

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

GABRIEL LEONARDI ANTONIO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, MORFO-CULTURAL,
FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE
SERINGUEIRA E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE DIFERENTES CLONES A ESSE
PATÓGENO**

Ilha Solteira

2020

GABRIEL LEONARDI ANTONIO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, MORFO-CULTURAL,
FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE
SERINGUEIRA E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE DIFERENTES CLONES A ESSE
PATÓGENO**

Dissertação, apresentada à
Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira - UNESP
como
parte dos requisitos para a obtenção
do título
de Mestre em Agronomia.
Especialidade: Sistemas de
Produção

Prof. Dra. Ana Carolina Firmino
Orientadora

Ilha Solteira

2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

A635c Antonio, Gabriel Leonardi.
Caracterização e identificação molecular, morfo-cultural, fisiológica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. de seringueira e avaliação de resistência de diferentes clones a esse patógeno / Gabriel Leonardi Antonio. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2020
71 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2020

Orientador: Ana Carolina Firmino
Inclui bibliografia

1. Antracnose. 2. Variabilidade. 3. Resistência genética.


Raiane da Silva Santos
Supervisora Técnica de Saúde

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. DE SERINGUEIRA E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE DIFERENTES CLONES A ESSE PATÓGENO

AUTOR: GABRIEL LEONARDI ANTONIO

ORIENTADORA: ANA CAROLINA FIRMINO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA, área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a ANA CAROLINA FIRMINO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Prof. Dr. EVANDRO PEREIRA PRADO

Coordenadoria do Curso de Engenharia Agrônoma / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Prof. Dr. DIEGO CUNHA ZIED

Departamento de Engenharia Agrônoma / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Ilha Solteira, 31 de janeiro de 2020

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dr. Ana Carolina Firmino, pela paciência, ensinamentos e parceria durante esses anos.

Aos meus pais Carmen e Reinaldo e minha irmã Luisa, por sempre estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins.

A toda minha família, por sempre serem um apoio nos momentos em que preciso.

A minha república pelos 7 anos de convivência e histórias, dos fundadores aos moradores atuais e todos que passaram por aqui enquanto estive em Dracena.

A todos os amigos que fiz em Dracena durante o período que estive aqui.

A todos os que fazem parte do laboratório de Fitopatologia, Marcela Bergamini, Marcela Eloi, Izabela, Gustavo, Yago, Maria Eduarda, Carol e a todos que contribuíram no decorrer do trabalho.

A todos os professores, servidores e funcionários de campo da UNESP Dracena por fazerem da instituição um lugar especial pelas amizades cultivadas durante o período.

A Erivaldo José Scaloppi Júnior pela ajuda durante as coletas no Centro de Seringueira de Votuporanga – SP.

A FAPESP pelo apoio financeiro destinado ao projeto (Processo 2017/23927-3)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Apenas quando somos instruídos pela verdade
é que podemos muda-lá”
Bertolt Brecht

RESUMO

A cultura da seringueira (*Hevea brasiliensis*) apresenta grande importância dentro do agronegócio brasileiro. Apesar de o país não figurar entre os maiores produtores de látex no planeta, a heveicultura possui características positivas no aspecto socioambiental como a geração de empregos, cultivo em pequenas e médias propriedades e mitigação da emissão de gases do efeito estufa. Atualmente o Estado de São Paulo é o maior produtor de borracha natural do país, sendo que a área ocupada pelos seringais apresenta crescimento nos últimos anos, porém alguns fatores limitantes como os problemas fitossanitários, como a antracnose, limitam uma expansão ainda maior da cultura. A antracnose é uma doença fúngica causada por diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* que tem como principais sintomas manchas foliares e danos em pecíolos sendo que, em casos extremos, pode provocar queda de folhas, fato que leva a redução da produção de látex. Devido a alta variabilidade genética do patógeno e as dificuldades encontradas no controle da doença, este trabalho teve como objetivo caracterizar 17 isolados de *Colletotrichum* obtidos a partir lesões características de antracnose em folíolos de seringueira coletados em localidades distintas, e testar a resistência de diferentes clones de seringueira a doença. A caracterização dos isolados, realizada através de sequenciamento de parte do ITS, fatores morfo-culturais e patogênicos, indicou a presença de isolados causadores da doença pertencentes aos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, sendo verificada diferença na agressividade entre isolados. O teste de resistência clonal indicou graus de susceptibilidade a doença distintos entre os materiais estudados, assim como variação na resistência de cada clones aos 3 diferentes isolados de *Colletotrichum* utilizados. Os resultados obtidos confirmam a importância da identificação correta dos isolados em áreas com presença da doença e/ou expansão da cultura, e da implementação do clone adequado em relação aos patógenos presentes na área, além de servir como base para estudos futuros para o desenvolvimento de materiais genéticos resistentes a doença.

Palavras-chave: Antracnose. Variabilidade. Resistência genética.

ABSTRACT

The culture of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is of great importance within Brazilian agribusiness. Although the country is not among the largest producers of latex on the planet, rubber farming has positive characteristics in the socio-environmental aspect, such as job creation, cultivation in small and medium-sized properties and mitigation of greenhouse gas emissions. Currently, the State of São Paulo is the largest producer of natural rubber in the country, and the area occupied by rubber trees has grown in recent years, but some limiting factors such as phytosanitary problems, such as anthracnose, limit an even greater expansion of the crop. Anthracnose is a fungal disease caused by different species of the genus *Colletotrichum* whose main symptoms are leaf spots and damage to petioles and, in extreme cases, can cause leaf fall, a fact that leads to reduced latex production. Due to the high genetic variability of the pathogen and the difficulties encountered in controlling the disease, this study aimed to characterize 17 *Colletotrichum* isolates obtained from characteristic anthracnose lesions in rubber tree leaflets collected in different locations, and test the resistance of different rubber tree clones to disease. The characterization of the isolates, carried out by sequencing the ITS region, morpho-cultural and pathogenic factors, indicated the presence of disease-causing isolates belonging to the *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* complexes, with a difference in aggressiveness among isolates. The clonal resistance test indicated different degrees of susceptibility to disease among the studied materials, as well as variation in the resistance of each clone to the 3 different *Colletotrichum* isolates used. The results obtained confirm the importance of the correct identification of the isolates in areas with the presence of the disease and / or expansion of the culture, and of the implementation of the appropriate clone in relation to the pathogens present in the area, in addition to serving as a basis for future studies for the development of genetic materials resistant to disease.

Keywords: Anthracnose. Variability. Control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Sintomas típicos de antracnose	26
Figura 2	- Inoculação dos isolados a partir de discos de discos de micélio para realização do teste de patogenicidade	28
Figura 3	- (1) reto com ápice obtuso; (2) cilíndrico; (3) oblongo-cilindráceo; (4) reto com constrição; (5) oblongo; (6) reto, com ápice afilado. A barra representa a medida de 10 µm	30
Figura 4	- Diferença entre sintomas provocados por diferentes isolados: (1) CH 5, (2) CH 19, (3) CH 94, (4) CH 1, 6 dias após a inoculação	34
Figura 5	- Dendrograma obtido a partir dos resultados de sequenciamento das regiões ITS 1/4; modelo estatístico Jukes Cator	40
Figura 6	- Colônias dos isolados CH 1 (A e B) e CH 25 (C e D)	41
Figura 7	- Conídios dos isolados CH 1 (A), CH 138 (B) e CH 93 (C). A barra representa a medida de 10 µm	42
Figura 8	- Conídios dos isolados CH 1 (A), CH 138 (B) e CH 93 (C)	42
Figura 9	- Conídios dos isolados CH 63 (A), CH 23 (B) e CH 63 (C). A barra representa a medida de 10 µm	43
Figura 10	- Colônias dos isolados CH 5 (A e B) e CH 112 (C e D)	43
Figura 11	- Conídios dos isolados CH 5 (A) e CH 112 (B). A barra representa a medida de 10 µm	44
Figura 12	- Colônia do isolado CH 145 (A e B)	44
Figura 13	- Conídios dos isolados CH 145 (A) e CH 146 (B). A barra representa a medida de 10 µm	45
Figura 14	- Diferença de sintomas entre os clones (1) IAC 507, (2) IAC 511 e (3) PC 217, no terceiro dia de avaliação	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Descrição e procedência dos isolados utilizados no trabalho	32
Tabela 2	- Porcentagem de área lesionada de folíolos de seringueira inoculados com diferentes isolados de <i>Colletotrichum</i> spp	33
Tabela 3	- Coloração de colônias de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. 5 dias após a repicagem em meio BDA sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas	35
Tabela 4	- Velocidade de crescimento de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em mm.dia ⁻¹ sob fotoperíodo de 12 horas e diferentes temperaturas	36
Tabela 5	- Comprimento (µm), amplitude de comprimento (µm), largura (µm), amplitude de largura (µm), relação comprimento/largura (µm) e formato de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp	38
Tabela 6	- Porcentagem de área foliar lesionada 3 dias após a inoculação de <i>Colletotrichum</i> sp. em folíolos de seringueira	59
Tabela 7	- Porcentagem de área foliar lesionada 6 dias após a inoculação de <i>Colletotrichum</i> sp. em folíolos de seringueira.	60
Tabela 8	- Porcentagem de lesão causada pelos isolados CH 93, CH 102 e CH 130, 6 dias após a inoculação dos mesmos em folíolos de seringueira	63
Tabela 9	- Porcentagem de área foliar com sintomas de antracnose de folíolos de diferentes clones de seringueira coletados em jardim clonal no município de Votuporanga-SP	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	ANTRACNOSE	13
2.2	ANTRACNOSE	14
2.3	AGENTE CAUSAL	14
2.4	SINTOMATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA	15
2.5	CONTROLE	16
2.6	IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO DE <i>COLLETOTRICHUM</i>	16
	REFERÊNCIAS	18
2	CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, MORFO-CULTURAL, FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM SPP. DE SERINGUEIRA	22
2.1	INTRODUÇÃO	24
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.2.1	Obtenção e preservação de isolados	25
2.2.2	Teste de patogenicidade	27
2.2.3	Caracterização cultural e fisiológica	28
2.2.4	Caracterização morfológica	29
2.2.5	Extração de DNA	31
2.2.6	Caracterização filogenética	31
2.3	RESULTADOS	31
2.3.1	Denominação dos isolados	31
2.3.2	Teste de patogenicidade	32
2.3.3	Caracterização cultural dos isolados	35
2.3.4	Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas	36
2.3.5	Caracterização morfológica	37
2.3.6	Caracterização genética	39
2.4	DISCUSSÃO	41

2.5	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50
3	CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO INICIAL DE RESISTÊNCIA DE CLONES DE SERINGUEIRA A <i>COLLETOTRICHUM SP</i>	54
3.1	INTRODUÇÃO	56
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.2.1	Avaliação dos clones em laboratório	57
3.2.2	Avaliação dos clones em jardim clonal	58
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.3.1	Avaliação dos clones em laboratório	58
3.3.2	Avaliação dos clones em jardim clonal	64
3.4	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
	REFERÊNCIAS	71
	GLOSSÁRIO	78

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) é uma espécie da família Euphorbiaceae que tem como centro de origem a floresta amazônica. Esta espécie é utilizada comercialmente para extração de látex, fonte de borracha natural (ALVARENGA; CARMO, 2008).

O Sudeste Asiático, com destaque para Malásia e Tailândia, concentra 92% da produção global de borracha natural (CORRÊA *et al.*, 2018), enquanto o Brasil, centro de origem da cultura, atualmente é responsável por apenas 1,5% da produção mundial.

Segundo o IBGE, em 2016, havia 147 mil hectares de seringais em produção no Brasil, que somados representaram uma produção de 180 mil toneladas de borracha seca. Essa produção atende apenas 46% da demanda nacional, portanto 54% da borracha natural necessária para atender o mercado interno anualmente é provida de importações (SCALOPPI; FREITAS; GONÇALVES, 2017). O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, sendo responsável por 60% da borracha natural produzida no país. A safra 2017/2018 representou um aumento de 11% da produção de coágulo e de 14,2% da área plantada do Estado em relação a safra 2016/2017 (OLIVEIRA; GONÇALVES, 2019).

Entre os fatores limitantes para maior expansão da cultura em território brasileiro estão os problemas fitossanitários, sendo um deles a antracnose. A antracnose é uma doença fúngica causada por diferentes espécies do gênero *Colletotrichum*, considerado um dos mais importantes gêneros de fitopatógenos do mundo devido a seu impacto econômico em diversas culturas agrícolas e sua distribuição cosmopolita, com a presença em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (SUTTON, 1992).

No Brasil, a antracnose já foi relatada em diversos Estados como São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo e no Norte do país, onde ocorre associada ao mal-das-folhas ou em plantas com estresse nutricional (FURTADO; TRINDADE, 2005).

O manejo da antracnose da seringueira apresenta algumas dificuldades como a alta variabilidade genética e plasticidade fenotípica do gênero *Colletotrichum*, que pode levar a identificação incorreta do agente causal (MENEZES, 2006), alternativas limitadas

ao controle químico, que além de representar riscos a trabalhadores e ao meio ambiente (BETTIOL *et al.*, 2014), no caso dessa doença apresenta limitações técnicas como a existência de apenas dois produtos registrados (AGROFIT) e problemas de resistência do patógeno devido a ausência de rotação de ingredientes ativos e variabilidade de genética do agente causal.

Devido a importância da identificação dos agentes causais da antracnose da seringueira e a necessidade de novas formas de manejo da doença, este trabalho teve como objetivo caracterizar diferentes isolados de *Colletotrichum* de seringueira e identificar fontes de resistência ao patógeno entre diferentes clones utilizados comercialmente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA SERINGUEIRA

O látex, extraído de plantas de seringueira, é um dos produtos considerados para a economia mundial. É uma matéria-prima essencial para a indústria de pneus que utiliza aproximadamente 75% de toda a produção global de borracha natural. Além da fabricação de pneus, o látex também pode ser utilizada na confecção de luvas e outros materiais cirúrgicos (SOMAIN; DROULERS, 2016). A produção de látex se inicia a partir do sexto ou sétimo ano após a implantação da cultura e pode se estender por mais 30 anos, sendo que após o fim da produção de látex a madeira das árvores pode ser utilizada na indústria moveleira (IAPAR, 2004).

A heveicultura possui impactos sociais positivos dentro do Brasil. Apesar de o país, não figurar entre os maiores produtores de borracha natural, a cultura da seringueira é capaz de fixar populações rurais no campo, já que é um cultivo com alta demanda de mão-de-obra e adequado a pequenas propriedades. Em 2016 o setor gerou cerca de 80 mil empregos diretos no país (BRAGA, 2016).

Atualmente a seringueira também é vista como uma cultura que gera impactos ambientais positivos devido a fixação de carbono durante o desenvolvimento da cultura, tanto na planta e no solo quanto na própria borracha natural produzida a partir de látex que é composta por 88% de carbono, sendo uma alternativa sustentável em relação a borracha sintética produzida a partir de petróleo (SILVA, 2014).

Mesmo com os impactos positivos da heveicultura nos setores econômico, social e ambiental a cultura ainda enfrenta desafios para a sua expansão no Brasil, entre eles estão os problemas fitossanitários. O mal-das-folhas, doença fúngica provocada por *Mycrocyclus ulei*, dizimou seringais na região Norte entre as décadas de 1920 e 1940 (HOLIDAY, 1970) e posteriormente também acarretou grandes perdas em seringais instalados nos litorais da Bahia e de São Paulo (FURTADO *et al.*, 2015). Devido aos danos causados por esse patógeno a cultura da seringueira passou a ser instalada em regiões mais secas e menos propensas a doença, como o Planalto Paulista (região entre a Serra do Mar e Campinas), porém em anos mais úmidos a doença ainda pode acarretar

problemas (FURTADO *et al.*, 2015).

A antracnose da seringueira, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, foi identificada em regiões de escape do mal-das-folhas, como o Planalto e o Baixo Sul Baiano e também representa um fator limitante para a expansão da cultura (FURTADO; TRINDADE, 2005; SANTOS, 2018).

2.2 ANTRACNOSE

O primeiro relato da antracnose da seringueira foi realizado no Sri Lanka em 1905 (PETCH, 1921), atualmente a doença é tida como um problema fitossanitário em diversas regiões produtoras do planeta como China, Índia, Tailândia, Oeste da África, onde é considerada um dos principais fatores para a queda de produtividade (THAMBUGALA; DESHAPPRIYA, 2009) e na Colômbia, onde é considerada a segunda doença foliar com maior potencial de dano (STERLING *et al.*, 2011).

No Brasil a doença já foi relatada em diversas regiões provocando danos em folhas, inflorescências e ponteiros, áreas com relatos da doença já foram encontradas nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo e no Norte do país, onde ocorre associada ao mal-das-folhas ou em plantas com estresse nutricional. (FURTADO; TRINDADE, 2005).

No Estado de São Paulo a antracnose foi primeiramente relatada em seringais do município de Porto Feliz atacando folhas, ramos e inflorescência (SILVEIRA, CARDOSO, 1987). Em 1988 foi constatada no município de Tupã a presença de *C. gloeosporioides*, causando danos ao painel de sangria de seringueiras (SILVEIRA *et al.*, 1992).

2.3 AGENTE CAUSAL

A primeira descrição do agente causal da antracnose, de Carpenter e Stevenson (1954), identificou o agente causal da doença com *Glomerella cingulata*, o telemorfo de *Gloeosporium* e *Colletotrichum*.

C. gloeosporioides foi relatado como o agente causal da doença na Malásia e em regiões tropicais (HILTON, 1959; WASTIE, 1967), enquanto *C. acutatum* foi descrito como

patógeno de seringueira na Sumatra por Brown e Soepena (1994) e por Jayasinghe, Fernando & Priyanka (1997) no Sri-Lanka, onde foi considerado o principal agente causal. Saha (2002), identificou diferenças entre os sintomas dessas espécies em folhas de seringueira. Outras espécies como *C. dematium*, *C. crassipes*, *C. karstii*, e *C. boninense*, *C. siamense*, *C. ledongense* e *C. australisinese* também foram descritas como agentes causais da doença (WASTIE; JANARDHANAN, 1970; CAI, 2016; JIANG *et al.*, 2016; LIU, *et al.*, 2018).

Sarmiento (2013) identificou diferentes complexos de espécies causando a doença no Brasil (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense*) por meio de amostras providas de Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso e Manaus, apesar de não ter identificado as espécies. Santos (2018), também identificou os três complexos causando antracnose em seringais no sul da Bahia.

2.4 SINTOMATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

Diferentes tecidos da seringueira são afetados pela antracnose. Nas folhas, ramos e pecíolos os sintomas se manifestam nas brotações novas, causando pequenas lesões arredondadas de coloração marrom-avermelhada que podem coalescer. Nos pecíolos e ramos, provocam lesões escuras, necróticas e deprimidas. Em condições de ataque severo, ocorre desfolhamento, morte da gema apical e seca descendentes dos ramos. Em todos os órgãos afetados há grande produção de esporos, envoltos em massa de coloração alaranjada (FURTADO; TRINDADE, 2005). No painel de sangria os sintomas se caracterizam pela presença de lesões secas e deprimidas, com forma elíptica, localizadas acima do corte de sangria (SILVEIRA *et al.*, 1992), podendo coalescer e danificar grande parte do painel (FURTADO; TRINDADE, 2005). Os sintomas também podem diferir entre as espécies de *Colletotrichum*, enquanto *C. acutatum* provoca pontos salientes nas folhas, *C. gloeosporioides* causa sintomas típicos de antracnose e lesões semelhantes a papel (SAHA *et al.*, 2002).

Em condições de campo as infecções são ocasionadas por conídios produzidos em massas a partir dos acérvulos, embora os ascósporos do fungo, produzidos em peritécios formados nas folhas velhas ou outros órgãos mortos, também

possam causar infecções. Após a disseminação por respingos de chuva ou ventos, os esporos do agente causal entram em contato com o tecido da seringueira e a germinação ocorre dentro de um período de 4 a 6 horas, a penetração nas células ocorre através de apressórios e após a colonização os sintomas iniciais podem aparecer em folhas, inflorescências e frutos (MENEZES, 2002). Condições de umidade relativa do ar superior a 90% durante 13 horas por dia favorecem a ocorrência severa da doença (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

2.5 CONTROLE

Atualmente há dois defensivos químicos registrados para o controle da doença no AGROFIT, um deles é uma mistura de fluxapiroxade (carboximida) e piraclostrobina (estrobirulina) e o outro um propiconazol (triazol), sendo o controle químico a principal alternativa para o manejo da doença (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

Porém devido a alta variabilidade genética do agente causal da doença a sensibilidade aos fungicidas pode diferir entre os isolados, como já relatado por Tozze Júnior (2017), onde as espécies *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides*, patogênicas a pimentão, apresentaram sensibilidades distintas aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol.

Santos (2018), estudou a sensibilidade de diferentes clones de seringueira a diferentes isolados e espécies de *Colletotrichum* e relatou que a suscetibilidade dos clones e a agressividade dos isolados variam dentro da interação isolado x clone. Contudo ainda poucos trabalhos visando a resistência genética a doença (GASPAROTTO *et al.*, 2012)

2.6 IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO DE *COLLETOTRICHUM*

A correta identificação do agente causal de uma doença é fundamental para a compreensão do patossistema e para se estudar estratégias de manejo da doença no campo.

Estudos morfológicos e fisiológicos como os de tamanho e formato de esporos,

coloração de colônia, velocidade de crescimento micelial e sensibilidade a fungicidas são utilizadas comumente para caracterização de espécies de *Colletotrichum* que afetam seringueira (JAYASINGHE, 1998; SIERRA, 2010; SARMIENTO, 2013; SANTOS, 2018). Porém esses mesmos autores também utilizaram técnicas moleculares complementares para diferenciar os grupos de espécies dos agentes causais da antracnose da seringueira, já que a plasticidade fenotípica do gênero *Colletotrichum* torna a caracterização morfológica imprecisa (MENEZES, 2006).

Dentre as regiões do genoma já estudadas para este gênero, a ITS é a que possui maior número de sequências depositadas. 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).

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A. A.; CARMO, C. A. F. **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. 894 p.
- BETTIOL, W.; MAFFIA, L. A.; CASTRO, M. L. M. P. Control biológico de enfermedades de plantas en Brasil. *In*: BETTIOL, W.; RIVERA, M. C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE, J. R.; COLMENAREZ, Y. C. (ed.). **Control biológico de enfermedades de plantas em América Latina y el Caribe**. Montevideo: Universidad de la República, 2014. p. 91-138.
- BRAGA, C. S. **Indicadores econômicos da produção de borracha natural no Brasil**. Brasília, DF: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/artigos/artigo-tecnico-indicadores-economicos-da-producao-de-borracha-natural-no-brasil>. Acesso em: 27 nov. 2019.
- BROWN, A.; SOEPENA, H. Pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves of *Hevea* spp. **Mycological Research**, London, v. 98, n. 3, p. 264-266, 1994.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 39, p. 183-204, 2009.
- CAI, Z. Y.; LIU, Y. X.; SHI, Y. P.; MU, H. J. First Report of Leaf Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* of Rubber Tree in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 12, p. 2528, 2016.
- CARPENTER, J. B.; STEVENSON, J. A. A secondary leaf spot of the *Hevea* rubber tree caused by *Glomerella cingulata*. **The Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 38, n. 7, p. 494-499, 1954.
- CORRÊA, L. T. S. P. **Cartilha Simplificada de Gestão de Custos em Seringais**. Goiania: SEBRAE, 2018. 40 p. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/GO/Sebrae%20de%20A%20a%20Z/SERINGAIS.pdf>. Acesso em: 20 out. 2019.
- FURTADO, E. L.; TRINIDADE, D. R. Doenças da seringueira. *In*: KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p. 559-569.
- FURTADO, E. L. Ocorrência de epidemia do mal das folhas em regiões de “escape” do Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 82, p. 1-6, 2015.
- GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J. C. R.; FURTADO, E. L. Doenças das folhas. *In*: GASPAROTTO, L.; REZENDE PEREIRA, J.C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Editora Embrapa, 2012. Cap. 3. p. 35 – 176.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F. A.; SANTOS, A. F.; PEREIRA, J. C. R.; FURTADO, E. L. Doenças das Folhas. In: GASPAROTTO, L.; REZENDE PEREIRA, J. C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Editora Embrapa, 2012. Cap. 3. p. 35 – 176.

HILTON, R. N. **Maladies of hevea in malaya**. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaya, 1959.

HOLIDAY, P. South American leaf disease (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. CABI. **Phytopathological papers**, Wallingford, v. 12, p. 1-31, 1970.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR. **O cultivo da seringueira (Hevea spp.)**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2004. Disponível em: http://www.iapar.br/zip_pdf/cultsering.pdf. Acesso em: 24 nov. 2019.

JAYASINGHE, C. K.; FERNANDO, T. H. P. S.; PRIYANKA, U. M. S. *Colletotrichum acutatum* is the main cause of *Colletotrichum* leaf disease of rubber in Sri Lanka. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, p. 53-56, 1997.

JAYASINGHE, C.K.; FERNANDO, T. H. P. S. Growth at different temperatures and on fungicide amended media: Two characteristics to distinguish *Colletotrichum* species pathogenic to rubber. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 143, p.93-95, 1998.

JIANG, G. Z.; SHI, Z. W.; LIU, Y. X.; HU, C. Y. A. New *Colletotrichum* Isolated from *Hevea brasiliensis*. **Tropical Agricultural Science & Technology**, Changsha, v. 39, n. 4, p. 5–8, 2016.

LIU, X.; LI, B.; CAI, J.; *et al.* *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Rubber Trees in China. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Heidelberg, v. 27, p. 23-24, 2002.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

OLIVEIRA, M. D. M.; GONÇALVES, E. C. P. Custo de Produção e Rentabilidade da Cultura da Seringueira: safra 2018/19. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2019.

PETCH, T. **The diseases and pests of the rubber tree**. London: MacMillan, 1921. 278 p.

SAHA, T. *et al.* Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycological Research**, London, v. 106, n. 2, p. 215–221, 2002.

SANTOS, T. R. **Diversidade de fungos no ambiente de seringais no sudeste da Bahia e resistência de genótipos de seringueira à antracnose foliar**. 2018. 131 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

SARMIENTO, S. S. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à **antracnose foliar da seringueira**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FREITAS, R. S.; GONÇALVES, P. S. O agrônomo. **Boletim Técnico-Informativo do Instituto Agrônomo**, Campinas, v. 69, p. 56, 2017.

SIERRA, J. F. H. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVA, J. Q. Manejo geral da seringueira. **Revista Campo e Negócios - Florestas**, Uberlândia, v. 13, p. 13, 2014.

SILVEIRA, A.P.; CARDOSO, R.M.G. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, n. 1-2, p. 19, 1987.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L; LOPES, M. E. B. M. Antracnose: nova doença do painel de sangria da seringueira. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 18, p. 196-200, 1992.

SOMAIN, R.; DROULERS, M. A seringueira agora é paulista. Confins. **Revue franco-brésilienne de géographie / Revista franco-brasileira de geografia**, São Paulo, n. 27, p. 1-30, 2016. Disponível em: <http://journals.openedition.org/confins/10906>. Acesso em: 3 dez. 2019.

STERLING, A.; RODRÍGUEZ, C.; BETANCURT, B.; MAZORRA, A.; DUSSAN, I.; GALINDO, L.; HERNANDEZ, J.; PLAZA, C. P.F.; GAMBOA, A. C. D.; MARTÍNEZ, O. Evaluación del desempeño y comportamiento fitosanitario de genotipos élités de H. brasiliensis de origen franco en Campo Clonal a Pequeña Escala CCPE. In: STERLING, A.; RODRIGUEZ, C (ed). **Nuevos clones de caucho natural para la Amazonia colombiana: énfasis en la resistencia al mal suramericano de las hojas (*Microcyclus ulei*)**. Manaus: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. 2011. Cap. 4, p. 85-138.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control** (ed). Wallingford: CABI, 1992.

THAMBUGALA, T. A. D. P.; DESHAPPRIYA, N. The role of *Colletotrichum* species on the *Colletotrichum* leaf disease of *Hevea brasiliensis* a preliminary study. **Journal of the National Science Foundation**, Sri Lanka, v. 37, p. 135-138, 2009.

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

WASTIE, R. L. *Gloeosporium* leaf disease of rubber in West Malaysia. *Planter*. **Kuala Lumpur**, [s. l.], n. 43, p. 533-565, 1967.

WASTIE, R. L.; JANARDHANAN, P. S. Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporoides*, *C. dematium* and *C. crassipes* to leaves of *Hevea brasiliensis*. **Transactions of the British Mycological Society**, [s. l.], v. 54, p.150-152, 1970.

2 **CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, MORFO-CULTURAL, FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM SPP. DE SERINGUEIRA**

RESUMO

A antracnose é uma doença que acomete a seringueira (*Hevea brasiliensis*), causada por diferentes espécies do gênero *Colletotrichum*, que pode levar a perda na produtividade de látex. O conhecimento das espécies que causam a doença em cada região é fundamental para ações de controle e o desenvolvimento de programas de melhoramento genético. Este trabalho teve como objetivo caracterizar 17 isolados de *Colletotrichum* obtidos a partir de folíolos de seringueira quanto a seus aspectos patogênicos, morfo-culturais e genéticos. O teste de patogenicidade indicou diferenças na agressividade dos isolados de *Colletotrichum*. Por meio da comparação da sequência genômica de parte do ITS em conjunto das análises morfo-culturais, foi possível determinar a presença de isolados provenientes dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, porém não foi possível identificar os isolados a nível de espécie. A análise morfo-cultural demonstrou a presença de heterogeneidade entre os isolados em aspectos como coloração de colônia, morfologia de conídios e crescimento micelial em diferentes temperaturas, enquanto a análise filogenética, por meio de bootstrap, indicou divergência entre os complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Para a identificação a nível de espécie, é necessário o sequenciamento de outras regiões do DNA dos isolados.

Palavras-chave: Antracnose. Filogenia. *Hevea brasiliensis*. Diversidade. Fenótipos.

ABSTRACT

Anthrachnose is a disease that affects the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), caused by different species of the genus *Colletotrichum*, which can lead to a loss in latex yield. The knowledge of the species that cause the disease in each region is essential for control actions and the development of genetic improvement programs. This work aimed to characterize 17 *Colletotrichum* isolates obtained from rubber leaflets in terms of their pathogenic, morpho-cultural and genetic aspects. The pathogenicity test indicated differences in the aggressiveness of *Colletotrichum* isolates. By comparing the ITS1 / 4 genomic sequence together with the morpho-cultural analyzes, it was possible to determine the presence of isolates from the *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* complexes, however it was not possible to identify the isolates at the species level. The morpho-cultural analysis demonstrated the presence of heterogeneity among the isolates in aspects such as colony staining, conidia morphology and mycelial growth at different temperatures, while the phylogenetic analysis, through bootstrap, indicated divergence between the *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* complexes. For species-level identification, sequencing of other regions of the isolates' DNA is necessary.

Keywords: Anthracnose. Phylogeny. *Hevea brasiliensis*. Diversity. Phenotype.

2.1 INTRODUÇÃO

A antracnose da seringueira é uma doença fúngica causada por espécies do gênero *Colletotrichum* que está presente em diversas regiões brasileiras como São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Região Norte (FURTADO; TRINDADE, 2005). Devido a alta variabilidade genética do gênero *Colletotrichum* (FREEMAN, 2000) e a diferença de sensibilidade de isolados a fungicidas (TOZZE JÚNIOR, 2007) é necessária a identificação correta dos isolados presentes em cada área para a realização de medidas de controle adequadas, já que além da variação de sensibilidade a fungicidas, a sensibilidade dos clones também varia de acordo com o isolado (SANTOS, 2018) e há diferença na agressividade de isolados (HUNOPOLAGMA *et al.*, 2017).

A distribuição da antracnose da seringueira, doença fúngica causada por *Colletotrichum*, em diferentes áreas do território nacional, torna necessária a realização de estudos que visem identificar as espécies predominantes dos agentes causais em cada região, já que o conhecimento a cerca da variabilidade da população do patógeno é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas de manejo da antracnose nos seringais.

Durante muitos anos a identificação de espécies de *Colletotrichum* baseou-se majoritariamente em características fenotípicas, como aspectos culturais e morfo-fisiológicos, que constituem características fundamentais para o conhecimento das variabilidades inter e intra-específica do patógeno. Essas características também são úteis para a diferenciação entre espécies e grupo de espécies (KATAN, 2000). No entanto, o gênero *Colletotrichum* apresenta uma alta plasticidade fenotípica o que leva a necessidade do uso integrado de métodos morfológicos e bioquímicos em estudo taxonômicos deste gênero (MENEZES, 2006). A integração dos métodos é fundamental para não comprometer a acurácia da identificação do agente causal, que pode ocorrer quando são utilizados apenas critérios fenotípicos, sendo que a identificação incorreta do agente causal pode comprometer a diagnose, a compreensão da relação patógeno hospedeiro e as medidas de controle da doença (HYDE *et al.*, 2009).

Com os avanços nos estudos moleculares associados aos métodos baseados em

critérios fenotípicos, a taxonomia do gênero *Colletotrichum* tem sido melhor compreendida e novas espécies tem sido propostas (DAMM *et al.*, 2012a; DAMM *et al.*, 2012b; WEIR *et al.*, 2012). A análise de sequências de ácidos nucleicos é considerada a técnica mais confiável para a classificação de espécies de *Colletotrichum* (CAI *et al.*, 2009 ; CROUCH *et al.*, 2009; DAMM *et al.*, 2009; PRIHASTUTI *et al.*, 2009; CANNON *et al.*, 2012; HUNOPOLAGAMA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018)

Tendo em vista a distribuição do patógeno em diferentes áreas dentro do Brasil e do Estado de São Paulo, em condições edafoclimáticas distintas, esse trabalho buscou identificar os grupos do patógeno predominantes em diferentes áreas, a variabilidade genética e as características morfológicas e fisiológicas de cada um dos isolados estudados.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção e preservação de isolados

Os isolados foram obtidos a partir de folhas de *H. brasiliensis* que apresentavam sintomas de antracnose. Foi realizada uma coleta no município de Votuporanga – SP, na qual foram coletados folhas com sintomas da doença que foram acondicionadas em sacos plásticos mantidos com umidade até o dia posterior, quando foram realizados os lamentos no laboratório de Fitopatologia da FCAT. Além desse município, folhas com sintomas da doença providas de outros municípios foram enviada ao laboratório, dentre esses municípios estão Pirajuí – SP, Fernão – SP, Gália – SP, Colina-SP e Registro-SP, isolados de seringueira providos de Jaci-SP, Jaú e Buritama também foram utilizados no trabalho. Os municípios escolhidos para a realização das coletas se localizam em regiões produtoras de látex.

O isolamento do material coletado foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da FCAT – UNESP Dracena. Fragmentos (0,4 cm x 0,4 cm) de cada amostra com sintomas e sinais característicos da doença (Figura 1) foram submetidos à desinfestação superficial, pela submersão por 1 minuto em álcool (70%), seguido da submersão por 2 minutos em solução de hipoclorito de sódio (2%), lavados em água autoclavada estéril e

secos em papel toalha estéril no interior de câmara de fluxo laminar. Após a desinfestação superficial, as amostras foram depositadas, individualmente, em placas de Petri contendo meio de ágar-água (DHINGRA; SINCLAIR, 1985) e incubadas em câmara tipo BOD, a 25 ± 1 °C, no escuro, até o crescimento visível de estruturas do fungo. Posteriormente, foram coletados com agulha histológica estéril, na extremidade das colônias, fragmentos do meio de cultura contendo estruturas do fungo formadas a partir das amostras vegetais, os quais foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA (Batata, Dextrose, Ágar) (TUIE, 1969). As culturas foram incubadas por sete dias em câmara tipo BOD, a 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo contínuo.

Figura 1 – Sintomas típicos de antracnose



Fonte: Próprio autor.

Os isolados foram preservados pelo método Castellani em tubos de ensaio contendo 5 mL de água deionizada autoclavada, sendo que em cada tubo foram depositados 5 discos de cada isolado em meio BDA com estreptomicina ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$).

Também foi utilizado o método de conservação em papel filtro. Os isolados foram repicados para meio placas de Petri contendo meio BDA com estreptomicina e cresceram sobre fragmentos de papel filtro colocados na superfície do meio de cultura. Cinco dias após a repicagem os papéis filtro foram transferidos para tubos de ensaio esterilizados e posteriormente congelados.

2.2.2 Teste de patogenicidade

Folíolos do clone RRIM 600, clone muito cultivado no Brasil e altamente produtivo (IAC, 2013), foram coletados no jardim clonal do Centro de Seringueira do IAC, no município de Votuporanga – SP. Estes folíolos foram acondicionados em sacos plásticos com umidade após a coleta, e levados ao laboratório de Fitopatologia da FCAT-Dracena no dia seguinte, sendo inoculados com diferentes isolados.

Treze isolados foram inoculados em três folíolos do clone RRIM 600, sendo que o método de inoculação utilizado foi a deposição de um disco de micélio sobre a superfície adaxial dos folíolos. Os folíolos foram acondicionados em câmara úmida, no escuro sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 90% (Figura 2), conforme metodologia de Sierra (2010), sendo que cada câmara úmida continha 3 folíolos do clone RRIM 600, em cada disco foi depositado um disco de micélio. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo que foram utilizados 13 isolados com 3 repetições por isolado. Seis dias após a inoculação os folíolos foram escaneados e a porcentagem de área lesionada de um deles foi aferida pelo programa Leaf Doctor (PETHYBRIDGE; NELSON, 2015).

Figura 2 – Inoculação dos isolados a partir de discos de discos de micélio para realização do teste de patogenicidade



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos foram submetidos ao Teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 1998).

2.2.3 Caracterização cultural e fisiológica

Na caracterização dos isolados foram realizadas análises da velocidade média de crescimento da colônia em diferentes temperaturas, determinação da temperatura ótima de crescimento da colônia e observação das características morfológicas das colônias de cada isolado.

Discos de meio de cultura BDA Difco® (39 g/L) com 7 mm de diâmetro, retirados

da borda do micélio dos isolados após cultivados por cinco dias, foram transferidos para o centro de Placas de petri que também continham meio BDA Difco® (39 g/L). Após a transferência dos discos, cada isolado foi incubado nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas.

O experimento foi avaliado diariamente por meio da medição de diâmetros perpendiculares da colônia com a utilização de um paquímetro. Por fim foi determinada a velocidade média de crescimento da colônia, que ao final foi utilizada nas análises estatísticas. O cálculo da velocidade de crescimento foi feito seguindo metodologia de Nechet (1999), adaptada de Oliveira (1991): $\text{IVCM} = S (D - D_a) / N$, em que IVCM= Índice de velocidade de crescimento micelial, D = Diâmetro médio atual, D_a = Diâmetro médio do dia anterior, e N = Número de dias após a inoculação.

No quinto dia de cultivo foram avaliadas as características morfológicas das colônias cultivadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, tais como coloração da colônia e massa de esporos.

O experimento foi conduzido em delineamento fatorial duplo (isolado x temperatura) inteiramente casualizado, com duas repetições por tratamento, sendo cada placa de Petri uma parcela. Os dados relativos a velocidade de crescimento das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 1998).

2.2.4 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica baseou-se nos formatos predominantes e dimensões médias (comprimento, largura e relação entre comprimento e largura) de conídios dos isolados.

Para a observação dos conídios foram preparadas lâminas em lactofenol, sendo essas lâminas semipermanentes e os esporos obtidos através de isolados cultivados em meio BDA Difco® (39 g/L).

Realizou-se uma avaliação prévia para determinar as formas mais comuns em que os conídios foram encontrados. Os formatos mais comuns receberam um correspondente numérico como mostra a Figura 3, que posteriormente foram utilizados para a

classificação dos conídios de cada isolado. e comparados a descrição de Sutton (1992).

Figura 3 – (1) reto com ápice obtuso; (2) cilíndrico; (3) oblongo-cilindráceo; (4) reto com constrição; (5) oblongo; (6) reto, com ápice afilado. A barra representa a medida de 10 μm



Fonte: Próprio autor.

Para a avaliação de formato e dimensão dos isolados foram selecionados 50 conídios aleatoriamente. Os conídios estudados foram observados através de imagens obtidas por uma câmera acoplada a um microscópio ótico, sendo que a câmera é um dos componentes do software Future WinJoe. As imagens obtidas através do software, correspondente a um aumento de 400x do microscópio Carl Zeiss® modelo Axiostar Plus, foram projetadas em uma tela de computador e medidas com o auxílio de uma régua. Por fim, com o auxílio da régua que acompanha o software, as medidas de comprimento e largura dos conídios foram convertidas para sua dimensão real (μm).

As medidas de comprimento, largura e relação comprimento/largura, foram submetidas a análise de variância e comparadas por meio do teste Skott-knott ao nível de 5% de significância, por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 1998).

2.2.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da FCAT, através método CTAB, seguindo metodologia de Murray e Thompson (1980). 2 discos de micélio com 100 µL juntamente ao tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β-mercaptoetanol) foram macerados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Posteriormente os tubos foram mergulhados em água a 65°C durante 30 minutos. Em sequência adicionou-se 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) aos tubos e os mesmos foram agitados manualmente por 10 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubos contendo isopropanol. Essa misturada foi centrifugada novamente a 12.000 rpm por 15 minutos e o “pellet” resultante foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco em temperatura ambiente ressuspendido em 100 µL de água com DEPC (Diethylpirocarbonato).

2.2.6 Caracterização filogenética

Para análise filogenética foram utilizadas sequências parciais dos genes ITS. Para isso, reações de polimerase em cadeia foram realizadas de acordo com Bragança (2013), utilizando os oligonucleotídeos ITS-1F (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS-4 (WHITE *et al.*, 1990), para amplificação de parte da região ITS-5.8S rDNA.

A árvore filogenética foi construída utilizando-se o programa MEGA 5.0, sendo o modelo Jukes Cantor o escolhido como modelo estatístico.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Denominação dos isolados

A Tabela 1 demonstra a denominação e a procedência dos isolados obtidos a partir de lesões de antracnose em folíolos de seringueira

Tabela 1 - Descrição e procedência dos isolados utilizados no trabalho

Nome do Isolado	Hospedeiro	Local de coleta/SP	Ano de Coleta
CH 1	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colina	2018
CH 5	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colina	2018
CH 6	<i>Hevea brasiliensis</i>	Pirajuí	2018
CH 19	<i>Hevea brasiliensis</i>	Fernão	2018
CH 23	<i>Hevea brasiliensis</i>	Jaú	2008
CH 25	<i>Hevea brasiliensis</i>	Jaci	2008
CH 38	<i>Hevea brasiliensis</i>	Buritama	2008
CH 40	<i>Hevea brasiliensis</i>	Gália	2018
CH 63	<i>Hevea brasiliensis</i>	Gália	2018
CH 94	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colina	2018
CH 96	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colina	2018
CH 112	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colina	2018
CH 128	<i>Hevea brasiliensis</i>	-	-
CH 138	<i>Hevea brasiliensis</i>	Votuporanga	2019
CH 145	<i>Hevea brasiliensis</i>	Registro	2019
CH 146	<i>Hevea brasiliensis</i>	Registro	2019

Fonte: Próprio autor.

2.3.2 Teste de patogenicidade

Todos os isolados testados foram patogênicos aos folíolos de seringueira 6 dias após a inoculação.

A comparação estatística demonstrou diferença de agressividade entre os isolados. O isolado CH 5 foi o menos agressivo (Tabela 2), diferindo estatisticamente de todos os outros seguido por CH 19, que foi mais agressivo em relação a CH 5, porém menos agressivo a todos os outros isolados que não diferiram estatisticamente entre si.

Apesar de haver diferença estatística entre os demais isolados é possível observar (Tabela 2) que CH 94, CH 40, CH 25 e CH 112 não provocaram sintomas em toda

superfície foliar enquanto os restantes tomaram todo o folíolo.

Tabela 2 - Porcentagem de área lesionada de folíolos de seringueira, seis dias após a inoculação de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Área Lesionada (%)
CH 1	100,00 c
CH 5	39,33 a
CH 6	100,00 c
CH 19	67,23 b
CH 23	100,00 c
CH 25	83,27 c
CH 38	100,00 c
CH 40	81,92 c
CH 63	100,00 c
CH 94	77,17 c
CH 96	100,00 c
CH 112	89, 20 c
CH 128	100,00 c
CV	17,20

Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.
Fonte: Próprio autor.

A figura 4 mostra a diferença de agressividade entre isolados 6 dias após a inoculação:

Figura 4 - Diferença entre sintomas provocados por diferentes isolados: (1) CH 5, (2) CH 19, (3) CH 94, (4) CH 1, 6 dias após a inoculação



Fonte: Próprio autor.

2.3.3 Caracterização cultural dos isolados

Os dados apresentados na Tabela 3 mostram os resultados obtidos após a avaliação da coloração das colônias.

A coloração da parte superior das culturas se dividiu em cinza claro e branco, sendo que em 6 isolados foi possível observar a coloração laranja na parte superior da colônia, devido a formação de massas de conídios na colônia (Tabela 3). Na parte inferior da colônia houve maior diversidade de coloração das colônias entre as cores branca, salmão, creme e cinza, com 9 isolados apresentando massa de esporos alaranjada (Tabela 3). Não foram detectadas setas em nenhuma das colônias.

Tabela 3 - Coloração de colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. 5 dias após a repicagem em meio BDA sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C.

Nome do Isolado	Cor		Massa de esporos
	Superior	Inferior	
CH 1	Cinza Claro	Cinza Escuro	-
CH 5	Branco, Laranja	Branco, Laranja	+
CH 6	Branco	Branco, Salmão	-
CH 19	Branco	Salmão	-
CH 23	Branco, Laranja	Salmão, Creme, Preto, Laranja	+
CH 25	Cinza Claro	Creme, Branco	-
CH 38	Branco, Laranja	Creme, Laranja	+
CH 40	Branco	Branco, Salmão, Laranja	+
CH 63	Branco, Laranja	Creme, Laranja	+
CH 94	Cinza Claro	Cinza, Laranja	+
CH 96	Cinza Claro	Cinza Escuro	+
CH 112	Cinza Claro, Laranja	Branco, Laranja	+
CH 128	Cinza Claro	Cinza Claro	-
CH 138	Branco, Cinza Claro	Cinza Claro, Creme	-
CH 145	Cinza Claro	Cinza Escuro	-
CH 146	Cinza Claro, Laranja	Cinza Escuro, Laranja	+

Fonte: Próprio autor.

2.3.4 Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas

Após os cálculos de crescimento micelial dos isolados, foi realizada análise estatística e os resultados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Velocidade de crescimento de isolados de *Colletotrichum* spp. em mm.dia⁻¹ sob fotoperíodo de 12 horas e diferentes temperaturas.

Isolados	Temperaturas (°C)					Médias
	15	20	25	30	35	
Crescimento mm.dia ⁻¹						
CH 1	3,25 Ca	6,00 Ba	10,87 Aa	10,62 Aa	1,21 Da	6,39 a
CH 5	4,00 Ca	3,91 Cb	6,63 Bc	9,88 Aa	1,03 Da	5,09 b
CH 6	4,77 Aa	3,91 Ab	4,81 Ad	1,37 Be	0 Bb	2,97 d
CH 19	1,07 Bb	3,17 Aa	2,13 Ae	1,50 Be	0 Bb	1,57 e
CH 23	1,88 Cb	2,92 Bb	4,63 Ad	0,63 De	0 Db	2,01 e
CH 25	4,13 Aa	5,58 Aa	4,50 Ad	2,88 Bd	1,46 Ba	3,71 c
CH 38	2,75 Bb	4,83 Aa	5,50 Ad	1,13 Be	0 Bb	2,84 d
CH 40	1,56 Cb	3,00 Bd	5,12 Ad	0,58 Ce	0 Cb	2,05 e
CH 63	2,75 Bb	5,66 Aa	4,19 Bd	0,75 Ce	0 Cb	2,67 d
CH 94	4,33 Ba	5,83 Aa	6,75 Ac	7,31 Ab	0,85 Ca	5,02 b
CH 96	3,75 Ba	5,17 Aa	3,38 Be	2,38 Bd	0 Cb	2,94 d
CH 112	2,25 Cb	6,33 Ba	9,06 Ab	5,33 Bc	1,00 Ca	4,80 b
CH 128	3,88 Ba	5,50 Ba	8,69 Ab	4,12 Bc	0 Cb	4,44 c
CH 138	4,00 Aa	5,00 Aa	5,50 Ad	4,63 Ac	1,61 Aa	4,15 c
CH 145	4,12 Ba	5,41 Aa	3,25 Be	2,25 Cd	0 Db	3,01 d
CH 146	2,75 Ab	2,83 Ab	2,81 Ae	1,00 Be	0 Bb	1,88 e
Médias	3,2 C	4,69 B	5,49 A	3,52 B	0,44 D	
CV (%)	22,16					

Nota: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

Houve diferenças significativas entre os isolados e a temperatura de 25°C foi a que proporcionou maior crescimento micelial, diferindo estatisticamente das demais. As temperaturas de 20°C e 30°C (Tabela 4) não diferiram estatisticamente entre si e obtiveram valores maiores de crescimento em relação a temperatura de 15°C que por sua vez proporcionou maiores velocidades de crescimento quando comparada a temperatura de 35°C, onde o crescimento dos isolados foi praticamente paralisado, sendo que 10 dos 16 isolados não cresceram sob essa temperatura após 7 dias (Tabela 4).

O isolado CH 1 diferiu estatisticamente de todos os isolados na média geral, sendo o que apresentou maior média de crescimento no geral, enquanto CH 19, CH 40 e CH 146 foram os que menos cresceram figurando no último grupo estatístico (Tabela 4)

Os dados demonstram que a temperatura de 25°C foi a que proporcionou maior desenvolvimento da colônia no geral e estatisticamente figurou no grupo que propiciou maior taxa de crescimento para 13 isolados, apenas CH 5 e CH 94 tiveram temperatura ideal a 30°C e CH 63 e CH 96, que cresceram mais rapidamente 20°C diferiram desses resultados.

2.3.5 Caracterização morfológica

Os resultados apontaram para seis formatos predominantes de conídios, que foram classificados da seguinte maneira: (1) reto com ápices redondos; (2) cilíndrico; (3) oblongo-cilindráceo; (4) reto com constrição; (5) oblongo; (6) reto, com ápice afilado.

Tabela 5. Comprimento (μm), amplitude de comprimento (μm), largura (μm), amplitude de largura (μm), relação comprimento/largura (μm) e formato de conídios de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Comprimento (μm)	Amplitude (μm)	Largura (μm)	Amplitude (μm)	Relação C/L	Formato (%)
CH 1	12,18 e	9,09 – 13,64	3,78 c	2,72 – 4,53	3,24 e	3(90), 1(10)
CH 5	18,73 a	10,00 – 27,24	3,47 c	2,70 – 4,55	5,39 a	2
CH 6	13,16 d	9,09 – 17,21	4,09 b	2,73 – 5,45	3,36 d	3(60), 1(40)
CH 19	13,41 d	9,10 – 19,12	3,51 c	1,82 - 4,54	3,96 c	1(70), 6(30)
CH 23	11,31 f	7,27 – 15,45	3,33 c	2,73 - 4,55	3,49 d	1(90), 6(10)
CH 25	16,67 b	12,73 – 20,00	4,57 a	2,73 - 5,45	4,00 c	1
CH 38	9,65 g	6,36 – 15,45	2,87 d	1,82 – 4,55	3,50 d	3(85), 5(15)
CH 40	13,05 d	9,09 – 16,36	3,69 c	2,71 – 5,43	3,62 d	1(70), 4(30)
CH 63	14,64 c	10,91 – 20,91	4,11 b	2,72 - 5,47	3,64 d	3(45), 4(45), 1(10)
CH 94	12,01 e	10,00 – 17,27	3,56 c	2,73 – 4,55	3,43 d	1(70), 3(30)
CH 96	13,27 d	10,15 – 17,30	3,63 c	2,72 – 4,53	3,72 d	1
CH 112	17,25 b	15,45 – 19,09	4,73 a	3,64 – 5,45	3,70 d	2 (60, 3 (40)
CH 128	16,53 b	12,73 – 20,00	3,52 c	2,73 – 4,51	4,87 b	1(60) 2(40)
CH 138	10,98 f	9,12 – 13,61	3,74 c	2,73 – 5,23	2,99 e	3(40), 1(40), 5(20)
CH 145	10,10 g	6,23 – 12,69	3,78 c	2,84 – 5,34	2,72 f	5(80), 3(20)
CH 146	10,28 g	7,27 – 17,32	2,3 e	1,84 – 3,34	4,62 b	5(60), 1(30) 4(10)
CV (%)	13,30		21,14		21,19	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Próprio autor.

O comprimento dos conídios variou entre 9,65 μm (CH 38) a 18,73 μm (CH 5), enquanto a largura variou de 2,3 μm (CH 146) a 4,57 μm (CH 25). A relação comprimento/largura (C/L) esteve dentro do intervalo de 2,72 (CH 145) e 5,39 (CH 5).

Os formatos predominantes foram 1 e 3 para a maioria dos isolados. CH 5 e CH

112 apresentaram predominância do formato 2, enquanto CH 145 e CH 146 do formato 5. (Tabela 5).

2.3.6 Caracterização genética

Os resultados demonstraram que os isolados provenientes do município de Colina-SP, CH 1, CH 5, CH 94, 96 e CH 112 pertencem ao grupo *C. gloeosporioides*, não havendo nenhum outro grupo identificado na área. O mesmo ocorreu com os isolados CH 145 e CH 146, ambos isolados a partir de amostras de folíolos de seringueira do município de Registro -SP. O isolado CH 25, com origem no município de Jaci – SP também foi agrupado dentro do complexo *C. gloeosporioides*.

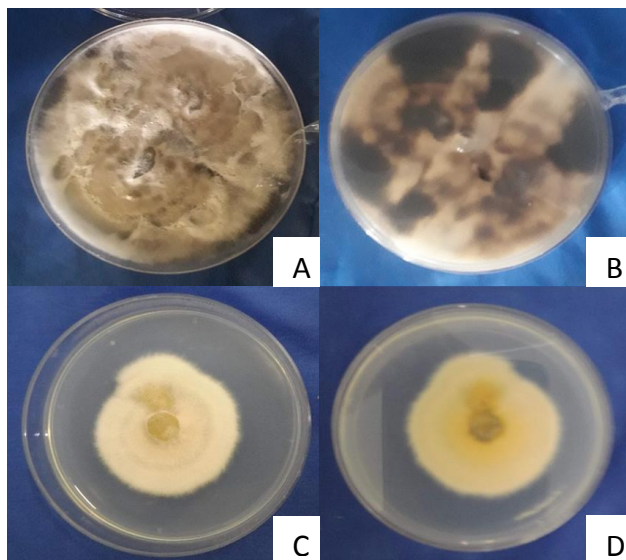
Os isolados obtidos no município de Gália – SP, CH 40 e CH 63 foram agrupados no complexo *C. acutatum*, mesmo grupo dos isolados CH 6 e CH 19, provenientes dos municípios de Pirajuí e Fernão, ambos próximos a Gália. Os isolados CH 23, do município de Jaú - SP e CH 138 de Votuporanga – SP, também foram classificados dentro de *C. acutatum*.

O dendrograma (Figura 5), apresenta a proximidade dos isolados e os bootstraps obtidos através da análise estatística pelo modelo Jukes Cator.

2.4 DISCUSSÃO

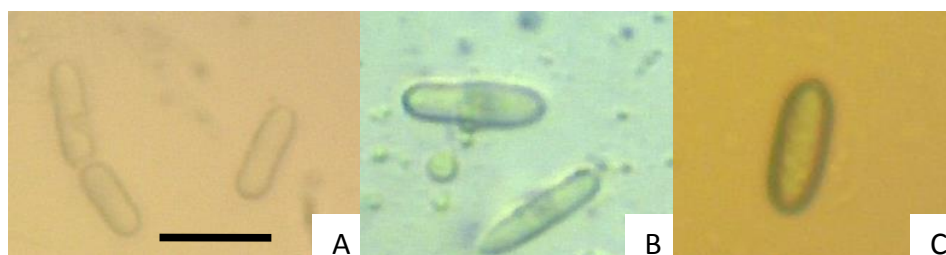
Os isolados CH 1, CH 25, CH 94, CH 96 e CH 128 apresentaram características morfológicas, fisiológicas e culturais condizentes com *C. gloeosporioides*. CH 25 e CH 94 apresentaram traços laranjas na coloração da colônia, característica associada por Sutton (1992) a *C. acutatum*, porém Smith e Black (1990) relatam alta plasticidade fenotípica em isolados de *C. gloeosporioides* e presença de coloração alaranjada em alguns deles. As outras características (crescimento de colônia, morfologia de conídios) também se assemelharam as descritas na literatura para a espécie. O sequenciamento da região ITS agrupou esses isolados no complexo *C. gloeosporioides*. As figuras 6 e 7 demonstram características gerais desses isolados.

Figura 6 - Diferença entre sintomas provocados por diferentes isolados: (1) CH 5, (2) CH 19, (3) CH 94, (4) CH 1, 6 dias após a inoculação



Fonte: Próprio autor

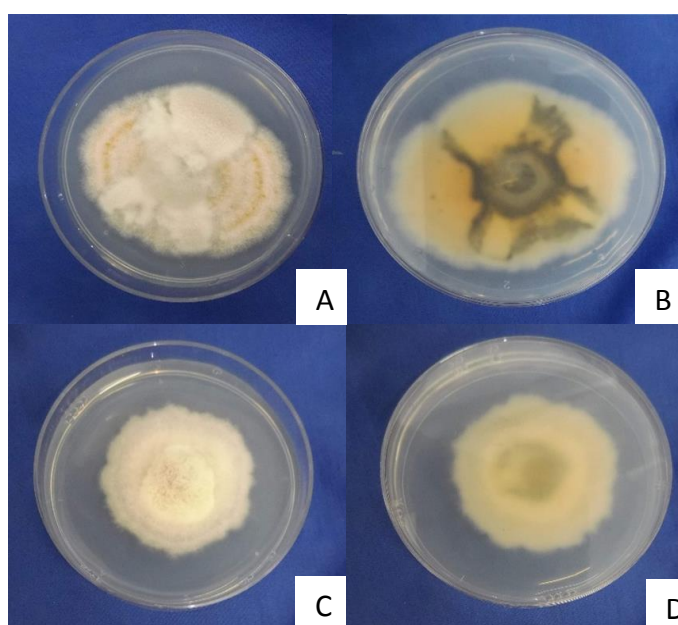
Figura 7 - Conídios dos isolados CH 1 (A), CH 138 (B) e CH 93 (C). A barra representa a medida de 10 μm .



Fonte: Próprio autor

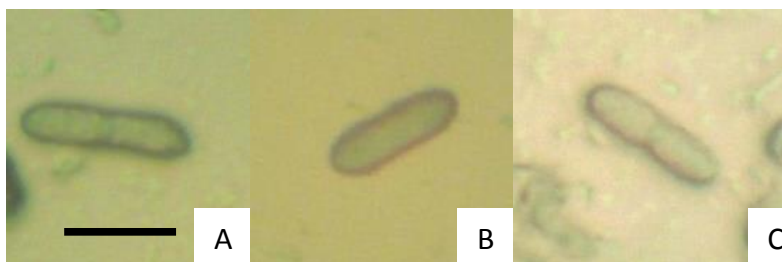
Os isolados CH 6, CH 19, CH 23, CH 38, CH 40, CH 63 e CH 138 apresentaram características morfológicas, fisiológicas e culturais condizentes com *C. acutatum*. CH 6 e CH 63 apresentaram largura de conídios ligeiramente diferentes da relatada por Sutton (1992) para *C. acutatum*, 0,09 μm e 0,11 μm superiores ao limite máximo, respectivamente. O isolado CH 40 apresentou morfologia de conídios próximas aos de *C. gloeosporioides*, o que também foi relatado por Tozze Junior (2007) e Santos (2018) para *C. acutatum*. A análise genética demonstrou que os isolados pertencem ao complexo *C. acutatum*. As figuras 8 e 9 demonstram os aspectos das colônias e dos conídios dos isolados desse grupo.

Figura 8 - Colônias dos isolados CH 23 (A e B) e CH 19 (C e D)



Fonte: Próprio autor

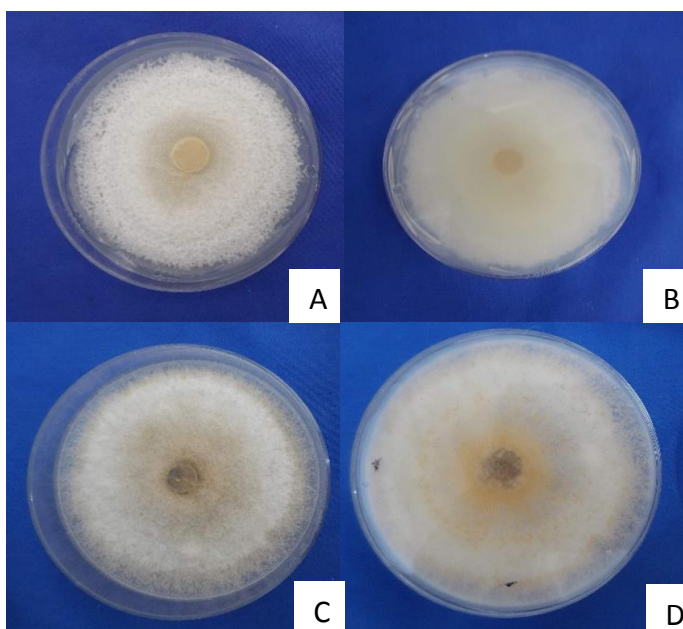
Figura 9 - Conídios dos isolados CH 63 (A), CH 23 (B) e CH 63 ©. A barra representa a medida de 10 µm.



Fonte: Próprio autor

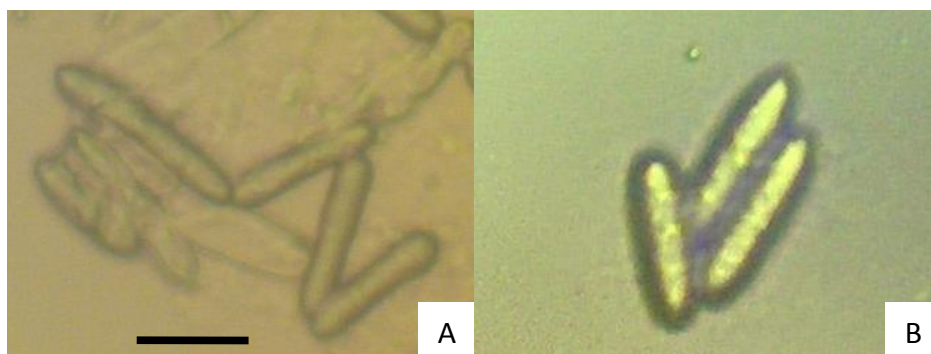
Os isolados CH 5 e CH 112 apresentaram comprimentos dos conídios superior ao descritos por Sutton (1992) para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Além dessa semelhança as colônias de ambos isolados apresentaram coloração branca e alaranjada e velocidade de crescimento ótima na temperatura de 30°C, além de serem agrupados dentro do complexo *C. gloeosporioides* na análise genética. A espécie *C. theobromicola* relatada por Santos (2018) como patógeno de seringueira no Brasil, apresenta conídios com dimensões que englobam os isolados, inclusive no isolado descrito pela autora.

Figura 10 - Colônias dos isolados CH 5 (A e B) e CH 112 (C e D)



Fonte: Próprio autor

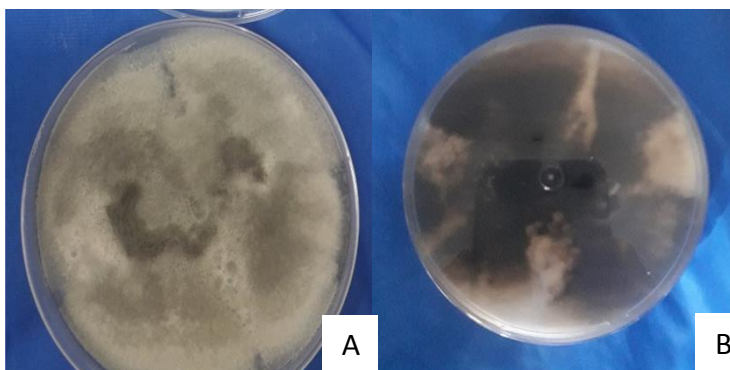
Figura 11 - Conídios dos isolados CH 5 (A) e CH 112 (B). A barra representa a medida de 10 μ m.



Fonte: Próprio autor

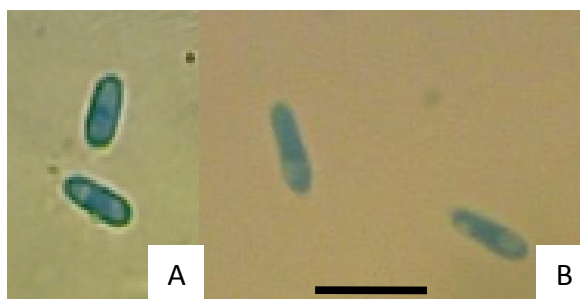
Os isolados CH 145 e CH 146 também apresentaram características diferentes em relação a *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, ambos apresentaram coloração predominantemente acinzentada, característica de *C. gloeosporioides* e foram agrupados dentro do mesmo grupo na análise genética, porém a dimensão dos conídios e a velocidade de crescimento desses isolados não se assemelham aos parâmetro descritos para *C. gloeosporioides*. É necessária uma análise genética com mais regiões desses isolados.

Figura 12 - Colônia do isolado CH 145 (A e B)



Fonte: Próprio autor

Figura 13 - Conídios dos isolados CH 145 (A) e CH 146 (B). A barra representa a medida de 10 μ m.



Fonte: Próprio autor

Quanto a patogenicidade, o isolado menos agressivo (CH 5), apresentou características morfo-culturais distintas das espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, enquanto CH 19, o outro isolado que obteve um grau de patogenicidade estatisticamente inferior aos demais, exibiu características de *C. acutatum*.

Brown e Soepena (1994), trabalhando com 2 isolados de *C. gloeosporioides* e 2 de *C. acutatum*, concluíram que um dos isolados de *C. gloeosporioides* foi o mais agressivo, enquanto o outro foi o menos agressivo, enquanto os dois isolados de *C. acutatum* apresentaram agressividade média, esses resultados se assemelham aos encontrados nesse trabalho, já que houve variação na patogenicidade intra e inter complexos de *Colletotrichum*. Zakaria, Bailey e Ahmad (2003) detectaram diferença na agressividade entre isolados de *Colletotrichum* isolados de diferentes hospedeiros em folhas de seringueira, porém não identificaram as espécies dos mesmos. Thambugala e Deshappriya (2009), detectaram maiores lesões em folhas de seringueira causadas por *C. acutatum* em relação a *C. gloeosporioides*. Hunupologama *et al.* (2017) testaram a agressividade de diferentes espécies do complexo *C. acutatum* em seringueira e concluíram que *C. nymphaeae* foi mais agressivo em relação a *C. simmondsii*, *C. acutatum*, *C. laticipilum* e *C. citri*, demonstrando variação na patogenicidade entre espécies d mesmo complexo. Santos (2018) constatou maior agressividade de isolados do complexo *C. gloeosporoides* em relação a *C. acutatum* quando inoculados em clones distintos.

Os resultados relativos a coloração das colônias apontaram para a presença de

coloração cinza clara em 56,25 % das colônias enquanto 43,75% apresentaram aspecto esbranquiçado, esses resultados são similares aos encontrados por Tozze Júnior *et al.* (2015), em estudo de isolados de *Colletotrichum* patogênicos a frutíferas onde 60,2% estudados apresentaram aspecto acinzentado e 39,8% foram esbranquiçados. A coloração da parte inferior da placa foi mais diversificada com presença das cores branca, creme, salmão, cinza clara e cinza escura em um isolado, enquanto Tozze Júnior *et al.* (2015) caracterizaram 86% das colônias com coloração castanha, 12, 99% salmão e apenas um isolado acinzentado. 56,25% dos isolados apresentaram massa de conídios alaranjada, número superior ao de 29% encontrado por Tozze Junior *et al.* (2015). Santos (2018), em caracterização cultural de isolados de seringueira encontrou coloração de colônias predominantemente cinzas e brancas na parte superior, porém também detectou colônias alaranjadas, creme amareladas e rosáceas. Smith e Black (1990), encontraram variação de coloração para *C. gloeosporioides* de cinza a cinza-oliva na parte superior da cultura e oliva escuro a cinza escuro na parte inferior, com pouca presença de cor laranja e ausência de coloração rosácea, enquanto para *C. acutatum* os autores descreveram colônias brancas evoluindo para bege, laranja, creme e rosadas na parte inferior das cultura. Sierra-Hayer (2010) encontrou predominantemente coloração laranja e cinza claro em colônias de isolados de *Colletotrichum* patogênicos a seringueira.

A variabilidade na coloração das colônias de *Colletotrichum* é um fato descrito por diversos autores (THAN *et al.*, 2008; PRIHASTUTI, *et al.*, 2009, BATISTA, 2016) e devido a essa alta plasticidade fenotípica dentro do próprio grupo é uma ferramenta insuficiente para a caracterização de espécies (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

As colônias com aspectos salmão foram caracterizadas por Sutton (1992) como típicas do grupo *C. acutatum*, ao passo que *C. gloeosporioides* apresenta maior gama de colorações entre os isolados.

Sutton (1992) aponta temperatura ideal para o desenvolvimento da maioria das espécies de *Colletotrichum* se encontra entre 25°C e 30° C. Isolados de *Colletotrichum* spp. de mangueira tem sua temperatura de desenvolvimento ideal entre 20°C e 25°C (PIMENTA, 2009; MAIA; ARNESTO; ZANCAN, 2011). Poltronieri, Azevedo e Silva (2013), encontraram 24,46°C como temperatura ideal para o desenvolvimento de isolados de *C. gloeosporioides* isolados de plantas de juçara. A temperatura de 25°C também foi a ideal

para a maioria dos isolados de solanáceas e de frutíferas (TOZZE JUNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; TOZZE JUNIOR *et al.*, 2015).

Sierra-Hayer (2010), em estudo com isolados de *Colletotrichum* spp. de seringueira na mesma faixa de temperatura estudada, concluiu que 25°C propiciou maior desenvolvimento das colônias. Wastie (1972) apontou a faixa de temperatura entre 26°C e 32°C como a ideal para desenvolvimento dos isolados de *C. gloeosporioides* de seringueira.

Em relação a espécies, em geral, *C. gloeosporioides* tende a ter o desenvolvimento mais rápido em relação a *C. acutatum* (SMITH e BLACK, 1990; SANTOS, 2018), neste trabalho o isolado que mais cresceu, CH 1, apresenta características gerais de *C. gloeosporioides*.

Vinnere (2004) descreve a faixa de temperatura ideal para a espécie *C. gloeosporioides* entre 26-28,5°C e *C. acutatum* entre 25°C-26,5°C. Smith e Black (1990) observaram uma grande diferença no crescimento de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* nas temperaturas de 28°C e 32°C, sendo que *C. gloeosporioides* apresentou taxas de crescimento significativamente superiores sob essas temperaturas. Esses dados são consistentes com os encontrados nesse estudo, já que isolados com característica do grupo *C. gloeosporioides* apresentaram maior velocidade de crescimento a 30°C.

Em relação a morfologia de conídios, Sarmiento (2013), em trabalho com isolados de *Colletotrichum* de seringueira encontrou uma amplitude de comprimento de 12,7 µm a 16,1 µm, de largura de 3,2 µm a 5,0 µm. Sierra (2010) encontrou amplitude de 11,04 µm a 17,07 µm no comprimento e 2,64 µm a 4,64 µm na largura e Santos (2018) encontrou variação de 11 µm a 17,6 µm em comprimento e 3,1 µm a 4,84 µm em largura.

A análise do dendrograma, demonstrou a existência de dois subgrupos dentro do complexo *C. gloeosporioides*. O primeiro foi composto pelos isolados CH 96, CH 112, CH 145, CH 1, CH 5 e CH 25. Os isolados CH 1, CH 5, CH 96 e CH 112 foram coletados no município de Colina, enquanto CH 25 é proveniente de Jaci e CH 145 de Registro.

Nesse levantamento houve 9 isolados relatados dentro do grupo *C. gloeosporioides* e 8 do grupo *C. acutatum*. No Brasil, outros autores relataram a presença do complexo *C. boninense* e houve alternância na predominância entre os complexos, Sarmiento (2013) identificou mais isolados dentro do complexo *C. acutatum*, enquanto

Santos (2018) relatou maior presença de *C. gloeosporioides*.

Sarmiento (2013) e Meireles *et al.* (2009), não encontraram semelhanças no agrupamento dos isolados em decorrência da região geográfica em que foram coletados, já nesse trabalho foi possível verificar que isolados provindos de regiões próximas tenderam a se agrupar em grupos semelhantes.

A análise de apenas uma região de DNA não foi suficiente para a classificação dos isolados a nível de espécie. Os complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* possuem grande distribuição de espécies no patossistema da antracnose da seringueira (LIU *et al.*, 2018; Hunupologama *et al.*, 2017). A diferenciação entre as espécies do complexo *C. acutatum*, por exemplo, exige o estudo de regiões específicas, como exemplo, *C. limetticola* se diferencia de outras espécies do complexo através da utilização de TUB2, GAPDH, HIS3 e principalmente (DAMN *et al.*, 2012)

Os resultados encontrados evidenciam a necessidade do sequenciamento de outras regiões do DNA para uma identificação acurada das espécies dos isolados, já que a análise da região ITS associada a características morfo-culturais não foi conclusiva para a determinação da espécie de alguns isolados.

Outros autores em estudos com outras regiões obtiveram resultados mais acurados e demonstraram a presença de mais espécies patogênicas a seringueira dentro dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Liu *et al.* (2018), utilizando as regiões ITS, TUB2, CAL, ACT, GAPDH, CHS-1, e GS identificou os clados *C. fructicola*, *C. siamense* e um mais próximo a *C. syzygicola* e *C. cordylinicola*, enquanto dentro do complexo *C. acutatum* foi formado um clado próximo a *C. cairnsense* e outro a *C. laticiphilum*. Santos (2018) em trabalho com as regiões ITS 1/4 e GAPDH identificou as espécies *C. siamense* e *C. theobromicola* dentro do complexo *C. gloeosporioides*. Portanto, como já se conhece a variabilidade de espécies patogênicas a seringueira dentro destes dois complexos, a utilização de mais regiões é indispensável para a identificação correta dos isolados e a realização de estudos para o controle da doença, já que espécies de *Colletotrichum* diferem quanto a sensibilidade a fungicidas (TOZZE JUNIOR, 2007) e apresentam graus de agressividade distintos a diferentes clones de seringueira (LIU *et al.*, 2018; SANTOS, 2018).

2.5 CONCLUSÕES

A caracterização morfológica e cultural apresentou variações nos resultados, não permitindo a distinção das espécies do fungo

A identificação molecular permitiu identificar dois complexos atacando seringueira (*C. gloeosporioides* e *C. acutatum*)

Houve variação na patogenicidade entre os isolados, intra e inter complexos.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, L. R. L. **Caracterização de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose nas culturas do maraujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) e da romãzeira (*Punica granatum* L.) na região Nordeste do Brasil.** 2016. 74 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo. 2016
- BROWN, A.; SOEPENA, H. Pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves of *Hevea* spp. **Mycological Research**, London, v. 98, p. 264-266, 1994.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 39, p. 183-204, 2009.
- 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.
- CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; WHITE, J. F.; HILLMAN, B. I. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 717-732, 2009.
- DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDENBERG, J.H.C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 37-113, 2012a.
- DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDENBERG, J.H.C.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 1-36, 2012b.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC, 1985. 355 p.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar**: sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.
- FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **The American Phytopathological Society**, June, v. 82, n. 6, p. 596, 1998.

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.

HUNUPOLAGAMA, D. M. *et al.* Unveiling Members of *Colletotrichum acutatum* Species Complex Causing *Colletotrichum* Leaf Disease of *Hevea brasiliensis* in Sri Lanka. **Current Microbiology**, New York, v. 74, n. 6, p. 747–756, jun. 2017.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - IAC. **Clones**. Campinas: Centro de Seringueira e Sistemas Agroflorestais, 2013. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/clones.php>. Acesso em: 1 nov. 2019.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S. E.; DICKMAN, M. B. **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host-pathogen Interaction. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 45-56.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W. L. A.; *et al.* Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, Darmstadt, v. 27, n. 2, 2011.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

PEREIRA, W.V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PETHYBRIDGE, S.J.; NELSON, C.S. Leaf Doctor: A New Portable Application for Quantifying Plant Disease Severity. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n.10, out. 2015.

PIMENTA, A. A. **Caracterização morfolométrica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

POLTRONIERI, T. P. de S.; AZEVEDO, L. A. S.; SILVA, D. E. M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 281-285, 2013.

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**, Chiang Mai, v. 39, p. 89-109, 2009.

SANTOS, T. R. **Diversidade de fungos no ambiente de seringais no sudeste da Bahia e resistência de genótipos de seringueira à antracnose foliar**. 2018. 131 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

SARMIENTO, S.S. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

SIERRA, J. F. H. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

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.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control** (ed). Wallingford: CABI, 1992.

THAMBUGALA, T. A. D. P.; DESHAPPRIYA, N. The role of *Colletotrichum* species on the *Colletotrichum* leaf disease of *Hevea brasiliensis* a preliminary study. **Journal of the National Science Foundation**, Sri Lanka, v. 37, p. 135-138, 2009.

THAN, P. P.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, Chichester, v. 57, n. 3, p. 562–572, 2008.

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

TOZZE JÚNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81 f. 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 JÚNIOR, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 270–280, 2015.

TUITE, J. **Plant pathological methods**: fungi and bacteria. Minneapolis: Burgess Publ., 1969. 239 p.

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi**: a study on two extreme cases. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology, Uppsala, v. 917, 2004. 72 p.

WASTIE, R. L. Secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*: factors affecting the production, germination and viability of spores of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v. 72, n. 3, p. 273–282, 1972.

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

ZAKARIA, M.; BAILEY, J.A.; AHMAD, M. F. Susceptibility of upper and lower leaf surfaces, and effect of *Hevea brasiliensis* (rubber) leaf to *Colletotrichum* isolates from forest tree. **Journal of Tropical Forest Science**, Selangor Darul Ehsan, v. 15, n. 3, p. 497-501, 2003.

3 **CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO INICIAL DE RESISTÊNCIA DE CLONES DE SERINGUEIRA A *COLLETOTRICHUM SP***

RESUMO

A melhor maneira de manejar a antracnose é com o uso de materiais resistentes, portanto esse trabalho buscou identificar fontes de resistência a *Colletotrichum* em clones de seringueira utilizados no Brasil. 20 clones de seringueira foram avaliados em laboratório e em jardim clonal. Para a inoculação em laboratório foram usados três isolados de *Colletotrichum*, sendo um pertencente à espécie *C. siamense* (isolado CH93) e dois a espécie *C. acutatum* (isolado CH102 e CH130). A inoculação dos clones foi realizada a partir da deposição de um disco de meio BDA contendo sobre folíolos destacados dos materiais. Na avaliação em jardim clonal foram coletadas cinco amostras ao acaso com cinco folíolos de três plantas diferentes que foram levados para análise no laboratório. Os resultados apontam que os clones IAC 507 e IAC 502 apresentaram grande resistência aos 3 isolados testados e que em jardim clonal IAC 507 não exibiu sintomas da doença. Foi observado que o grupo de clones testados teve reação diferenciada conforme o isolado usado. Os resultados fornecem subsídios para o desenvolvimento de pesquisas mais aprofundadas com os clones que se mostraram resistentes a *Colletotrichum*.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*. Antracnose. Controle genético.

ABSTRACT

The best way to manage rubber anthracnose is the use of resistant materials, so this work sought to identify sources of resistance to *Colletotrichum* in rubber tree clones used in Brazil therefore this study sought to identify resistance sources to *Colletotrichum* in rubber tree clones used in Brazil. Twenty rubber tree clones were evaluated in the laboratory and in the clonal garden. For laboratory inoculation, three isolates of *Colletotrichum* were used, one belonging to the species *C. siamense* (isolate CH93) and two to the species *C. acutatum* (isolate CH 102 and CH130). Inoculation of the clones was performed from the deposition of a disc of BDA medium containing detached leaflets of the materials. In the clonal garden evaluation, five random samples were collected with five leaflets from three different plants that were taken for laboratory analysis. The results indicate that the clones IAC 507 and IAC 502 showed great resistance to the 3 isolates tested and that in clonal garden IAC 507 showed no symphon. It was observed that the group of clones tested had different reaction according to the isolate used. The results provide insights for further research into clones that were resistant to *Colletotrichum*.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Anthracnose. Genetic control.

3.1 INTRODUÇÃO

A antracnose da seringueira é uma doença fúngica, causada pelo gênero *Colletotrichum*, que atinge as plantas em diferentes órgãos e estágio fenológico. Em campo a doença causa infecções em folhas, ramos, inflorescência e painel de sangria (SILVEIRA; CARDOSO, 1987; SILVEIRA *et al.*, 1992), em jardim clonal e viveiros afeta hastes e gemas, o que representa um problema no processo de produção de mudas (FURTADO; SILVEIRA, 1992).

Atualmente há poucas alternativas para o controle da doença, a principal alternativa é o controle químico (SILVEIRA *et al.*, 1992; GASPAROTTO *et al.*, 2012), porém há apenas dois produtos registrados para o controle da doença no AGROFIT, um deles é um triazol com ingrediente ativo propiconazol e o outro é uma mistura de carboxamida e estrobirulina, sendo os ingredientes ativos fluxapiroxade e piraclostrobina, respectivamente.

Com a escassa oferta de produtos para o controle da doença no mercado, a chance do desenvolvimento de resistência pelo patógeno é muito grande. Tozze Júnior (2007), identificou diferença na sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* a diferentes fungicidas “in vitro”, entre esses isolados estavam *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense*, que estão entre os principais agentes causais da antracnose em seringueira.

Poucos trabalhos estudaram o controle genético da doença no Brasil (GASPAROTTO *et al.*, 2012). Furtado *et al.* (1994) avaliaram a desfolha decorrente da antracnose no Estado de São Paulo, enquanto Gonçalves *et al.* (2002), levantaram danos causados por *Colletotrichum* em painel de sangria de clones da série IAC 300. Mais recentemente (SANTOS, 2018), avaliou a resistência de diferentes clones a antracnose foliar quando inoculados com isolados de *Colletotrichum* no sudeste da Bahia. No Estado de São Paulo e para a série IAC 500, não há trabalhos avaliando clones em laboratório.

Tendo em vista a necessidade de identificar fontes de resistência genética ao patógeno, o objetivo deste trabalho foi identificar possíveis fontes de resistência à antracnose entre os clones utilizados no Estado de São Paulo e no Brasil

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Avaliação dos clones em laboratório

Nesta etapa foram coletadas folhas sadias de diferentes clones de seringueira no jardim clonal do Centro de Seringueira – IAC de Votuporanga-SP. Os clones utilizados foram: GT1, IAC 500, IAC 502, IAC 503, IAC 505, IAC 507, IAC 511, IRCA 109, IRCA 111, IRCA 317, IRCA 840, PB 217, PB 235, PB 311, PB 350, PC 119, PR 255, RRIM 600, RRIM 728, RRIM 937.

Os folíolos dos clones listados acima foram acondicionados em sacos plásticos com umidade após a coleta e levados ao laboratório de Fitopatologia da FCAT-Dracena no dia seguinte a coleta e inoculados com três isolados de *Colletotrichum* que haviam se demonstrado patogênicos anteriormente em teste realizado com o clone RRIM 600. Os isolados utilizados pertencem à espécie *C. siamense* (isolado CH93) e *C. acutatum* (isolado CH102 e CH130), sendo procedentes das cidades de Pindorama, Pirajuí e Botucatu, respectivamente.

A inoculação foi realizada através da deposição de um disco de micélio sobre a superfície adaxial dos folíolos de cada clone, que posteriormente foram mantidos em uma câmara úmida (UR de 90%), no escuro a 25°C, conforme metodologia descrita por Sierra (2010). No terceiro e sexto dia após a inoculação, os folíolos foram escaneados e as imagens obtidas foram analisadas através do programa Leaf Doctor (PETHYBRIDGE e NELSON, 2015), visando a obtenção da porcentagem de área lesionada em cada folíolo.

Cada isolado foi inoculado em três folíolos de cada clone, caracterizando um experimento em fatorial duplo (clone x isolado) com 3 repetições por tratamento. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, sendo que cada câmara úmida continha um tratamento. Os dados convertidos para raiz quadrada e submetidos ao Teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 1998).

3.2.2 Avaliação dos clones em jardim clonal

Nesta etapa do experimento foi realizada coleta de folíolos no jardim clonal no Centro de Seringueira em Votuporanga-SP. A coleta foi realizada no dia 18 de junho de 2019. Foram coletadas cinco amostras ao acaso com cinco folíolos de três plantas diferentes de cada clone, essas folhas foram acondicionadas em sacos plásticos com umidade e no dia seguinte levadas ao laboratório. Os clones avaliados foram os mesmos usados em laboratório.

Os folíolos coletados no jardim clonal foram levados ao laboratório, escaneados e a porcentagem de área lesionada foi aferida com o programa Leaf Doctor (PETHYBRIDGE; NELSON, 2015). Os resultados foram submetidos ao Teste Scott Knott ai nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 1998).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Avaliação dos clones em laboratório

Houve interação significativa entre clone e isolado, tanto para três dias após a inoculação quanto para seis dias, portanto os clones foram avaliados dentro de cada isolado, com os dados referentes à porcentagem de área foliar lesionada (Tabela 1 e 2).

Tabela 6 - Porcentagem de área foliar lesionada 3 dias após a inoculação de *Colletotrichum sp.* em folíolos de seringueira.

Isolados					
CH 93		CH 102		CH 130	
Clone	Lesão (%)	Clone	Lesão (%)	Clone	Lesão (%)
IAC 500	1,56 a (2,43)	IAC 500	2,13 a (4,54)	IAC 500	6,70 d (44,89)
IAC 502	2,16 a (4,67)	IAC 502	0,00 a (0,00)	IAC 502	0,00 a (0,00)
IAC 503	5,85 c (34,22)	IAC 503	2,46 a (6,05)	IAC 503	4,77 d (22,75)
IAC 505	2,14 a (4,85)	IAC 505	1,61 a (2,59)	IAC 505	0,71 a (0,50)
IAC 507	0,00 a (0,00)	IAC 507	0,95 a (0,9)	IAC 507	0,00 a (0,00)
IAC 511	3,97 b (15,76)	IAC 511	2,04 a (4,16)	IAC 511	4,53 c (20,52)
IRCA 109	5,73 c (32,83)	IRCA 109	2,57 a (6,60)	IRCA 109	0,84 a (0,71)
IRCA 111	6,40 c (40,96)	IRCA 111	8,22 c (67,57)	IRCA 111	6,21 d (38,56)
IRCA 317	4,30 b (18,49)	IRCA 317	6,88 b (47,33)	IRCA 317	4,59 c (21,07)
IRCA 840	6,17 a (38,07)	IRCA 840	6,55 b (42,90)	IRCA 840	3,21 b (10,30)
GT1	1,69 a (2,86)	GT1	2,63 a (6,92)	GT1	0,95 a (0,90)
RRIM 600	2,06 a (4,24)	RRIM 600	2,85 a (8,12)	RRIM 600	3,12 b (9,73)
RRIM 728	1,92 a (3,69)	RRIM 728	1,79 a (3,20)	RRIM 728	1,48 a (2,19)
RRIM 937	1,66 a (2,76)	RRIM 937	1,46 a (2,13)	RRIM 937	2,44 a (5,95)
PB 217	1,79 a (3,20)	PB 217	9,08 c (82,45)	PB 217	7,72 d (59,60)
PB 235	2,19 a (4,80)	PB 235	1,36 a (1,85)	PB 235	3,90 c (15,21)
PB 311	1,97 a (3,88)	PB 311	3,76 a (14,14)	PB 311	4,26 c (18,15)
PB 350	3,04 a (9,24)	PB 350	5,90 b (34,81)	PB 350	1,25 a (1,56)
PC 119	3,60 a (12,96)	PC 119	7,67 c (58,83)	PC 119	7,27 d (52,85)
PR 255	6,63 c (43,96)	PR 255	0,30 a (0,09)	PR 255	0,76 a (0,58)
CVT	37,25	CVT	37,25	CVT	37,25

Nota: (1) CVT: coeficiente de variação dos dados transformados em Raiz quadrada - $\sqrt{Y}$

(2) Valores seguidos seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si, pelo teste Scott Knott 5%.

(3) Valores entre parênteses representam os dados não convertidos em Raiz quadrada

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7 - Porcentagem de área foliar lesionada 6 dias após a inoculação de *Colletotrichum sp.* em folíolos de seringueira.

Isolados					
CH 93		CH 102		CH 130	
Clone	Lesão (%)	Clone	Lesão (%)	Clone	Lesão (%)
IAC 500	9,75 c (95,06)	IAC 500	9,02 d (81,36)	IAC 500	8,15 c (66,42)
IAC 502	9,89 c (97,81)	IAC 502	8,87 c (78,68)	IAC 502	5,88 b (34,57)
IAC 503	8,97 c (80,46)	IAC 503	6,55 c (42,90)	IAC 503	8,74 c (76,39)
IAC 505	9,48 c (89,87)	IAC 505	5,85 b (34,22)	IAC 505	5,99 b (35,88)
IAC 507	3,94 a (15,52)	IAC 507	7,36 c (54,17)	IAC 507	4,43 a (19,62)
IAC 511	7,84 b (61,47)	IAC 511	7,76 b (60,22)	IAC 511	8,24 c (67,90)
IRCA 109	9,75 c (95,06)	IRCA 109	9,64 d (92,93)	IRCA 109	8,74 c (76,91)
IRCA 111	10,00 c (100)	IRCA 111	10,00 e (100)	IRCA 111	10,00 d (100)
IRCA 317	10,00 c (100)	IRCA 317	8,59 d (73,79)	IRCA 317	8,77 c (76,91)
IRCA 840	9,53 c (90,82)	IRCA 840	8,61 d (74,13)	IRCA 840	9,62 d (92,54)
GT1	9,81 c (96,24)	GT1	8,06 d (64,96)	GT1	7,01 b (49,14)
RRIM 600	10,00 c (100)	RRIM 600	9,80 e (96,04)	RRIM 600	9,92 d (98,41)
RRIM 728	9,49 c (90,06)	RRIM 728	10,00 e (100)	RRIM 728	9,38 d (87,98)
RRIM 937	9,31 c (86,68)	RRIM 937	6,20 b (38,44)	RRIM 937	5,31 a (28,20)
PB 217	10,00 c (100)	PB 217	10,00 e (100)	PB 217	8,33 c (69,39)
PB 235	8,85 c (78,32)	PB 235	4,70 a (22,09)	PB 235	9,76 d (95,26)
PB 311	7,47 b (55,80)	PB 311	9,09 d (82,63)	PB 311	10,00 d (100)
PB 350	9,33 c (87,05)	PB 350	10,00 e (100)	PB 350	9,14 d (83,54)
PC 119	10,00 c (100)	PC 119	10,00 e (100)	PC 119	7,60 c (57,76)
PR 255	10,00 c (100)	PR 255	5,84 b (34,11)	PR 255	5,34 a (28,52)
CVT	8,38	CVT	8,38	CVT	8,38

Nota: (1) CVT: coeficiente de variação dos dados transformados em Raiz quadrada - $\sqrt{Y}$

(2) Valores seguidos pelas mesmas letras, não diferem entre si, pelo teste Scott Knott 5%.

(3) Valores entre parênteses representam os dados não convertidos em Raiz quadrada

Fonte: Próprio autor

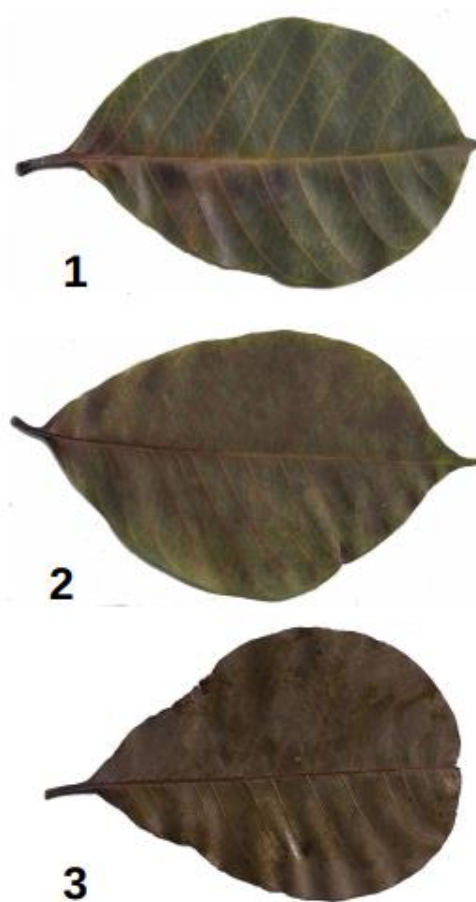
As figuras 1 e 2 exemplificam a diferença de agressividade entre clones aos 3 e 6 dias.

Figura 14 - Diferença de sintomas entre os clones (1) IAC 507, (2) IAC 511 (2) e (3) PC 217 no terceiro dia de avaliação.



Fonte: Próprio autor

Figura 15 - Diferença de sintomas entre os clones (1) IAC 507, (2) RRIM 937, (3) PC 119, no sexto dia de avaliação



Fonte: Próprio autor

No terceiro dia de avaliação o clone IAC 507 foi o que mais se destacou em termos de resistência a doença, não apresentando sintomas quando inoculado com os isolados CH 93 e CH 130 e exibindo poucos sintomas quando inoculado com o isolado CH 102, não diferindo estatisticamente do melhor clone dentro desse tratamento, IAC 502, que por sua vez também não apresentou sintomas com a inoculação de dois isolados, CH 102 e CH 130.

O clone IRCA 111 foi o que mais exibiu sintomas da doença nesse período, estando entre os com maior porcentagem de área lesionada estatisticamente em todos os isolados. Outros clones que apresentaram alta porcentagem de área lesionada foram IRCA 840 e IRCA 317.

Na avaliação realizada seis dias após a inoculação o clone IAC 507 continuou com o melhor desempenho entre os isolados CH 93 e CH 130, porém dentro do isolado CH 102 ele diferiu estatisticamente dos isolados que exibiram menos sintomas e figurou apenas no terceiro grupo estatístico, o pior desempenho dentro desse isolado já havia sido indicado na avaliação de três dias, porém ainda não havia diferença estatística. O clone IAC 502, por outro lado, não se manteve entre os materiais resistentes em nenhum dos isolados, demonstrando queda no potencial de resistência com o passar do tempo. Os clones que RRIM 937 e IAC 505, no geral, apresentaram capacidade de resistência um pouco acima da média.

Entre os clones mais suscetíveis após seis dias, é possível destacar IRCA 111 e RRIM 600, que figuraram nos piores grupos estatísticos em todos os isolados. Neste caso é importante salientar que o clone RRIM 600 é o mais plantado em todo o Estado de São Paulo.

A progressão da doença entre as avaliações indica que a resistência dos clones é horizontal, já que a presença da doença não foi inibida e sim reduzida em determinados clones. Portanto, no futuro, pretende-se realizar um experimento com mudas para que todo o aparato bioquímico da planta esteja preservado e seja possível analisar a resistência de maneira mais precisa.

Em relação a agressividade dos isolados houve diferença significativa na agressividade dos mesmos na avaliação realizada após seis dias. Os dados apontam

que o isolado CH 93, pertencente a espécie *C. siamense* é o mais agressivo que os outros isolados que pertencem a espécie *C. acutatum* (Tabela 3), levando a uma reação diferenciada de cada clone testado, por exemplo, o clone PR255 se mostrou resistente ao isolado CH102 e suscetível ao isolado CH93 (Figura 1). Saha *et al.* (2002), também observaram diferenças na agressividade de isolados de *Colletotrichum* em seringueira. Além da agressividade, os autores também concluíram que a morfologia dos sintomas era distinta entre as espécies, com *C. acutatum* provocando pontos salientes nas folhas e *C. gloeosporioides* causando sintomas de antracnose e lesões semelhantes a papel. Hunupolagama *et al.* (2017) também constataram diferenças na agressividade de isolados de *Colletotrichum* em folhas de seringueira, em experimento conduzido no Sri-Lanka. Nesse caso, *C. nymphaeae* foi mais agressivo em relação a *C. simmondsii*, *C. acutatum*, *C. laticiphilum* e *C. citri*.

Tabela 8 - Porcentagem de lesão causada pelos isolados CH 93, CH 102 e CH 130, 6 dias após a inoculação dos mesmos em folíolos de seringueira.

Isolado	Lesão (%)
CH 93	81,41 b
CH 102	69,15 a
CH 130	67,64 a
CV	15,79

Nota: (1) As médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si, pelo teste Scott Knott 5%.

Fonte: Próprio autor.

A diferença na agressividade de isolados em relação a diferentes clones foi constatada por Santos (2018), a autora observou que as lesões provocadas por um isolado pertencente a espécie *C. gloeosporioides* foram maiores em relação a dois isolados de *C. acutatum* e um de *C. boninense*, porém a agressividade dos isolados também diferiu em relação aos clones testados. O clone Fx 3865, por exemplo, apresentou maior resistência a *C. gloeosporioides* enquanto foi mais suscetível a *C. acutatum* e *C. boninense* em relação a outros 10 clones testados no trabalho. Esse resultado corrobora com os dados obtidos neste experimento, já que o isolado mais agressivo, CH 93, pertence ao complexo *C. gloeosporioides* enquanto CH 102 e CH 130 pertencem ao complexo *C. acutatum*.

Devido a essa variabilidade genética do patógeno é necessária a correta identificação dos isolados para correta adoção de medidas de controle (TAO, HYDE e CAI, 2012). Além disso processos de seleção de clones para plantio comercial de seringueira devem contemplar a capacidade de resistência do material à antracnose, atentando-se a diferença de cada clone a um determinado isolado de uma região ou espécie (SARMIENTO, 2013).

Freeman *et al.* (2000) constaram que a similaridade entre os isolados pertencentes ao grupo *C. acutatum* é maior que a existente no grupo *C. gloeosporoides*, que apresenta maior variabilidade genética, o que pode tornar o controle de espécies desse grupo mais difícil devido a variabilidade genética.

Devido a esses fatores é necessária a caracterização dos isolados presentes na área onde o plantio será realizado, para uma correta recomendação do clone a ser implantado.

3.3.2 Avaliação dos clones em jardim clonal

A avaliação em jardim clonal mostra uma inversão dos clones que mostraram resistentes em inoculações no laboratório (Tabela 4). Por exemplo, o clone RRIM 600, que se mostrou altamente suscetível a antracnose em laboratório não exibiu sintomas nos folíolos encontrados no jardim clonal. Os clones RRIM 937 e RRIM 728, apresentaram situação oposta ao RRIM 600, pois exibiram a maior porcentagem de área foliar lesionada com sintomas de antracnose. Porém foi observado que alguns clones, como o PC 119, apresentaram maior área foliar atacada, tanto em laboratório quanto em campo.

Tabela 9 - Porcentagem de área foliar com sintomas de antracnose de folíolos de diferentes clones de seringueira coletados em jardim clonal no município de Votuporanga-SP

Clone	Lesão (%)
IAC 507	0 a
RRIM 600	0 a
PC 119	0 a
PR 255	0,51 a
IAC 502	0,6 a
PB 311	1,08 a
PB 217	1,37 a
IAC 505	1,7 a
IRCA 111	2,18 a
GT1	2,75 a
PB 350	4,08 b
IRCA 317	4,24 b
IAC 500	4,96 b
IAC 511	5,61 b
PB 235	6,83 c
IRCA 109	7,85 c
RRIM 937	9,18 c
RRIM 728	9,31 c
CV	126,29

Nota: (1) As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Scott Knott 5%.

Fonte: Próprio autor

Estes resultados podem ser explicados pelo fato das amostras coletadas estarem com alta infestação de crosta negra (*Rosenscheldiella heveae* e *Phyllachora ruberi*) o que pode ter mascarado ou inibido a presença de sintomas de antracnose. Outro fator a ser considerado nesta avaliação é que as condições ambientais do período de coleta não eram favoráveis o desenvolvimento do *Colletotrichum* no campo.

O período de 15 dias que antecedeu a coleta apresentou apenas 5 mm de precipitação acumulada, temperatura média em torno dos 22 °C, enquanto a umidade relativa do ar não chegou aos 90% em nenhum dia durante esse período, tendo ultrapassado os 80% em apenas dois dias no período segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET, aferidos na estação de Votuporanga-SP. Essas condições diferem das condições favoráveis ao patógeno em campo segundo Gasparotto (2012), que indica maior severidade da doença em umidades relativas do ar superiores a 90% durante 13 horas do dia e temperatura ideal de desenvolvimento inferior a 21°C. Outro fator relacionado as condições climáticas que pode ter contribuído para a baixa presença da doença é a ausência de chuva, que é um dos principais meios de disseminação do patógeno.

Ainda em relação a presença da doença no campo, é necessário estudar o período de latência dos isolados de *Colletotrichum* em seringueira, já que o patógeno possivelmente encontrava-se na área, porém devido as condições climáticas desfavoráveis não havia sintomas da doença.

As condições ambientais também influenciaram o comportamento do clone RRIM 937. Em situação de campo, o clone não apresentou sintomas de antracnose nas folhas, porém em jardim clonal ele foi atacado pela doença. Possivelmente essa dinâmica deve-se ao fato de um maior adensamento de plantas no jardim clonal, o que leva a uma maior umidade relativa do ar e, conseqüentemente, gera condições favoráveis ao desenvolvimento da doença. Além disso, esse foi o único dos clones coletados em campo em que não se mostrou sintomas de crosta negra.

As condições ambientais, juntamente a variabilidade genética das espécies de *Colletotrichum* causadoras da doença devem ser observadas em conjunto nos estudos de resistência genética, pois como mostram os dados obtidos, ambas influenciarão no potencial de tolerância de diferentes clones a antracnose, e conseqüentemente afetarão a severidade da doença e a quantidade de desfolha promovida pela mesma, já que a queda de folhas reduzem o potencial fotossintético da planta e conseqüentemente a produção de látex (SAHA *et al.*, 2002).

A queda da produtividade de látex pela desfolha já foi observada por Vieira, Gomes

e Silva (2010). Esses autores constataram que a desfolha provocada pelos ácaros *Calacarus heveae* Feres e *Tenuipalpus heveae* Baker reduziu a produção de látex entre os meses de maio e agosto, sendo que os meses de julho e agosto apresentaram as maiores reduções de produtividade com 45,5% e 54,1%, respectivamente. Porém, os autores ressaltam que a desfolha apenas provocou redução de produtividade em meses de menor atividade fisiológica das árvores, portanto é necessária uma análise rigorosa para determinar se a desfolha provocada por pragas ou doenças, entre elas a antracnose, afetará significativamente a produtividade de látex.

O principal resultado obtido em termos de estudo de resistência foi a ausência de sintomas antracnose no clone IAC 507, que já havia se mostrado o mais promissor no ensaio de laboratório, porém assim como ocorreu com RRIM 600, mostrou sintomas de crosta negra neste período de coleta.

3.4 CONCLUSÕES

Há diferença na resistência a antracnose entre diferentes clones de seringueira.

Os clones IAC 507 e IAC 502 demonstraram potencial genético de resistência para o manejo da antracnose da seringueira.

A agressividade de isolados de *Colletotrichum* coletados de plantas de seringueira varia de acordo com o clone infectado.

REFERÊNCIAS

- FREEMAN, S. *et al.* Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 608-614, 2000.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar**: sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.
- GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J.C.R.; FURTADO, E.L. Doenças das Folhas. In: GASPAROTTO, L; REZENDE PEREIRA, J.C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Editora Embrapa, 2012. Cap. 3, p. 35 – 176.
- HUNUPOLAGAMA, D. M. *et al.* Unveiling Members of *Colletotrichum* acutatum Species Complex Causing *Colletotrichum* Leaf Disease of Hevea brasiliensis in Sri Lanka. **Current Microbiology**, New York, v. 74, n. 6, p. 747–756, jun. 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. *Site*. Brasília, DF, 2019. Disponível em: http://www.inmet.gov.br/sim/abre_graficos.php. Acesso em: 06 ago. 2019
- PETHYBRIDGE, S. J.; NELSON, C. S. Leaf doctor: a new portable application for quantifying plant disease severity. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 10, p. 1310-1316, 2015.
- SANTOS, T. R. **Diversidade de fungos no ambiente de seringais no sudeste da Bahia e resistência de genótipos de seringueira à antracnose foliar**. 2018. 131 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.
- SARMIENTO, S. S. **Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- SIERRA, J. F. H. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- SAHA, T. *et al.* Identification of *Colletotrichum* acutatum from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycological Research**, London, v. 106, n. 2, p. 215–221, 2002.
- TAO, G.; HYDE, K.D.; CAI, L. Species-specific real-time PCR detection of *Colletotrichum kahawae*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 114, p. 828-835, 2012.

VIEIRA, M. R.; GOMES, E. C.; SILVA, H. A. DE S. DA. Redução na produção de látex da seringueira provocada pela infestação de ácaros. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 5, p. 608–613, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A antracnose da seringueira é uma doença causada por espécies do gênero *Colletotrichum* relatada em diversas regiões do país e um fator limitante ao desenvolvimento da cultura. Devido a alta variabilidade genética desse grupo de patógenos e as alternativas de controle restritas a apenas dois fungicidas registrados no AGROFIT, é fundamental que se identifique corretamente o agente causal e que sejam desenvolvidas novas ferramentas de manejo para a doença, pois diferentes isolados do patógeno podem apresentar sensibilidades distintas aos fungicidas e desenvolver resistência aos produtos.

Com base nessas perspectivas esse trabalho buscou identificar e caracterizar diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. patogênicos a seringueira e testar diferentes clones da cultura quanto a sua resistência a doença, já que há poucos estudos sobre o controle genético da antracnose em seringueira.

Foram identificados dois complexos de *Colletotrichum* spp. como agentes causais da doença, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, sendo que não chegou-se a identificação a nível de espécies, pois houve variação da caracterização cultural e apenas a região ITS foi sequenciada, sendo que para se chegar a uma espécie específica é necessário trabalhar com mais regiões. Em relação a patogenicidade os isolados diferiram intra e inter complexos.

Quanto ao estudo com os clones, foi possível constatar que há diferença na resistência entre os mesmos em relação a antracnose da seringueira, que a agressividade dos isolados de *Colletotrichum* spp. varia de acordo com o clone e que os clones IAC 502 e IAC 507 apresentaram potencial de resistência a doença.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A. A.; CARMO, C. A. F. **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. 894 p.
- BATISTA, L. R. L. **Caracterização de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose nas culturas do maraujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) e da romãzeira (*Punica granatum* L.) na região Nordeste do Brasil**. 2016. 74 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo. 2016
- BETTIOL, W.; MAFFIA, L. A.; CASTRO, M. L. M. P. Control biológico de enfermedades de plantas en Brasil. *In*: BETTIOL, W.; RIVERA, M. C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE, J. R.; COLMENAREZ, Y. C. (ed.). **Control biológico de enfermedades de plantas em América Latina y el Caribe**. Montevideo: Universidad de la República, 2014. p. 91-138.
- BRAGA, C. S. **Indicadores econômicos da produção de borracha natural no Brasil**. Brasília, DF: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/artigos/artigo-tecnico-indicadores-economicos-da-producao-de-borracha-natural-no-brasil>. Acesso em: 27 nov. 2019.
- BROWN, A.; SOEPENA, H. Pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves of *Hevea* spp. **Mycological Research**, London, v. 98, n. 3, p. 264-266, 1994.
- 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.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 39, p. 183-204, 2009.
- CAI, Z. Y.; LIU, Y. X.; SHI, Y. P.; MU, H. J. First Report of Leaf Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* of Rubber Tree in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 12, p. 2528, 2016.
- CARPENTER, J. B.; STEVENSON, J. A. A secondary leaf spot of the *Hevea* rubber tree caused by *Glomerella cingulata*. **The Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 38, n. 7, p. 494-499, 1954.
- CORRÊA, L. T. S. P. **Cartilha Simplificada de Gestão de Custos em Seringais**. Goiânia: SEBRAE, 2018. 40 p. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/GO/Sebrae%20de%20A%20a%20Z/SERINGAIS.pdf>. Acesso em: 20 out. 2019.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; WHITE, J. F.; HILLMAN, B. I. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 717-732, 2009.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUTENBERG, J.H.C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 37-113, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUTENBERG, J.H.C.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 1-36, 2012b.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC, 1985. 355 p.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **The American Phytopathological Society**, June, v. 82, n. 6, p. 596, 1998.

FREEMAN, S. *et al.* Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 608-614, 2000.

FURTADO, E. L.; TRINIDADE, D. R. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p. 559-569.

FURTADO, E. L. Ocorrência de epidemia do mal das folhas em regiões de “escape” do Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 82, p. 1-6, 2015.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J. C. R.; FURTADO, E. L. Doenças das folhas. In: GASPAROTTO, L.; REZENDE PEREIRA, J.C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Editora Embrapa, 2012. Cap. 3. p. 35 – 176.

HILTON, R. N. **Maladies of hevea in malaya**. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaya, 1959.

HOLIDAY, P. South American leaf disease (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. CABI. **Phytopathological papers**, Wallingford, v. 12, p. 1-31, 1970.

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.

HUNUPOLAGAMA, D. M. *et al.* Unveiling Members of *Colletotrichum acutatum* Species Complex Causing *Colletotrichum* Leaf Disease of *Hevea brasiliensis* in Sri Lanka. **Current Microbiology**, New York, v. 74, n. 6, p. 747–756, jun. 2017.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - IAC. **Clones**. Campinas: Centro de Seringueira e Sistemas Agroflorestais, 2013. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/clones.php>. Acesso em: 1 nov. 2019.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR. **O cultivo da seringueira (Hevea spp.)**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2004. Disponível em: http://www.iapar.br/zip_pdf/cultsering.pdf. Acesso em: 24 nov. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. *Site*. Brasília, DF, 2019. Disponível em: http://www.inmet.gov.br/sim/abre_graficos.php. Acesso em: 06 ago. 2019

JAYASINGHE, C. K.; FERNANDO, T. H. P. S.; PRIYANKA, U. M. S. *Colletotrichum acutatum* is the main cause of *Colletotrichum* leaf disease of rubber in Sri Lanka. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, p. 53-56, 1997.

JAYASINGHE, C.K.; FERNANDO, T. H. P. S. Growth at different temperatures and on fungicide amended media: Two characteristics to distinguish *Colletotrichum* species pathogenic to rubber. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 143, p.93-95, 1998.

JIANG, G. Z.; SHI, Z. W.; LIU, Y. X.; HU, C. Y. A. New *Colletotrichum* Isolated from *Hevea brasiliensis*. **Tropical Agricultural Science & Technology**, Changsha, v. 39, n. 4, p. 5–8, 2016.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S. E.; DICKMAN, M. B. **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host-pathogen Interaction. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 45-56.

LIU, X.; LI, B.; CAI, J.; *et al.* *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Rubber Trees in China. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W. L. A.; *et al.* Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, Darmstadt, v. 27, n. 2, 2011.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Heidelberg, v. 27, p. 23-24, 2002.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

OLIVEIRA, M. D. M.; GONÇALVES, E. C. P. Custo de Produção e Rentabilidade da Cultura da Seringueira: safra 2018/19. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2019.

PEREIRA, W.V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PETCH, T. **The diseases and pests of the rubber tree**. London: MacMillan, 1921. 278 p.

PETHYBRIDGE, S.J.; NELSON, C.S. Leaf Doctor: A New Portable Application for Quantifying Plant Disease Severity. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n.10, out. 2015.

PIMENTA, A. A. **Caracterização morfométrica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

POLTRONIERI, T. P. de S.; AZEVEDO, L. A. S.; SILVA, D. E. M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 281-285, 2013.

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**, Chiang Mai, v. 39, p. 89-109, 2009.

SAHA, T. *et al.* Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycological Research**, London, v. 106, n. 2, p. 215–221, 2002.

SANTOS, T. R. **Diversidade de fungos no ambiente de seringais no sudeste da Bahia e resistência de genótipos de seringueira à antracnose foliar**. 2018. 131 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

SARMIENTO, S. S. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FREITAS, R. S.; GONÇALVES, P. S. O agrônomo. **Boletim Técnico-Informativo do Instituto Agrônomo**, Campinas, v. 69, p. 56, 2017.

SIERRA, J. F. H. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVA, J. Q. Manejo geral da seringueira. **Revista Campo e Negócios - Florestas**, Uberlândia, v. 13, p. 13, 2014.

SILVEIRA, A.P.; CARDOSO, R.M.G. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, n. 1-2, p. 19, 1987.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L.; LOPES, M. E. B. M. Antracnose: nova doença do painel de sangria da seringueira. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 18, p. 196-200, 1992.

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.

SOMAIN, R.; DROULERS, M. A seringueira agora é paulista. Confins. **Revue franco-brésilienne de géographie / Revista franco-brasileira de geografia**, São Paulo, n. 27, p. 1-30, 2016. Disponível em: <http://journals.openedition.org/confins/10906>. Acesso em: 3 dez. 2019.

STERLING, A.; RODRÍGUEZ, C.; BETANCURT, B.; MAZORRA, A.; DUSSAN, I.; GALINDO, L.; HERNANDEZ, J.; PLAZA, C. P.F.; GAMBOA, A. C. D.; MARTÍNEZ, O. Evaluación del desempeño y comportamiento fitosanitario de genotipos élités de H. brasiliensis de origen franco en Campo Clonal a Pequeña Escala CCPE. In: STERLING, A.; RODRIGUEZ, C (ed). **Nuevos clones de caucho natural para la Amazonia colombiana: énfasis en la resistencia al mal suramericano de las hojas (*Microcyclus ulei*)**. Manaus: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI. 2011. Cap. 4, p. 85-138.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control** (ed). Wallingford: CABI, 1992.

TAO, G.; HYDE, K.D.; CAI, L. Species-specific real-time PCR detection of *Colletotrichum kahawae*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 114, p. 828-835, 2012.

THAMBUGALA, T. A. D. P.; DESHAPPRIYA, N. The role of *Colletotrichum* species on the *Colletotrichum* leaf disease of *Hevea brasiliensis* a preliminary study. **Journal of the National Science Foundation**, Sri Lanka, v. 37, p. 135-138, 2009.

THAN, P. P.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, Chichester, v. 57, n. 3, p. 562–572, 2008.

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

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

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

TUITE, J. **Plant pathological methods**: fungi and bacteria. Minneapolis: Burgess Publ., 1969. 239 p.

VIEIRA, M. R.; GOMES, E. C.; SILVA, H. A. DE S. DA. Redução na produção de látex da seringueira provocada pela infestação de ácaros. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 5, p. 608–613, 2010.

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases**. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology, Uppsala, v. 917, 2004. 72 p.

WASTIE, R. L. *Gloeosporium* leaf disease of rubber in West Malaysia. Planter. **Kuala Lumpur**, [s. l.], n. 43, p. 533-565, 1967.

WASTIE, R. L.; JANARDHANAN, P. S. Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporoides*, *C. dematium* and *C. crassipes* to leaves of *Hevea brasiliensis*. **Transactions of the British Mycological Society**, [s. l.], v. 54, p.150-152, 1970.

WASTIE, R. L. Secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*: factors affecting the production, germination and viability of spores of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v. 72, n. 3, p. 273–282, 1972.

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

ZAKARIA, M.; BAILEY, J.A.; AHMAD, M. F. Susceptibility of upper and lower leaf surfaces, and effect of *Hevea brasiliensis* (rubber) leaf to *Colletotrichum* isolates from forest tree. **Journal of Tropical Forest Science**, Selangor Darul Ehsan, v. 15, n. 3, p. 497-501, 2003.

GLOSSÁRIO

Acérvulo - pequeno corpo frutífero assexuado típico dos fungos da classe Melanconiales. A estrutura é formada no interior do tecido da planta hospedeira. Responsável pela liberação de conídios.

Análise filogenética - análise da relação evolutiva entre grupos de organismos, que é descoberto por meio de sequenciamento de dados moleculares e matrizes de dados morfológicos.

Conídios - Esporos assexuados formados por mitose que são importantes para a dispersão desses organismos.

Peritécio - Corpo de frutificação de alguns fungos do filo Ascomycota. Possui formato de garrafa e libera ascósporos (esporos sexuais) através de um ostíolo.

Dendrograma - tipo específico de diagrama ou representação que organiza determinados fatores e variáveis. Um exemplo é o cladograma, que mostra relações evolutivas entre diferentes clados biológicos (árvore filogenética)

Intraespecífico - que ocorre entre indivíduos pertencentes à mesma espécie

Interespecífico - que ocorre entre indivíduos de espécies diferentes

Micélio - corpo vegetativo da maioria das espécies de fungos, composto de hifas agrupadas ou emaranhadas.

Plasticidade fenotípica - capacidade dos organismos de alterar a sua fisiologia ou morfologia de acordo com as condições do ambiente. Também pode ser definida como “a habilidade de um genótipo de produzir mais de um fenótipo quando exposto a

diferentes ambientes”.

Patogenicidade - capacidade de um microrganismo causar doença em uma determinada espécie vegetal.

Resistência genética - capacidade de um determinado genótipo resistir a o ataque de um determinado patógeno

Resistência horizontal - resistência poligênica, não específica. Resiste ao surgimento de novas raças do patógeno

Severidade - % da área ou do volume de tecido da planta coberto por sintomas

Variabilidade genética - resultado da recombinação genética e/ou acúmulo de mutações em um indivíduo ou grupo, que ocorrem em decorrência dos processos naturais do próprio organismo ou por exposição a fatores externos, derivação genética ou novas combinações a partir da reprodução sexuada.