias se mostravam totalmente brancas, variando para as outras colorações ao longo do seu crescimento. No reverso da placa de Petri foi observado grande variação de cores das colônias, desde branca intensa até combinações de três cores branco/cinza/preto ou branco/castanho/preto. Apenas 10% dos isolados produziram setor. Estas características culturais mostraram-se semelhantes às descrições feitas por Sutton (1992) para *Colletotrichum*.

De acordo com as análises morfométricas, o isolado 11M foi o que apresentou menor média de comprimento dos conídios (9,87 µm), enquanto o isolado 9M foi o mais alongado, cujo comprimento foi de 13,53 µm. Os isolados 8M e 48M foram os que apresentaram maior (4,41 µm) e menor (2,95 µm) média de largura dos conídios, respectivamente. Já os isolados 5M e 12M foram os que apresentaram maior (3,65 µm) e menor (2,63 µm) média da relação comprimento/largura dos conídios, respectivamente.

Tabela 4. Classificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de diversas variedades de mangueiras em diferentes municípios do estado de São Paulo, e de Petrolina-PE, quanto a coloração das colônias, teste de patogenicidade, presença de setor, morfometria dos conídios e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM).

Isolado	Coloração	Setor	IVCM (cm dia ⁻¹)	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Relação C/L	Teste Patogenicidade Cruzada				
							Abacate	Banana	Goiaba	Mamão	Manga
1M	2	+	1,34 a	13,52 a	3,93 a	3,44 a	-	-	+	-	+
2M	7	-	1,44 a	12,30 a	3,66 a	3,36 a	+	-	+	+	+
3M	1	-	1,29 a	12,57 a	3,85 a	3,26 a	+	-	-	-	+
4M	9	-	1,37 a	12,31 a	4,10a	3,00 a	-	+	-	+	+
5M	1	-	1,49 a	13,43 a	3,67 a	3,65 a	+	-	-	-	+
6M	2	-	1,36 a	11,76 b	3,68 a	3,19 a	+	-	-	+	+
7M	2	-	1,29 a	11,41 b	3,97 a	2,87 a	+	-	-	+	+
8M	7	-	1,43 a	12,51 a	4,41 a	2,83 a	-	-	+	+	+
9M	4	-	1,37 a	13,53 a	3,93 a	3,44 a	-	+	-	+	+
10M	5	-	1,31 a	13,00 a	3,65 a	3,56 a	-	-	+	+	+
11M	6	+	1,10 a	9,87 b	3,70 a	2,66 a	-	+	+	-	+
12M	7	-	1,13 a	10,18 b	3,87 a	2,63 a	+	+	-	-	+
13M	4	-	1,61 a	12,31 a	3,88 a	3,17 a	+	-	-	+	+
14M	4	-	1,39 a	11,43 b	3,85 a	2,96 a	-	-	+	-	+
15M	7	-	1,38 a	12,08 b	4,10 a	2,94 a	+	-	-	+	+
16M	8	-	1,37 a	12,81 a	3,66 a	3,50 a	-	-	-	-	+
17M	5	-	1,43 a	11,77 b	3,91 a	3,01 a	+	-	+	-	+
18M	8	-	1,49 a	12,51 a	3,93 a	3,18 a	+	+	-	-	+
19M	1	-	1,36 a	12,09 b	3,97 a	3,04 a	-	-	-	-	+
20M	1	-	1,37 a	12,42 a	3,93 a	3,16 a	-	-	-	-	+
21M	8	-	1,47 a	11,76 b	3,87 a	3,03 a	-	-	+	-	+
22M	7	-	1,45 a	12,47 a	3,89 a	3,20 a	-	-	-	-	+
23M	2	+	1,57 a	11,82 b	3,83 a	3,08 a	-	-	-	-	+
24M	1	-	1,39 a	12,06 b	3,93 a	3,06 a	+	+	+	-	+
25M	7	+	1,44 a	13,07 a	4,11 a	3,18 a	-	-	-	-	+
26M	2	-	1,52 a	12,04 b	3,95 a	3,04 a	-	-	-	-	+
27M	4	-	1,47 a	11,43 b	3,81 a	3,00 a	+	-	+	-	+
28M	1	-	1,37 a	12,44 a	4,35 a	2,85 a	+	-	-	-	+
29M	4	-	1,47 a	11,19 b	4,03 a	2,77 a	-	-	-	-	+
30M	7	-	1,45 a	12,08 b	3,87 a	3,12 a	+	+	+	-	+
31M	1	-	1,57 a	11,22 b	3,77 a	2,97 a	-	-	+	-	+
32M	7	-	1,39 a	12,47 a	3,87 a	3,22 a	-	-	+	-	+
33M	7	-	1,51 a	13,15 a	4,13 a	3,18 a	-	-	+	-	+
34M	3	-	1,50 a	12,5 a	4,05 a	3,08 a	-	-	-	-	+
35M	8	-	1,57 a	12,46 a	3,77 a	3,30 a	+	-	+	-	+
36M	7	-	1,40 a	13,20 a	3,97 a	3,32 a	-	+	-	-	+
37M	4	-	1,39 a	11,91 b	4,09 a	2,91 a	-	-	+	-	+
38M	8	-	1,58 a	11,41 b	3,84 a	2,97 a	+	-	+	-	+
39M	8	-	1,54 a	13,60 a	4,06 a	3,34 a	+	-	-	-	+
40M	5	-	1,31 a	13,43 a	4,04 a	3,32 a	+	+	-	-	+
41M	7	-	1,50 a	13,09 a	3,84 a	3,40 a	-	+	+	+	+
42M	6	-	1,44 a	12,36 a	3,88 a	3,18 a	-	-	+	-	+
43M	7	-	1,36 a	12,47 a	4,14 a	3,01 a	-	-	+	-	+
44M	1	-	1,45 a	13,47 a	3,90 a	3,45 a	+	-	+	-	+
45M	7	-	1,43 a	12,48 a	3,90 a	3,20 a	+	+	-	-	+
46M	8	-	1,33 a	12,99 a	4,17 a	3,11 a	+	-	-	-	+
47M	3	-	1,61 a	12,84 a	4,04 a	3,17 a	+	-	-	+	+
48M	8	-	1,15 a	11,09 b	2,95 a	3,75 a	+	-	-	-	+
49M	3	+	1,10 a	11,43 b	3,28 a	3,48 a	+	+	+	+	+
50M	7	-	1,50 a	12,54 a	3,74 a	3,35 a	-	-	+	-	+

*Coloração das colônias de acordo com a escala de notas apresentada na Tabela 02; *C: média do comprimento de 50 conídios; *L: média da largura de 50 conídios; *C/L: relação comprimento/largura dos conídios; *IVCM: índice velocidade do crescimento micelial. **Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Furtado et al. (1999), mediante análises morfométricas de isolados de *C. gloeosporioides* em seringueira, verificaram que as médias da relação comprimento/largura dos conídios variavam de 3,16 a 4,15 μm , sendo considerado mais ovalados os conídios dos isolados que apresentavam menor valor de relação C/L. Da mesma forma Veras, Gasparotto e Menezes (1997) observaram que o tamanho dos conídios pela relação C/L, pode ser um bom parâmetro quando o objetivo é avaliar o formato dos conídios.

Nesse estudo, embora tenha sido constatado diversidade fenotípica, entre os isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de mangueira, não foi possível identificar espécies utilizando somente estes critérios. Dessa forma, os resultados confirmam informações contidas na literatura de que apenas caracteres morfológicos não são suficientes para o estabelecimento de táxons em *Colletotrichum* (ANDRADE et al., 2007; MEHTA; MEHTA, 2010). Entretanto, o conhecimento das características fenotípicas dos isolados são importantes em trabalhos de rotina, e para conhecimento geral e acadêmico dos respectivos gêneros de fungos, incluindo *Colletotrichum*.

5.3.2. Patogenicidade cruzada

Todos os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de lesões típicas da antracnose em manga mostraram-se patogênicos em mangas (Figura 1). No entanto, quando foram inoculados em frutos de abacate, banana, goiaba e mamão a porcentagem de isolados que provocaram sintomas de antracnose foi baixa, dos quais apenas 48% dos isolados causaram sintomas em abacate, 24% em banana, 46% em goiaba e 24% em mamão (Tabela 4).

Os isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de mangueira não apresentaram especificidade fisiológica, sendo alguns deles patogênicos em frutos das diversas espécies de plantas inoculadas, convergindo com resultados obtidos por outros investigadores (Peres et al., 2002; Lima Filho, Oliveira e Menezes, 2003; Silva et al., 2006; TAKAHASHI, 2008 e BONETT et al., 2010)

McDonald e Linde (2002), propuseram que fitopatógenos sob contínua recombinação sexual atingem altos níveis de diversidade genética, atuando na

formação de novas raças e/ou genótipos capazes de se adaptar a diferentes hospedeiros.



Figura 1. Vista parcial de frutos de mangueira, da variedade Palmer, com sintomas de antracnose.

Embora durante o armazenamento, não seja comum o fungo ser disseminado de uma fruta para outra, sabe-se que um único isolado pode infectar hospedeiros diferentes. Dessa forma, conídios de *Colletotrichum* spp. produzidos em outros hospedeiros, como abacate, mamão, banana e goiaba, também podem infectar e causar doença em frutos de mangueira.

5.3.3. Análise de agrupamento das características morfo culturais e teste de patogenicidade

A análise conjunta, por meio do agrupamento pelo método hierárquico, levou em conta os dados relativos às características morfo culturais e do teste de patogenicidade cruzada, interligou as amostras por suas associações, gerando um dendrograma onde, amostras semelhantes segundo as variáveis escolhidas, foram

agrupadas entre si. Como resultado da análise aplicada houve a formação de três grupos de isolados, identificados como: Grupo I, Grupo II e Grupo III (Figura 2).

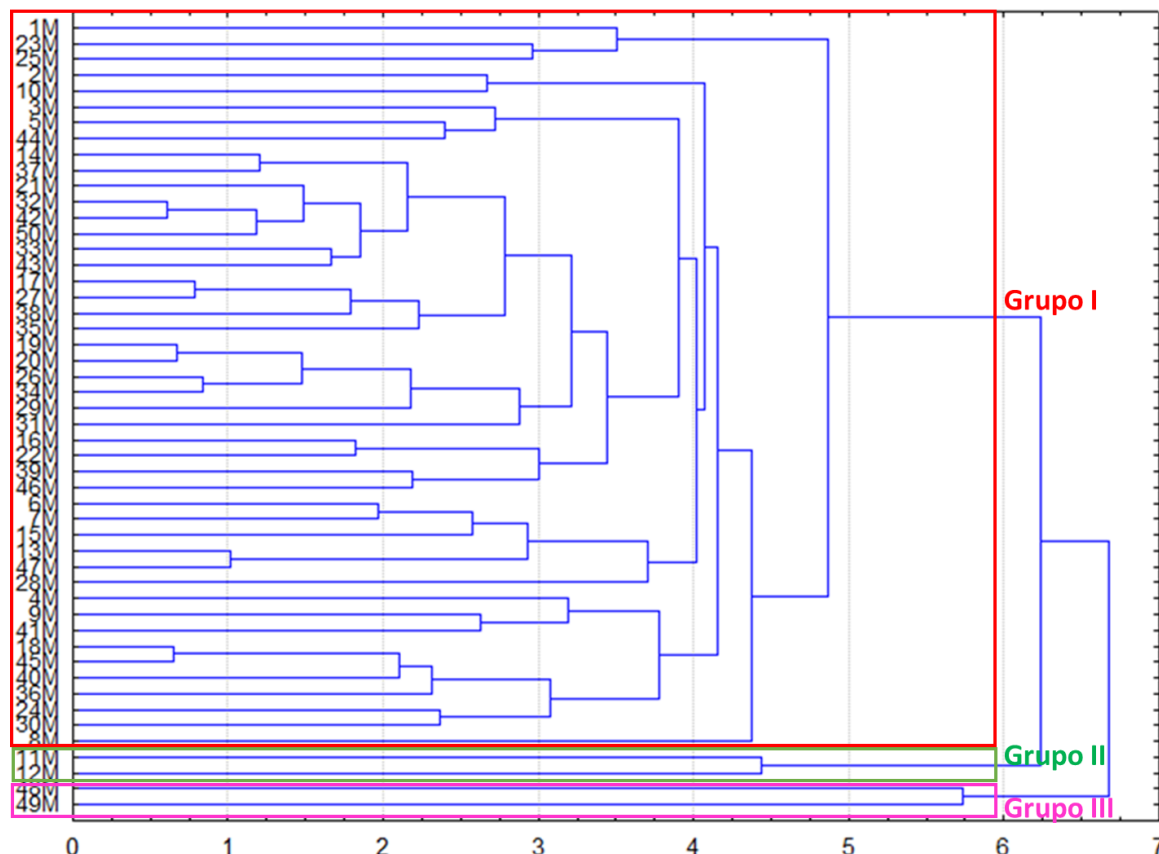


Figura 2. Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico com a consequente formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, morfometria de conídios, presença ou ausência de setor e patogenicidade cruzada.

A análise dos componentes principais possibilitou visualizar as características mais discriminantes, a qual deu origem ao agrupamento. Os dois primeiros componentes principais permitiram explicar 37,19% da variância contida nas variáveis originais. Os componentes principais 1 (Factor 1) e 2 (Factor 2) contribuíram com 19,83% e 17,36%, respectivamente, da variância remanescente. Assim, o conjunto inicial de dez variáveis dependentes passou a ser caracterizado por duas novas variáveis latentes independentes, o que possibilitou sua localização

em figuras bidimensionais, com ordenação dos isolados por componentes principais (Figura 3).

O Grupo I foi composto por 92% dos isolados avaliados, cujo agrupamento resultou da baixa diversidade dos dados morfométricos dos isolados. As variáveis relativas a coloração de colônia, presença de setores e patogenicidades foram responsáveis pela formação dos subgrupos, dentro do Grupo I

Os isolados de *Colletotrichum* spp. que apresentaram característica única encontram-se distantes do centro da figura (fluxo de massa), sendo visualizados com maior facilidade por meio da distribuição na análise de coordenadas principais, e se constituíram nos Grupos II e III (Figura 3).

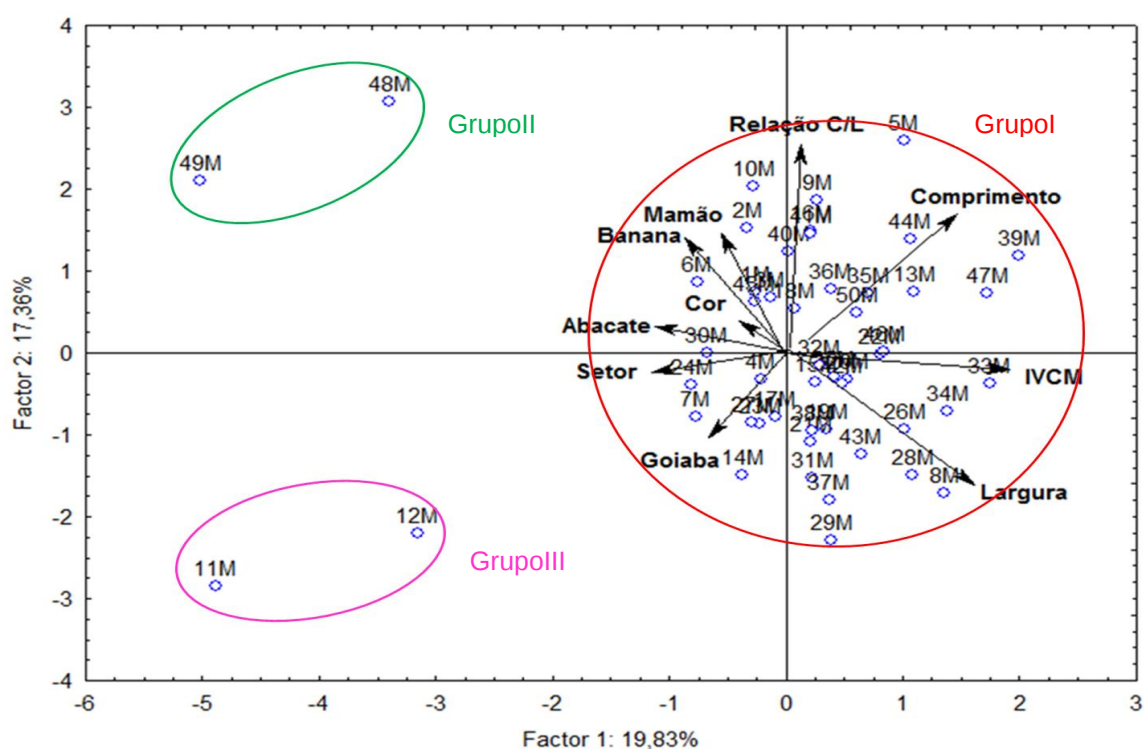


Figura 3. Biplote mostrando a projeção das variáveis coloração das colônias, morfometria dos conídios, presença e ausência de setor e patogenicidade nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com distribuição dos 50 isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados dos Grupos II, 11M e 12M, e III, 48M e 49M, apresentam características muito particulares, sendo discriminantes dos demais isolados avaliados neste estudo. O isolado 11M possui a menor média de comprimento dos

conídios, enquanto que o isolado 12M apresentou a menor relação de comprimento/largura. Já o isolado 48M se destacou por exibir menor média de largura dos conídios, enquanto o isolado 49M foi o único isolado que se mostrou simultaneamente patogênico para frutos de abacate, banana, goiana e mamão.

5.3.4. Caracterização molecular

A análise filogenética realizada com base nas sequências nucleotídicas concatenadas das regiões ITS, CL e β -tubulina resultou na formação de uma árvore composta por 71 táxons, sendo 50 sequências de isolados de *Colletotrichum* spp. e 21 espécies, cujas sequências foram retiradas do GeneBank para determinação do índice de similaridade. A matriz de dados conteve um total de 1.705 caracteres.

Esta análise gerou o agrupamento dos isolados em dois clados (Figura 4). O clado maior foi composto por espécies pertencentes ao ‘complexo *C. gloesporioides*’, enquanto o segundo clado dividiu-se em dois sub-clados, sendo um correspondente a espécies pertencentes ao ‘complexo *C. boninense*’ (DAMM et al, 2012), e outro com espécies relacionadas ao ‘complexo *C. acutatum*’ (DAMM et al., 2012)

Dentre os isolados agrupados no clado onde situam-se as espécies do ‘complexo *C. gloesporioides*’ foi constatada proximidade filogenética dos isolados 1M, 4M, 6M, 7M, 8M, 10M, 13M, 15M, 16M, 17M, 18M, 19M, 20M, 22M, 26M, 28M, 31M, 32M, 37M, 38M, 39M, 42M, 43M, 47M e 50M e a espécie *C. asianum*, indicando que estes isolados pertencem a esta espécie.

Os isolados 2M, 14M, 21M, 23M, 27M, 29M, 34M e 36M agruparam-se em um clado, filogeneticamente próximos a espécie *C. assianum*, assim como os isolados 3M, 33M e 46M. Aparentemente estes isolados, de ambos clados, integram dois espécies diferentes às descritas em associação a frutos de manga.

A espécie *C. asianum* foi descrita por Prihastuti et al. (2009) em cafeeiros na Tailândia. Posteriormente, sua presença foi também descrita na Austrália, Colômbia, Japão, Panamá e nas Filipinas (Weir et al., 2012). No Brasil, esta espécie foi relatada causando sintomas de antracnose em manga na região nordeste (Lima et al., 2013), assim como no estado de São Paulo (Tozze Junior et al., 2015).

Ainda dentro do clado compartilhados por isolados pertencentes ao ‘complexo *C. gloesporioides*’ foi possível identificar os isolados 9M, 40M, 41M, 44M e 45M

como pertencentes a espécie *C. dianesii*. Já os isolados 24M e 30M mostraram-se mais próximos evolutivamente desta espécie, embora não se compartilhem do mesmo clado. Esta espécie foi descrita por Lima et al. (2013) causando antracnose em frutos de mangueira no nordeste brasileiro. Para o estado de São Paulo trata-se do seu primeiro relato em associação com mangueiras neste Estado.

Os isolados 11M, 12M, 48M e 49M foram os que exibiram maior distância filogenética em relação aos demais isolados avaliados, os quais não integraram o 'complexo *C. gloeosporioides*'. Os isolados 11M e 48M exibiram maior proximidade filogenética às espécies do 'complexo *C. boninense*', enquanto os isolados 12M e 49M estão mais relacionadas evolutivamente às espécies do 'complexo *C. acutatum*'. Na análise morfocultural e patogênica esses quatro isolados também se distanciaram dos demais, convergindo os resultados obtidos mediante a análise molecular.

De acordo com a análise molecular, assim como na análise morfocultural e teste de patogenicidade, não foi observado relação entre origem geográfica, hospedeiro (variedade) e diversidade genética entre os 50 isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados.

Até há poucos anos, os sintomas de antracnose em mangas e em muitas outras fruteiras tropicais eram atribuídos a *C. gloeosporioides* (Santos Filho e Matos 2003; Ribeiro 2005). Tal fato advinha dos protocolos aplicados quando da identificação do fungo, consistiam em somente aspectos morfoculturais e testes de patogenicidade. Posteriormente, diante das dificuldades e equívocos, o advento de análises e informações moleculares, passou a ser aplicado em uma abordagem polifásica. Esta abordagem foi substancialmente importante para a taxonomia do gênero *Colletotrichum*.

Colletotrichum asianum apresentam conídios de aproximadamente 12.87 μm (± 2.52) de comprimento e 3.40 μm (± 0.46) de largura e tipicamente suas colônias são de cor branca/verde/cinza com o reverso de coloração verde escura (PRIHASTUTI et al., 2009). Dentre as plantas frutíferas que são apontadas como hospedeiros incluem as culturas da manga e café (Weir, 2012).

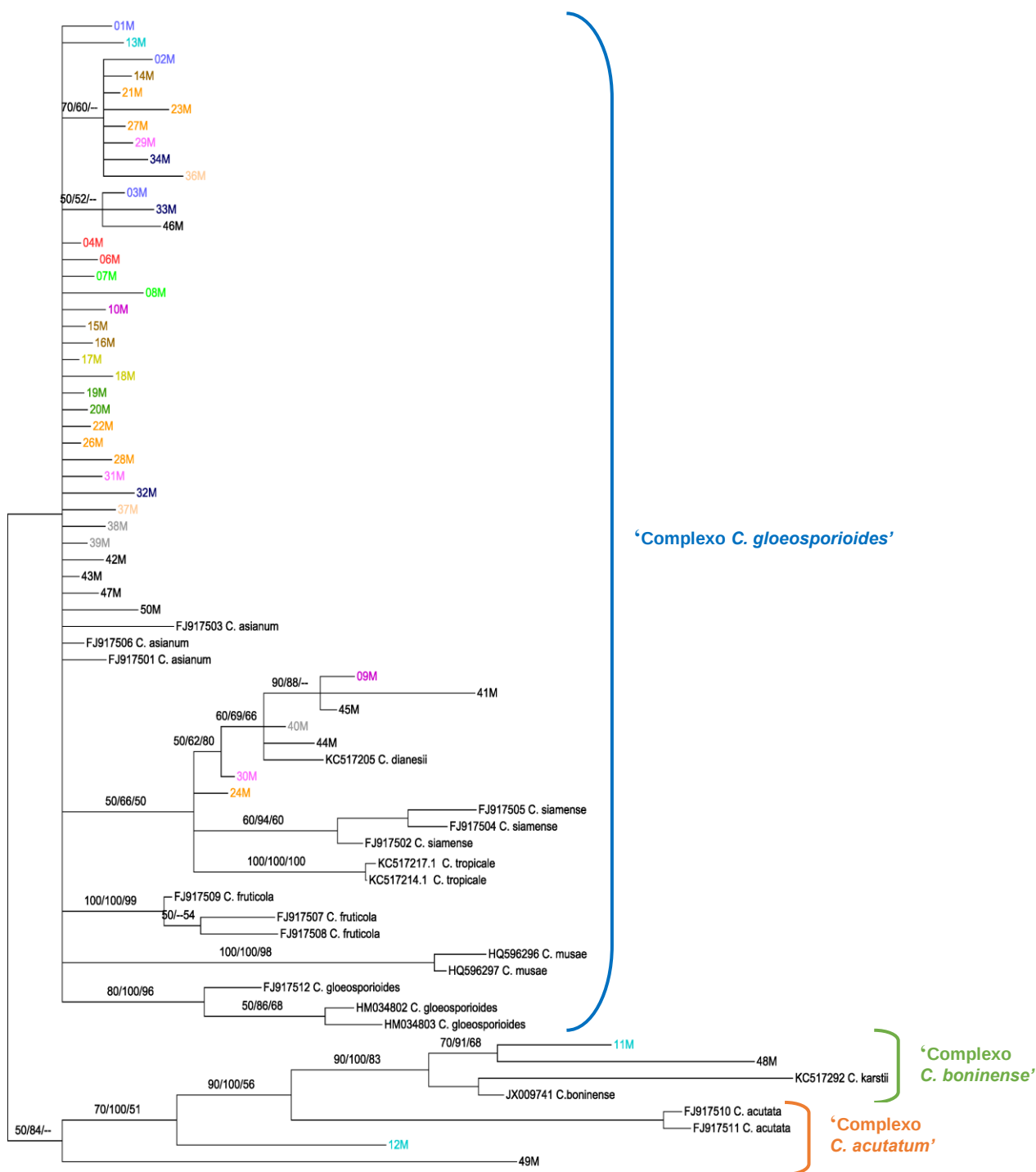


Figura 4. Árvore filogenética de inferência Bayesiana dos 50 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de frutos de mangueiras. A árvore foi construída com base nas sequências das regiões ITS, CL e TUB. Os valores acima dos ramos representam a porcentagem da probabilidade posterior e *Bootstrap* das análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança.

Colletotrichum dianesii apresentam conídios variam $10,6-14,3 \times 3,9-5,2 \mu\text{m}$, e tipicamente suas colônias são de cor branca/castanho claro a rosada e reverso amarelo-claro a rosado (LIMA et al., 2013).

No Brasil, *C. dianesi* foi relatado em frutos de manga no nordeste (LIMA et al., 2013), de tal forma que amplia-se portanto sua faixa de hospedeiros nesse país.

De forma semelhante ao aplicado para o complexo *C. gloeosporioides*, os complexos *C. acutatum* e *C. boninensis* passaram também por uma ampla revisão, a partir da qual novas espécies integrantes dos mesmos passaram a ter novas designações.

5.4. CONCLUSÕES

- Existe diversidade morfocultural entre os isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de mangueira com sintomas de antracnose.
- Os critérios morfoculturais abordados neste estudo não foram suficientes para distinguir espécies do gênero *Colletotrichum*.
- Os sintomas de antracnose em frutos de mangueiras, no estado de São Paulo, devem-se às espécies *C. asianum* e *C. dianesii* e, aparentemente, duas espécies adicionais não mencionadas na literatura.
- Sob condições de laboratório, *C. asianum*, *C. dianesii*, e fungos integrantes dos complexos *C. boninensis* e *C. acutatum* não apresentam especificidade fisiológica, sendo capazes de causar sintomas de antracnose em frutos de manga, assim como em abacate, banana, goiaba e mamão.
- Não há relação entre variedades e origem geográfica nos isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em mangas no estado de São Paulo e Petrolina-PE.

REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J.E.; FORSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed). *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions*. St. Paul: American Phytopathological Society, p. 317-336, 2000.
- AGRIANUAL 2014: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2014. p. 328-334.
- ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G. Doenças da mangueira. In: FEIRA NACIONAL DA AGRICULTURA IRRIGADA, 1, Petrolina, PE, Brasil, 2008. Minicursos [CD-ROM]. Petrolina, 2008.
- BONETT, L.P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R.G.A.; AQUINO, T.F.; BERNARDIWENZEL, J. Caracterização morfocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência Guarapuava**, Guarapuava, v. 6, n. 3, p. 451-463, 2010.
- CANNON, P. F., DAMM, U., JOHNSTON, P. R., WEIR, B. S. *Colletotrichum* current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, p.181-213, 2012.
- CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). ***Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction***. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, p. 1-20. 2000.

CHOI, K.J.; KIM, W.G.; KIM, H.G.; CHOI, H.W.; LEE, Y.K.; LEE, B.D.; LEE, S.Y.; HONG, S.K. Morphology, molecular phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum panacicola* causing anthracnose of Korean ginseng. *Plant Pathology*, London, v. 27, n.1, p. 1-7, 2011.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, New York, v. 101, n. 5, p. 648-656, 2009.

DAMM U, CANNON PF, WOUDEBERG JHC, JOHNSTON PRP, WEIR BS, TAN Y, SHIVAS RG, CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies Mycology** 73:1-36, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies Mycology** 73:37-113, 2012.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

FURTADO, E.L.; BACH, E.E.; KIMATI, H.; MENTEN, J.O.M.; SILVEIRA, J.A. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 3, p. 222-228, 1999.

HYDE; K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN ,Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 147-182, 2009.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit. **Plant Pathol** 39:353-366, 1990.

JOHNSTON, P. R. The importance of phylogeny in understanding host relationships with *Colletotrichum*. In: **PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, p. 21-28. 2000.

JOHNSTON, P. R.; DODD, S.; PARK, D.; MASSEY, B.; CHARUCHINDA, B.; WAIPARA, N.; BUCKLEY, T. Are stable, consistent, reliable, and useful species names possible within *Colletotrichum*? In: **PERES, A. N.; TIMMER, L. W. (Orgs.). Colletotrichum diseases of fruit crops. INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY**, 9th, Torino. Pre-Congress Workshop. Pisa: Italian Society for Plant Pathology; Milano: Italian Association for Plant Protection, p. 1-7. 2008.

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

LIMA, N. B.; BATISTA, M. V. A.; MORAIS JR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D. CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61: p.75–88, 2013.

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

MAIA, V. M.; SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L.; PUSCHMANN, R.; MOTA FILHO, V. J. G.; CECON, P. R. Tipos e intensidade de danos mecânicos em

bananas 'prata-anã' ao longo da cadeia de comercialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 365-370, 2008.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, New York, v.40, p.349-79, 2002.

MDIC/SECEX. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior/Secretaria de Comércio Exterior. Alice web: dados das exportações brasileiras por período. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.aliceweb2.mdic.gov.br/>>. Acesso em: dez. 2015.

MEHTA, Y.R.; MEHTA, A. Genetic variability among the isolates of *Colletotrichum gossypii* of cotton. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.40- 44, 2010.

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 26 (6):1135-1142, 2002.

NELSON, S. C. Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Plant Disease**, St. Paul, PD-48, 9 p., 2008.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; ABD-ELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity** 44:33-43, 2010.

PLOETZ, R. C. Mango diseases caused by fungi: anthracnose. IN: PLOETZ, R. C., ZENTMEYER, G. A., NISHIJIMA, N. T., ROHRBASCH, K. G.; OHR, H.D. **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press, p. 13,. 1994.

PLOETZ, R.C. Diseases of mango. In: Ploetz RC (ed) Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing, Wallingford. p 327-363, 2003.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 89-109, 2009.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. **The Journal of Plant Diseases** 77:114-119, 1993.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira. In: **KIMATI H, AMORIM L, REZENDE JAM, BERGAMIN FILHO A, CAMARGO LEA (eds) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4th edn. Ceres, São Paulo, pp 457-465, 2005.

SANTOS FILHO, H. P; MATOS, A.P. Doenças da mangueira. In: **FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (eds) Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 435-491, 2003.

SILVA, C., FONSECA, E., MOREIRA, M. Acultura da mangueira. Documento. Univerversiade Federal de Lavras, 2002. Disponível em: <<http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/56-boletins-de-extensao?download=1109:boletinsextensao>> Acesso em: dez. 2015.

SILVA, K.; REBOUÇAS, T.N.H.; LEMOS, O.L.; BOMFIM, M.P.; BOMFIM, A.A.; ESQUIVEL, G.L.; BARRETO, A.P.P; JOSÉ, A.R.S.; DIAS, N.O.; TAVARES, G.M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em

diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 131-133, 2006.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 696 p. [p. 523-537], 1980.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and it Anomorph *Colletotrichum*. In BAYLEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum, biology, pathology and control**. Wallingford: C. A. B. international, p. 1-26, 1992.

TAKAHASHI, L. M. **IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* DE ATEMÓIA (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), POR MEIO DE CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, CULTURAL E MORFOLÓGICA**. 2008. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L., MASSOLA, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 41, p. 270-280, 2015.

VERAS, S.M.; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisiomorfológica de *Colletotrichum graminicola* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 297-305, 1997.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology** 73, 115-180, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que tenham sido detectados diferenças morfológicas e culturais entre os isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de sintomas de antracnose de frutos de abacate, banana, goiaba e manga, estes foram insuficientes para a distinção de táxons.

O teste de patogenicidade cruzada, sob condições laboratório, indicou ausência de especificidade fisiológica entre espécies de *Colletotrichum* spp. oriundos de abacate, banana, goiaba e manga. Entretanto, dentre os isolados avaliados, apenas os oriundos de banana apresentaram uma faixa de hospedeiro mais restrita, já que estes não induziram à expressão de sintomas de antracnose em frutos de mamão. Estudos complementares, com avaliações a campo, poderão oferecer informações mais completas e conclusivas sobre a importância das espécies de *Colletotrichum* associadas e o relacionamento epidemiológico entre as diferentes interações.

A existência de novas espécies associadas a sintomas de antracnose pode ser decorrente de diversos mecanismos geradores de variabilidade em fungos mitospóricos, como a mutação e outros fatores que podem contribuir à variabilidade genética dos fungos, em condições naturais. Aliado a esse fato, tem-se que a antracnose é uma doença endêmica nas áreas de cultivo dessas frutíferas, onde múltiplas infecções ocorrem constante e simultaneamente, resultando em alta taxa de reprodução do patógeno, o que certamente amplia as chances na geração de variantes genéticos.

Mediante sequenciamento das regiões parciais dos genes da actina (ACT), glutamina sintase (GS), gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CL), β -tubulina (TUB) e ITS1-5.8S-ITS2 foi possível distinguir diversos táxons de *Colletotrichum* associados a sintomas de antracnose em frutos de abacate, banana, goiaba e manga. Neste contexto, para o estado de São Paulo foram confirmados a associação de *C. musae* e *C. siamense* a sintomas de antracnose em abacate e goiaba, enquanto que para manga foram constatado *C. asianum* e *C. dianesii*.

Para a taxonomia de certas espécies de patógenos, o emprego da região ITS1-5.8S-ITS2 pode se constituir em alternativa eficiente para a caracterização

taxonômica. Entretanto, não é o que se aplica para o caso de *Colletotrichum* associado a sintomas de antracnose em frutos de abacate, banana, goiaba e manga. Nesses casos, às vezes, mesmo com o sequenciamento das regiões parciais dos genes da actina (ACT), glutamina sintase (GS), gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), calmodulina (CL), β -tubulina (TUB) e ITS1-5.8S-ITS2, possíveis novas espécies podem manterem-se indefinidas. Tal situação aplica-se para o presente caso, como observado para isolados oriundos de frutos de manga com sintomas de antracnose. Também, em determinadas circunstâncias, apenas o emprego de três regiões mostraram-se eficientes para a caracterização taxonômica.