UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Colletotrichum acutatum* E *C. gloeosporioides* ASSOCIADOS A CITROS, POR MARCADORES ISSR

Amanda Letícia da Silveira

Engenheira Agrônoma

2015

D

I

S

S.

/

S

I

L

V

E

I

R

A

A.

L.

2

0

1

5

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Colletotrichum acutatum* E *C. gloeosporioides* ASSOCIADOS A CITROS, POR MARCADORES ISSR

Amanda Letícia da Silveira

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

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

2015

Silveira, Amanda Letícia da
S587c Caracterização molecular de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados a citros, por marcadores ISSR / Amanda Letícia da Silveira. – – Jaboticabal, 2015
x, 39 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Antonio de Goes
Banca examinadora: Rita de Cássia Panizzi, Nilvanira Donizete Tebaldi
Bibliografia

1. *Citrus sinensis*. 2. Marcadores ISSR. 3. Região ITS. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 581.2:634.31

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

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Colletotrichum acutatum E C. gloeosporioides ASSOCIADOS A CITROS, POR MARCADORES ISSR

AUTORA: AMANDA LETÍCIA DA SILVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

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

Prof. Dr. ANTONIO DE GOES
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. RITA DE CASSIA PANIZZI
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. NILVANIRA DONIZETE TEBALDI
Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG

Data da realização: 16 de janeiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

AMANDA LETÍCIA DA SILVEIRA – nascida em 02 de julho de 1986, em Coromandel, MG, é Engenheira Agrônoma formada pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM), em abril de 2013. Foi bolsista de iniciação científica FAPEMIG no período de 2008 a 2010 e CNPq de 2010 a 2013. Em Agosto de 2013 iniciou o curso de mestrado em Agronomia, na área de Concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, câmpus de Jaboticabal. Durante o período de realização do curso de mestrado, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

“Ainda bem que sempre existe outro dia. E outros sonhos. E outros risos. E outras pessoas. E outras coisas.”

(Clarice Lispector)

Dedico,

À minha mãe (Ana Rosa) pelo amor, carinho e confiança a mim sempre dedicados. Meu exemplo de caráter e esforço.

Ao meu esposo (Márcio) pelo amor incondicional, apoio, paciência e motivação em todos os momentos.

Aos meus irmãos Aline e Luciano pelo carinho, amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força e presença em todos os momentos da minha vida.

Ao professor Antonio de Goes, pela orientação, amizade, confiança e exemplo de ser humano, a quem quero me espelhar profissionalmente pelo caráter, sabedoria e humildade.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal e a ao Programa de Produção Vegetal pela oportunidade e aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

As professoras Dra. Rita de Cássia Panizzi e Dra. Margarete Camargo pelo aprendizado e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Rosângela, Luís, Ângela e Wanderlei pela convivência e apoio.

Aos membros da banca examinadora pelas correções, sugestões e colaborações no trabalho.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular e à técnica Engenheira Agrônoma MS Andressa de Souza, que disponibilizaram a estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos Ayza, Antonio, Franciele e Janaína pelo apoio, amizade e paciência.

Às minhas amigas e colegas de laboratório Juliana, Fernanda, Laís, Marina e Ana Dulce pelos sorrisos, lágrimas e carinho. Aprendi muito com todas vocês.

À minha avó Emília pelo carinho e orações.

A toda minha família, tios, tias, primos e primas pela atenção, carinho e torcida.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma durante esta etapa.

SUMÁRIO

Página

RESUMO ii

ABSTRACT iii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1. Podridão floral dos citros (PFC) ou “Estrelinha” 4

2.1.1. Histórico 4

2.1.2. Etiologia e sintomatologia 4

2.1.3. Epidemiologia 6

2.2. Controle da doença 8

2.3. Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum* spp. 9

3. MATERIAL E MÉTODOS 12

3.1. Obtenção e preservação dos isolados de *Colletotrichum* spp 12

3.2. Extração de DNA dos isolados de *Colletotrichum* spp. 15

3.3. Reações com oligonucleotídeos específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* 16

3.4. Reações PCR - ISSR 18

3.5. Seleção dos marcadores ISSR 19

3.6. Análise dos dados 19

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 20

4.1. Obtenção da coleção de isolados 20

4.2. PCR com oligonucleotídeos específicos para *Colletotrichum* spp. 20

4.3. Seleção dos marcadores ISSR 22

4.4. Análise dos marcadores ISSR 23

5. CONCLUSÕES 29

6. REFERÊNCIAS 30

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Colletotrichum acutatum* E *C. gloeosporioides* ASSOCIADOS A CITROS, POR MARCADORES ISSR

RESUMO – A podridão floral dos citros (PFC) é uma importante doença dessa cultura, responsável por elevadas perdas de produção. Normalmente, essa doença mostra-se limitante quando ocorrem prolongados períodos chuvosos durante o florescimento das plantas ou quando existe intenso molhamento foliar. Duas espécies de *Colletotrichum* estão associadas à doença: *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Entretanto, recentemente tem-se verificado que, mesmo sob condições não tão propícias, a doença tem ocorrido com relativa frequência; suspeitando-se do envolvimento de outras espécies de *Colletotrichum* ou de novas condições de adaptação das espécies descritas. Esse trabalho teve como objetivo determinar se há ou não outra espécie de *Colletotrichum* associada a PFC e avaliar a viabilidade do emprego de marcadores moleculares ISSR na caracterização taxonômica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de PFC em flores, assim como de tecidos foliares e frutos cítricos assintomáticos. Para tanto, foi empregada uma combinação de iniciadores específicos, levando em conta a região ITS e marcadores moleculares ISSR. Os marcadores ISSR mostraram-se eficientes na caracterização taxonômica dos isolados de *Colletotrichum* analisados. A população avaliada foi constituída apenas por *C. acutatum* e *C*. *gloeosporioides*, descartando o envolvimento de uma espécie adicional, o que converge com os registros na literatura. Foi constatada alta diversidade genética entre os isolados analisados, o que também se mostra convergente quanto às diferenças fenotípicas observadas sob condições de campo. Entretanto, não foi encontrada relação quanto à origem e as espécies de *Colletotrichum* spp. associadas. De modo inédito, ainda que assintomaticamente, foi detectada a presença de um isolado de *C. acutatum* associado a frutos cítricos.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, marcadores ISSR, região ITS

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum acutatum* AND *C. gloeosporioides* ASSOCIATED WITH CITRUS, BY ISSR MARKERS

ABSTRACT – Postbloom fruit drop of citrus (PFD) is a serious disease of this crop, accounting for high yield losses. Usually, this disease shows to be limiting when there are prolonged rainy periods during plant flowering or when there is intense leaf wetness. Two *Colletotrichum* species are associated with the disease: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*. However, recently, it has been found that, even under not so favorable conditions, the disease has occurred with some frequency; one suspects the involvement of other *Colletotrichum* species or new adaptation conditions of the described species. This study aimed to determine whether there is another *Colletotrichum* species associated with PFD and it assess the viability of using molecular markers ISSR for taxonomic characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with PFD symptoms in flowers, as well as of leaf tissues and asymptomatic citrus fruits. For this purpose, we used a combination of specific primers, taking into account the ITS region and ISSR molecular markers. ISSR markers have proven to be effective for taxonomic characterization of the *Colletotrichum* isolates analyzed. The population assessed consisted only of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, discarding the involvement of an additional species, something which converges with records in the literature. We found high genetic diversity among the isolates analyzed, and this also shows to converge as for the phenotypic differences observed under field conditions. However, no relation was found regarding the origin and associated *Colletotrichum* spp. species. In an unprecedented way, although asymptomatically, we detected the presence of a *C. acutatum* isolate associated with citrus fruits.

Keywords: *Citrus sinensis*, ISSR markers, ITS region

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, sendo responsável por 22% da produção total de laranja e por 52% da produção de suco. O estado de São Paulo é o principal produtor do país (AGRIANUAL, 2014).

Dentre as doenças que afetam as plantas cítricas, a Podridão floral dos citros (PFC) é uma das mais importantes, podendo às vezes causar redução na produção em mais de 80%. O ambiente favorável é representado pela ocorrência de período chuvoso ou molhamento foliar prolongado, quando do florescimenrto das plantas (GOES et al., 2008).

Os sintomas característicos de PFC são representados pela presença de pétalas de coloração róseo-alaranjada, resultando na queda dos frutos jovens e retenção dos cálices. Às vezes, há a retenção dos frutos, porém esses se tornam amarelecidos, e não se desenvolvem, permanecendo na planta por vários meses. Quando as infecções ocorrem nos botões florais, esses não se desenvolvem, ocorrendo sua queda, mesmo antes da abertura das flores (FEICHTENBERGER et al., 2005).

A PFC é uma doença endêmica em diversas regiões de clima tropical úmido e subtropical das três Américas (FEICHTENBERGER et al., 2005). Normalmente, as variedades mais afetadas são aquelas de múltiplas floradas, como é caso da Pera (*Citrus sinensis*), limões verdadeiros (*C. limon*) e limas ácidas, especialmente a 'Tahiti' (*C. latifolia*). As demais variedades de laranjas doces, além da Pera, podem também ser severamente afetadas (GOES et al., 2008).

A PFC é ocasionada por *Colletotrichum acutatum* (BROWN et al., 1996) e *C. gloeosporioides* (LIMA et al., 2011). Ambos os patógenos apresentam comportamentos biológicos semelhantes, cujas epidemias podem ser frequentes em áreas que as condições climáticas sejam muito favoráveis, marcadas, principalmente, por molhamento foliar de pelo menos oito horas de duração. Entretanto, tem-se observado manifestações da doença mesmo em áreas cujo ambiente mostra-se menos propício a esses patógenos, notadamente sob períodos de molhamento foliar de menor duração. Pressupõe-se que tal comportamento poderá estar associado ao envolvimento de uma espécie adicional do patógeno, ou

a uma melhor adaptação do agente causal às condições ambientais prevalecentes, resultante, pois, de sua diversidade genética.

Em citros, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. é responsável por perdas em pós-colheita (BROWN, 1975; BROWN; BARMORE, 1977), porém, em muitas vezes apresentando comportamento oportunístico. Normalmente, *C. gloeosporioides* sobrevive saprofiticamente em folhas, ramos e outros tecidos doentes, onde produz acérvulos e grande quantidade de conídios. Quando sob condições favoráveis pode iniciar um processo infeccioso (WHITESIDE, 1988).

A determinação das espécies de fungos associadas aos diversos tipos de sintomas é essencial para os programas de quarentena, para o melhoramento genético das plantas, para o entendimento da epidemiologia do patógeno, e também para o controle eficiente do respectivo patógeno (FREEMAN et al., 1998; ANDRADE et al., 2007; CAI et al., 2009).

A identificação de fungos filamentosos está baseada, principalmente, em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. No entanto, esses métodos exigem tempo, nem sempre apresentam resultados precisos, e muitas vezes levam a diagnóstico e interpretações incorretas dos resultados (ATKINS; CLARK, 2004). Acresce-se a essas dificuldades a natureza polifilética de alguns patógenos (TAYLOR, 1995). Para o caso de fungos do gênero *Colletotrichum*, em particular, a literatura aponta que, em função de problemas dessa natureza, tem havido muitos equívocos na taxonomia de muitas espécies (PHOULIVONG et al., 2010), tornando necessário revisões do gênero, como realizada por Hyde et al. (2009a). Em função de dificuldades dessa natureza, outras técnicas têm sido utilizadas com vistas à caracterização e identificação das diversas espécies, incluindo as pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Dentre tais técnicas sobressai-se o emprego de ferramentas moleculares (NGUYEN et al., 2010).

Dentre as técnicas moleculares, a “Inter Simple Sequence Repeat” (ISSR), que se baseia em microssatélites, é uma alternativa para a caracterização fungos fitopatogênicos, incluindo-se estudos de polimorfismos. Esse marcador molecular tem se mostrado muito eficiente em análise da diversidade genética, na caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies de plantas (ISSHIKI et al., 2008). Por ser multiloco, esse marcador não necessita de conhecimento prévio

do DNA a ser avaliado (GUPTA et al., 1994), além de ser uma técnica de baixo custo, fácil uso e de grande reprodutibilidade (MATTHEWS et al., 1999).

O presente estudo teve como objetivos determinar se há ou não uma outra espécie de *Colletotrichum* associada a PFC e avaliar a viabilidade do emprego de marcadores moleculares ISSR na caracterização taxonômica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de PFC em flores, assim como de tecidos foliares, e frutos cítricos assintomáticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Podridão floral dos citros (PFC) ou “Estrelinha”

2.1.1. Histórico

A Podridão floral dos citros, PFC, foi relatada pela primeira vez em flores de laranjeiras doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) em Belize, América Central, no ano de 1957 (FAGAN, 1979). Posteriormente, a PFC foi relatada na Argentina (SCHWARZ et al., 1978), Colômbia e Panamá (FAGAN, 1979), República Dominicana (DENHAM, 1989), Trindade (FAGAN, 1984a), México (OROZCO SANTOS; GONZALES GARZA, 1986), Estados Unidos (McMILLAN Jr.; TIMMER, 1989), Costa Rica e Jamaica (TIMMER et al.,1994).

No Brasil, a PFC foi primeiramente descrita ocorrendo em pomares cítricos localizados no estado do Rio Grande do Sul, causando elevada redução na produção (DORNELLES, 1977; PORTO et al., 1979). Posteriormente, a PFC foi verificada em praticamente todos os estados produtores de citros no país, dentre eles São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas (GOES; KIMATI, 1997a).

2.1.2. Etiologia e sintomatologia

O agente causal da PFC foi descrito primeiramente como uma estirpe virulenta de *C. gloeosporioides*, sendo sua fase teleomórfica o ascomiceto *Glomerella acutata* (FAGAN, 1979).

Baseado nas características morfológicas e patogênicas, Agostini et al. (1992) descreveram três formas de *C. gloeosporioides*: FGG (“fast-growing gray”), SGO (“slow-growing orange”) e KLA (“key lime anthracnose”).

A forma FGG caracterizava-se pela produção de colônias de crescimento micelial rápido em meio de cultura e coloração acinzentada, conídios grandes, com as extremidades arredondadas e, geralmente, presente nos tecidos na forma quiescente (SONODA; PELOSI, 1988; AGOSTINI et al., 1992; TIMMER et al., 1994;

GOES; KIMATI, 1997a; TIMMER; BROWN, 2000). Essa mesma forma, porém originalmente descrita apenas como *C. gloesporioides*, já havia sido relatada na literatura como responsável por infecções em ramos, folhas e em frutos, tanto em pré como em pós-colheita, normalmente após ferimentos ou estresse de tecidos desses órgãos (FAWCETT, 1936; BROWN, 1975). A forma SGO, ainda segundo esses autores, caracterizava-se por crescimento micelial lento em meio de cultura, colônias com coloração esbranquiçada, e presença de massa de conídios de pigmentação alaranjada. Caracteristicamente os conídios eram de tamanho inferior àqueles da forma FGG, com extremidades obtusas e apressórios clavados. A terceira forma, KLA, associada à antracnose do limão 'Galego' (*C. aurantifolia* (Swingle)), apresentava características semelhantes à forma SGO, porém com apressórios pequenos e arredondados, além de tipicamente causar infecções em brotações de limoeiro ´Galego`, comportamento este não verificado pelas formas FGG e SGO.

Goes e Kimati (1997b), mediante estudos de isolados de *Colletotrichum* sp. associados à PFC de várias regiões do Brasil observaram a existência das mesmas formas descritas por Agostini et al. (1992). Nesse estudo, de acordo com os investigadores, foi verificada a possibilidade da separação dos grupos SGO, KLA e FGG em função do formato predominante dos apressórios e de suas dimensões. Associado às características morfológicas, esses autores observaram, mediante estudo complementar, a possibilidade da separação dos grupos quando seus respectivos isolados foram inoculados em flores de laranjas doces e em brotações de limão 'Galego' (GOES e KIMATI, 1997a).

Atualmente, após reclassificação realizada por Brown et al. (1996), as três formas de *C. gloeosporioides* passaram a integrar duas espécies: *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, com deferência às formas FGG, SGO e KLA, respectivamente. Embora a espécie *C. acutatum* tenham integrado as formas SGO e KLA, há divergência filogenética entre ambas as formas (PERES et al., 2008).

Para o caso de citros, por vários anos *C. gloeosporioides* foi considerado como um parasito fraco, ocasionando doenças somente quando da presença de ferimentos nos tecidos, ou quando os mesmos foram submetidos a condições de estresse. Todavia, em 2011, foi observado que essa espécie pode também

ocasionar sintomas de PFC (LIMA et al., 2011). De acordo com esses investigadores, mediante estudos com primers específicos, foi observado que dentre 139 isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de flores de laranjeiras doce, do estado de SP, com sintomas típicos de PFC, 115 pertenciam a espécie *C. acutatum*, e 24 a *C. gloeosporioides*. Testes de patogenicidade complementares confirmaram a patogenicidade das duas espécies.

Os primeiros sintomas da PFC ocorrem normalmente em flores abertas. Flores infectadas apresentam manchas de coloração marrom ou pêssego, podendo tornar-se salmão-róseo devido à formação de acérvulos. Em decorrência de ataques severos a infecção pode ocorrer antes mesmo da abertura dos botões florais (TIMMER et al., 1994).

As pétalas infectadas adquirem consistência rígida e permanecem firmemente aderidas ao disco basal (TIMMER et al., 1994; TIMMER; BROWN, 2000). Os frutos oriundos de flores infectadas tornam-se amarelados e caem rapidamente, enquanto que os discos basais, cálices e pedúnculos ficam fortemente aderidos aos ramos, e por isso recebem o nome de “estrelinhas”. Tais cálices podem permanecer aderidos aos ramos por até 18 meses. Plantas, quando com muitos cálices do ano anterior, apresentam atraso no florescimento, ou essa dá-se parcialmente, podendo comprometer a florada seguinte (FEICHTENBERGER, 1991). As folhas que estão próximas da inflorescência infectada apresentam-se frequentemente pequenas, com deformações, nervuras grossas, dando aos ramos uma aparência de roseta (TIMMER et al., 1994; TIMMER; BROWN, 2000). Associado a isso, ramos contendo cálices retidos apresentam alterações fisiológicas significativas, resultantes do desbalanço nutricional (GOES; CRESTE, 2000) e efeitos hormonais (TIMMER; BROWN, 2000; CHUNG et al., 2002; CHUNG et al., 2003; LI et al., 2003).

2.1.3. Epidemiologia

A sobrevivência de *C. acutatum* dá-se via apressório, formado sobre o tecido maduro de folhas, ramos e cálices retidos, ou mantendo-se na forma de infecção quiescente; endofiticamente, em tecidos vegetais (AGOSTINI et al., 1992; AGOSTINI; TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994); em hospedeiros alternativos

(FREEMAN et al., 2000; HOROWITZ et al., 2002); e no ambiente (NORMAN; STRANDBERG, 1997; FREEMAN et al. 2002).

Sobre tecido foliares de plantas cítricas, o apressório de *C. acutatum* germina emitindo uma hifa, da qual, posteriormente, são formados os conídios iniciais, sem a formação de acérvulos. Conforme vão surgindo novas flores, os conídios livres na superfície das folhas e cálices retidos são dispersos por respingos de água. A penetração do fungo ocorre diretamente, sem a formação de apressório, porém com subsequente formação de acérvulos. Nessas estruturas são formados grande número de novos conídios, seguido, posteriormente, da sua dispersão por respingos de chuva e vento. Na ausência de flores, o ciclo se reinicia com a sobrevivência em folhas, ramos e cálices retidos, sempre que as condições ambientais mostrem-se favoráveis (TIMMER et al., 1994).

Em testes “in vitro” realizados por Lima et al. (2011) com *C. acutatum* foi observado que durante um molhamento de 6 a 72 horas ocorre um aumento da germinação de conídios e formação de apressórios, sendo a temperatura ótima de 22 a 24 °C.

Quanto à temperatura, esta não se constitui em fator limitante à produção de infecções, porém, “in vitro”, todavia, a faixa ótima para o crescimento de *C. acutatum* ocorre entre 23 e 27 ºC (AGOSTINI et al., 1992; GOES, 1995; PERES, 1998). Porém, mesmo em temperaturas inferiores a 15 °C, o fungo apresenta bom desenvolvimento vegetativo. Em condições de campo, temperaturas baixas reduzem a incidência do fungo, porém, pode haver uma ampliação do período crítico de suscetibilidade, já que as flores desenvolvem-se mais lentamente, estendendo o seu período de exposição (TIMMER, 1993; TIMMER et al., 1994).

O patógeno é favorecido em condições climáticas que proporcionam mais de uma florada por ano, condição essa relativamente comum em regiões tropicais ou subtropicais, ou decorrente do comportamento de algumas variedades. Nessas condições, há um notável agravamento do problema (TIMMER et al., 1994).

Em locais onde predomina o clima tropical úmido, como Belize, região sul do México e Costa Rica, a PFC é fator limitante à produção de citros (FAGAN, 1979; OROZCO SANTOS; GONZÁLES GARZA, 1986; TIMMER; BROWN, 2000; PERES et al., 2002). Em outras regiões, a doença pode apresentar comportamento cíclico.

Por exemplo, no estado da Flórida, nos Estados Unidos da América, há grande variação nas perdas entre os anos, com epidemias graves em alguns deles, enquanto em outros, praticamente não há perdas. Situações semelhantes são também observadas em outros países, incluindo algumas áreas específicas no Brasil. No estado de São Paulo, entretanto, na região sudeste do estado as epidemias de PFC são recorrentes, ocasionando perdas em praticamente todas as safras (PERES et al., 2002).

A PFC afeta praticamente todas as variedades de laranjas doces de interesse comercial (AGOSTINI et al., 1992; BROWN et al., 1996; GOES; KIMATI, 1997a; PERES et al., 2008). No Brasil, as variedades cítricas com maiores índices da doença são aquelas que apresentam várias floradas no mesmo ano, notadamente os limões verdadeiros (*C. limon* (L.) Burm), limas ácidas 'Tahiti' (*C. latifolia*) e 'Galego' (*C. aurantifolia*) e laranja 'Pera' (*C. sinensis*) (FEICHTENBERGER, 1991). As demais variedades de laranjas doces podem também ser seriamente afetadas, com produção comprometida nos anos favoráveis ao patógeno quando do florescimento dessas plantas.

2.2. Controle da doença

Devido a maior incidência de PFC ocorrer no período de florescimento, práticas que contribuem na antecipação do florescimento para períodos mais secos, como uso de irrigação, na medida do possível devem ser implementadas (FEICHTENBERGER, 1994).

O controle químico tem sido a alternativa mais viável de controle da PFC, cujos fungicidas devem ser usados preventivamente, no período de florescimento das plantas (FAGAN, 1984b; DENHAM; WALLER, 1989; GOES et al., 2008). As pulverizações devem objetivar a proteção das flores, iniciando-se nas fases de primórdios florais, estendendo-se até a queda da pétalas (GOES et al., 2008). O número de aplicações é variável e dependente das condições climáticas e da duração e uniformidade do período de florescimento (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997). Normalmente de duas a quatro pulverizações podem ser suficientes. Entretanto, dependendo da temperatura, umidade e tempo de

exposição das flores, podem ser necessárias cinco ou mais pulverizações (GOES et al., 2008).

Os primeiros produtos químicos utilizados no controle da doença foram o captafol e os benzimidazóis (DENHAM; WALLER 1981). Dentre esses, o maior destaque foram o captafol, cuja utilização foi suspensa por volta dos anos 80, do século passado, e o benomyl, cuja fabricação e uso foram suspensas alguns anos depois.

Atualmente, para controle da PFC encontram-se registrados vários fungicidas, incluindo os pertencentes aos grupos químicos ftalimida, benzimidazóis, ditiocarbamatos e formulações comerciais contendo as misturas de estrobilurinas e triazóis (BRASIL, 2014). Dentre esses fungicidas, os pertencentes grupos ftalimida e os benzimidazóis, embora eficientes, são indicados apenas para pomares cuja produção seja destinada exclusivamente para o mercado de frutas “in natura” (NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2012). Atualmente, o controle alicerça-se quase que exclusivamente no emprego de formulações prontas, constituídas das misturas dos fungicidas dos grupos das estrobilurinas e triazóis.

Tão importante quanto à natureza e tipo dos fungicidas, o controle dos patógenos causais deve ser realizado mediante aplicações de fungicidas de forma preventiva, por todo período de florescimento das plantas (CINTRA, 2009).

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

Até recentemente, a identificação das espécies de *Colletotrichum*, assim como vários outros gêneros de fungos baseavam-se na ontogênese, morfologia, aspectos ecológicos e faixa de hospedeiros (SUTTON, 1992; TEBEEST et al., 1997; PHOTITA et al., 2005; THAUNG, 2008). Porém, tem-se verificado que a caracterização baseada exclusivamente nestes critérios, nem sempre ofereciam a confiabilidade necessária, devido às grandes variações morfológicas e fenotípicas resultantes de influências ambientais (HYDE et al., 2009b), além dos aspectos filogenéticos de alguns patógenos (TAYLOR, 1995). Todavia, ao longo dos anos e pelas dificuldades apontadas, técnicas mais modernas e seguras têm sido utilizadas, com destaque às moleculares (PERES et al., 2002; DU et al., 2005; PHOTITA et al.,

2005; ABANG et al., 2006; WHITELAW-WECKERT et al., 2007; THAN et al., 2008; KIM et al., 2009; NGUYEN et al., 2010).

Além da caraterização taxonômica, os métodos de estudos baseados nas sequências de DNA possibilitam também uma análise mais precisa da variabilidade genética, já que viabilizam a detecção de alterações mutacionais mesmo em regiões codificadoras de um número limitado de genes que se expressam em enzimas (CORREL et al., 1993; SREENIVASAPRAD et al., 1994). De acordo com Faleiro et al. (2004), o conhecimento da variabilidade genética do patógeno tem grande importância para vários aspectos biológicos, incluindo-se estudos de patogenicidade.

Estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares em *Colletotrichum* vêm sendo avaliados para diversas espécies, incluindo *C. graminicola* (VALÉRIO et al., 2005), *C. gossypii* (SILVA-MANN et al., 2002), *C. acutatum* (FREEMAN et al., 2001) e *C. gloeosporioides* (WEEDS et al., 2003), dentre outras.

Em vários estudos relacionados à sistemática molecular e filogenia de fungos, o cístron que codifica o DNA ribossomal (rDNA) tem sido utilizado com sucesso. A região ITS (“Internal Transcribed Spacer”) e os espaços intergênicos de unidades repetidas do rDNA nuclear variam entre espécies do mesmo gênero, ou entre populações (WHITE et al., 1990).

A comparação de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero levaram ao desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores táxon-específicos para a diferenciação entre espécies do gênero *Colletotrichum* por PCR (reação da polimerase em cadeia) (MILLS et al., 1992b). Esses iniciadores têm sido utilizados para a confirmação da identidade de isolados patogênicos a diversas espécies hospedeiras (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003; TOZZE JUNIOR, 2007; WACULICZ-ANDRADE, 2007; PILEGGI et al., 2009).

A “Inter Simple Sequence Repeat” (ISSR) é uma técnica que se baseia em microssatélites, sendo uma alternativa para o estudo de polimorfismos, por meio dos genomas. O marcador molecular ISSR tem se mostrado muito eficiente em análises da diversidade genética, e na caracterização de acessos e de cultivares de diversas

espécies de plantas (CHARTERS; WILKINSON, 2000; ISSHIKI et al., 2008). Esse marcador, por ser multiloco, não necessita de conhecimento prévio do DNA a ser avaliado (GUPTA et al., 1994). Além disso, é uma técnica de baixo custo, fácil uso e de grande reprodutibilidade (MATTHEWS et al., 1999).

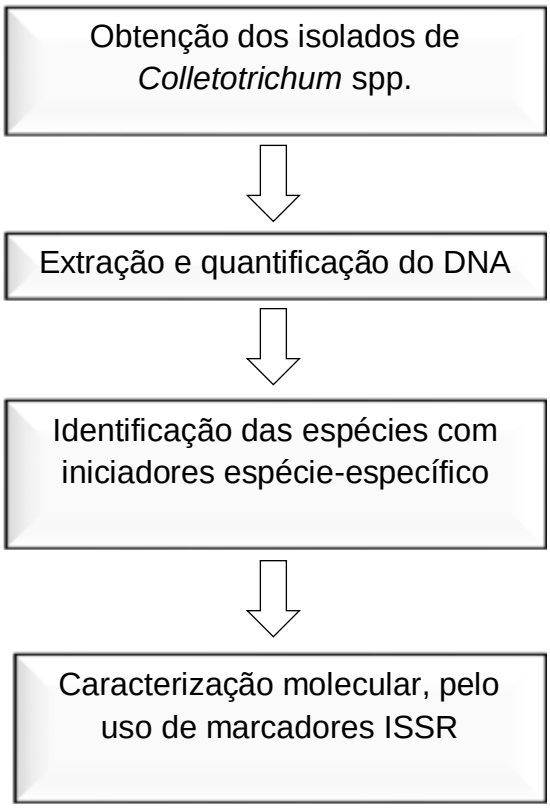
Os marcadores ISSR são amplificados por meio de PCR e não requerem o sequenciamento da região, resultando ainda na obtenção de padrões altamente polimórficos (NAGAOKA; OGIHARA, 1997). São dominantes, e podem gerar um grande número de alelos reproduzíveis e altamente polimórficos, utilizando um iniciador complementar a um microssatélite alvo. No trabalho realizado por Nghia et al. (2008), além de marcadores ISSR, foram utilizados outros caracteres como morfologia de colônia e dos conídios nos estudos de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de plantios de seringueira (*Hevea brasiliensis*), na Malásia. Neste trabalho, os autores concluíram que apenas os caracteres morfológicos não foram suficientes para diferenciar os isolados de *C. cassiicola*. Entretanto, apenas mediante o emprego desse marcador, foi verificada a viabilidade nos estudos de caracterização necessários, o que, obviamente, tornou-se possível credenciá-lo como técnica alternativa, isoladamente ou em conjunto com outras ferramentas, no estudo da variabilidade dos fungos.

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo dos isolados de *Colletotrichum* spp. foi realizado no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitossanidade. A etapa de caracterização molecular dos isolados foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal.

As atividades de trabalho foram realizadas conforme fluxograma:



3.1. Obtenção e preservação dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Flores com sintomas típicos de PFC foram coletadas de plantas cítricas das variedades Pera, Natal, Valência, Folha Murcha, Lima, Lima Verde, Bahia e Hamlin cultivadas nos municípios de Itapetininga, Santa Cruz do Rio Pardo e Brotas, SP. Foram coletadas também folhas e frutos assintomáticos da variedade Pera dos

municípios de Gavião Peixoto, SP e Uberaba, MG. As flores foram armazenadas em caixas térmicas e levadas para o Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP, para isolamento do patógeno.

Para o isolamento foram obtidos fragmentos de aproximadamente 5 mm^2 de pétalas sintomáticas, os quais, após desinfestação superficial, lavagem em água estéril e secagem em papel de filtro, foram depositados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) contidos em placas de Petri. Os mesmos procedimentos foram adotados para o isolamento de folhas e frutos cítricos assintomáticos. Posteriormente, as placas de Petri foram armazenadas em estufas para B.O.D., a 25 °C ± 1 °C, e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias foram selecionadas as colônias típicas de *Colletotrichum* spp., seguido de repicagem. Posteriormente, a partir de culturas puras, obteve-se culturas monospóricas. As culturas do patógeno foram subsequentemente armazenadas em água, conforme o Método Castellani (1939).

No total foram obtidos 40 isolados de *Colletotrichum* spp. de quatro regiões do estado de São Paulo e uma do estado de Minas Gerais, de diferentes órgãos vegetais da planta (Tabela 1). Estes isolados de *Colletotrichum* spp. foram utilizados nos estudos subsequentes.

Tabela 1. Referência dos isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados segundo variedades, procedência e tipo de tecido vegetal amostrado.

Referência[a]	Variedade	Origem	Tecido
FM.B.FL.9	Folha Murcha	Brotas (SP)	Flor
H.B.FL.2	Hamlin		Flor
H.B.FL.4	Hamlin		Flor
H.B.FL.10	Hamlin		Flor
L.B.FL.8	Lima		Flor
LV.B.FL.2	Lima Verde		Flor
N.B.FL.4	Natal		Flor
P.B.FL.3	Pera		Flor

N.I.FL.2	Natal	Itapetininga (SP)	Flor
N.I.FL.7	Natal		Flor
N.I.FL.10	Natal		Flor
P.I.FL.7	Pera		Flor
P.I.FL.12	Pera		Flor
V.I.FL.11	Valência		Flor
B.S.FL.7	Bahia	Santa Cruz do Rio Pardo (SP)	Flor
H.S.FL.2	Hamlin		Flor
H.S.FL.3	Hamlin		Flor
LV.S.FL.2	Lima Verde		Flor
LV.S.FL.7	Lima Verde		Flor
N.S.FL.3	Natal		Flor
N.S.FL.6	Natal		Flor
N.S.FL.8	Natal		Flor
P.S.FL.2	Pera		Flor
P.S.FL.6	Pera		Flor
P.S.FL.7	Pera		Flor
P.S.FL.8	Pera		Flor
V.S.FL.1	Valência		Flor
V.S.FL.5	Valência		Flor
P.GP.FR.1	Pera	Gavião Peixoto (SP)	Fruto
P.GP.FR.6	Pera		Fruto
P.GP.F.1	Pera		Folha
P.GP.F.5	Pera		Folha
P.U.FR.2	Pera	Uberaba (MG)	Fruto
P.U.FR.7	Pera		Fruto
P.U.FR.9	Pera		Fruto

P.U.F.1	Pera		Folha
P.U.F.3	Pera		Folha
P.U.F.4	Pera	Uberaba (MG)	Folha
P.U.F.5	Pera		Folha
P.U.F.6	Pera		Folha

[a] Por questões práticas, a designação dos isolados encontra-se representada pelas siglas separadas por um ponto, da variedade, do município e do tecido dos quais cada isolado foi obtido, respectivamente. O número adicional mencionado tem como objetivo facilitar a sua diferenciação.

3.2. Extração de DNA dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Para a extração de DNA, os isolados foram repicados para frascos de vidro de 110 mL, contendo meio de cultura líquido BD (batata-dextrose), mantidos por dez dias, no qual os mesmos formaram uma massa micelial. Após este procedimento, o micélio foi separado do meio de cultura com o auxílio de peneiras, dispensando-se o meio restante. Posteriormente, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e seco em placas de Petri, mantido em temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. Depois de seco o micélio foi macerado em nitrogênio líquido, formando um pó seco, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

As extrações de DNA foram baseadas no protocolo de Kuramae-Izioka (1997). Em cada tubo eppendorf contendo 0,1 g de micélio macerado de cada isolado, foi adicionado 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 100 mM pH 8,0 e SDS 0,5% (p/v)]. Os tubos com as soluções foram agitados em vórtex e em seguida levados a banho-maria a 65 °C por uma hora, sendo agitados delicadamente a cada 10 minutos. Após serem retirados do banho-maria, foram acrescentados 400 µL de acetato de potássio 5 M. A solução foi misturada por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Após a incubação em gelo, as amostras foram centrifugadas a 15294 g por 10 minutos a 10 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos tubos com o auxílio de uma pipeta e em seguida acrescentado a este volume 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sob as mesmas condições. Novamente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para

novos tubos. Posteriormente foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado à solução, sendo então misturada cuidadosamente e acondicionada em freezer -20 °C.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos com as soluções foram centrifugados a 15294 g por 20 minutos a 10 °C, descartando o sobrenadante, sendo o "pellet" lavado com 700 µL de etanol 70% (v/v). Mais uma vez os tubos foram submetidos a centrifugação a 15294 g por 7 minutos, a 10 °C, e a fase líquida foi novamente descartada e o "pellet" foi colocado para secar. O "pellet" foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 100 mM pH 8,0) por 24 horas a 4 °C.

Para a avaliação da quantidade e da qualidade do DNA extraído foi utilizado um espectrofotômetro NanoDrop 100 (Uniscience), medindo a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação de absorbância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, sendo considerado um DNA de boa qualidade valores no intervalo de 1,8 a 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 $g.mL^{-1}$) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas) para verificação da qualidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC 1000 (BioRad).

3.3. Reações com oligonucleotídeos específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

As amostras de DNA extraídas de *Colletotrichum* spp. foram submetidas a reação de PCR com iniciadores desenhados e desenvolvidos por Mills et al. (1992a), para amplificação de uma banda exclusiva de cerca de 500 pb para CaInt2 (5'GGGGAAGCCTCTCGCGG3'), específico para *C. acutatum*, e de aproximadamente 450 pb para CgInt (5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3'), específico para *C. gloeosporioides*, os quais foram utilizados em conjunto com o iniciador ITS4 para amplificação da região ITS (WHITE et al., 1990). Como padrões de amplificação foram utilizados um isolado de *C. acutatum* e um isolado de *C.*

gloeosporioides, provenientes de flores sintomáticas de podridão floral em citros, previamente identificados, mediante sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, utilizando-se o par de iniciadores ITS1/ITS4. O sequenciamento das amostras padrão foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microorganismos, do Departamento de Tecnologia, da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP.

As reações de PCR foram realizadas conforme Tabela 2. Foram utilizados tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 2,0 U de Taq DNA polimerase, $MgCl_2$ 2 mM, iniciador 5 pmol, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL. Para a amplificação com os pares de iniciadores CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4 as reações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf), sendo utilizado um ciclo a 95 ºC por 3 minutos, 35 ciclos a 94 ºC por 40 segundos, 64 ºC por 1 minuto para amplificação com o iniciador CaInt2/ITS4 ou a 54 ºC para o CgInt/ITS4 e 72 ºC por 1 minuto, e para finalizar 1 ciclo a 72 ºC por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,0 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb "DNA Ladder Plus" (Fermentas).

Tabela 2. Componentes de “mix”, suas respectivas concentrações estoque, volume e concentrações finais utilizadas nas reações PCR-iniciadores específicos (CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4) e PCR-ISSR.

Componentes	**Concentração estoque**	**Volume da reação (µL)**	**Concentração final**
Água Milli Q	-	14,65	q.s.p
Tampão	10x	2	1x
$MgCl_2$	50 mM	0,8	2,0 mM
Oligonucleotídeo	5 pmol	1	5 pmol
dNTP’s	10 mM	0,4	0,2 mM
Taq polimerase	5 U/µL	0,4	2 unidades
DNA	80 ng/µL	0,75	60 ng
DNA (ISSR)	80 ng/µL	0,75	60 ng
Total		20	

3.4. Reações PCR - ISSR

As reações de PCR foram realizadas conforme Tabela 2, onde foram utilizados os seguintes reagentes: tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); dNTP’s (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 2,0 U de Taq DNA polimerase, $MgCl_2$ 2 mM, iniciador 5 pmol, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL.

Para a amplificação dos iniciadores ISSR as reações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf), sendo utilizado um ciclo a 95 ºC por 3 minutos, 35 ciclos a 94 ºC por 40 segundos, T° variável de acordo com o iniciador por 1 minuto, e para finalizar 1 ciclo a 72 ºC por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM,

pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 $\mu g.mL^{-1}$) e visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb “DNA Ladder Plus” (Fermentas).

3.5. Seleção dos marcadores ISSR

Os oligonucleotídeos utilizados foram da marca Invitrogen Life Technologies. A escolha dos iniciadores foi baseada em trabalhos realizados com espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* ou que apresentaram alto polimorfismo, quando testados (WEISING et al., 1989; GUPTA et al., 1994; SOUZA et al., 2008).

Para a análise dos marcadores ISSR foram testados 28 iniciadores em 40 isolados de *Colletotrichum* spp. e foram realizados testes de temperatura para todos os iniciadores, afim de determinar a temperatura ideal dos mesmos.

3.6. Análise dos dados

Os géis contendo o produto das reações PCR-ISSR foram analisados manualmente, a partir dos quais obteve-se uma matriz binária, com o número 1 significando presença de banda, e o número 0 (zero), ausência. Essa matriz binária foi convertida em uma matriz de distância com auxílio do “software” PAUP (“Phylogenetic Analysis Using Parcimony” - Versão 4.0b10) (SWOFFORD, 2002), que foi utilizada para a construção de um dendrograma para visualização e análise das relações genéticas existentes entre os isolados. O dendrograma foi construído pelo método de Distância e algoritmo UPGMA (“Umweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average”) pelo “software” Mega 6.0 – “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (TAMURA et al., 2013). O mesmo “software” foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas entre os isolados. A consistência dos ramos obtidos no dendrograma foi avaliada pela análise de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985), com 2.000 reamostragens implementados no PAUP* v.4.0b10 (SWOFFORD, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção da coleção de isolados

Todos os 40 isolados obtidos e selecionados para análises apresentavam padrões culturais, assim como aspectos morfológicos que se enquadravam dentre aquelas descritas para o gênero *Colletotrichum* (SUTTON, 1992).

4.2. PCR com oligonucleotídeos específicos para *Colletotrichum* spp.

No presente estudo, foi verificado que dos 40 isolados de *Colletotrichum* spp. submetidos à identificação molecular, 24 deles apresentaram amplificação de uma banda específica, de cerca de 500 pb, para *C. acutatum*, quando submetidos à PCR com o par de iniciadores CaInt2/ITS4, enquanto que 16 isolados apresentaram amplificação de uma banda específica, de cerca de 450 pb para *C. gloeosporioides*, quando submetidos à PCR com o par de iniciadores CgInt/ITS4. Os estudos de PCR realizados com os iniciadores específicos CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4, confirmaram a identidade dos isolados como pertencentes à espécie *C. acutatum* e C. *gloeosporioides* (Tabela 3).

Tabela 3. Referência dos isolados avaliados e respectiva espécie segundo análises mediante oligonucleotídeos específicos para *Colletotrichum* spp..

Designação dos isolados			
Referência	**Espécies**	**Referência**	**Espécies**
FM.B.FL.9	*C. acutatum*	N.S.FL.6	*C. gloeosporioides*
H.B.FL.2	*C. acutatum*	N.S.FL.8	*C. gloeosporioides*
H.B.FL.4	*C. acutatum*	P.S.FL.2	*C. acutatum*
H.B.FL.10	*C. acutatum*	P.S.FL.6	*C. acutatum*
L.B.FL.8	*C. acutatum*	P.S.FL.7	*C. acutatum*
LV.B.FL.2	*C. acutatum*	P.S.FL.8	*C. acutatum*
N.B.FL.4	*C. acutatum*	V.S.FL.1	*C. gloeosporioides*
P.B.FL.3	*C. acutatum*	V.S.FL.5	*C. acutatum*

N.I.FL.2	*C. acutatum*	P.GP.FR.1	C.gloeosporioides
N.I.FL.7	*C. acutatum*	P.GP.FR.6	C.gloeosporioides
N.I.FL.10	*C. gloeosporioides*	P.GP.F.1	C.gloeosporioides
P.I.FL.7	*C. gloeosporioides*	P.GP.F.5	C.gloeosporioides
P.I.FL.12	*C. acutatum*	P.U.FR.2	*C. gloeosporioides*
V.I.FL.11	*C. acutatum*	P.U.FR.7	*C. acutatum*
B.S.FL.7	*C. acutatum*	P.U.FR.9	*C. gloeosporioides*
H.S.FL.2	*C. acutatum*	P.U.F.1	*C. gloeosporioides*
H.S.FL.3	*C. acutatum*	P.U.F.3	*C. gloeosporioides*
LV.S.FL.2	*C. acutatum*	P.U.F.4	*C. gloeosporioides*
LV.S.FL.7	*C. acutatum*	P.U.F.5	*C. gloeosporioides*
N.S.FL.3	*C. acutatum*	P.U.F.6	*C. gloeosporioides*

B: 'Bahia'; FM: 'Folha Murcha'; H: 'Hamlin'; L: 'Lima'; LV: 'Lima Verde'; N: 'Natal'; P: 'Pera'; V: 'Valência'.
B: Brotas; I: Itapetininga; GP: Gavião Peixoto; S: Santa Cruz do Rio Pardo; U: Uberaba.
FL: Flor; F: Folha; FR: Fruto.

Os géis de eletroforese ilustrando o produto da amplificação de 12 isolados de cada espécie (*C. acutatum* e *C. gloeosporioides*) selecionada encontram-se apresentados nas Figuras 1 e 2.

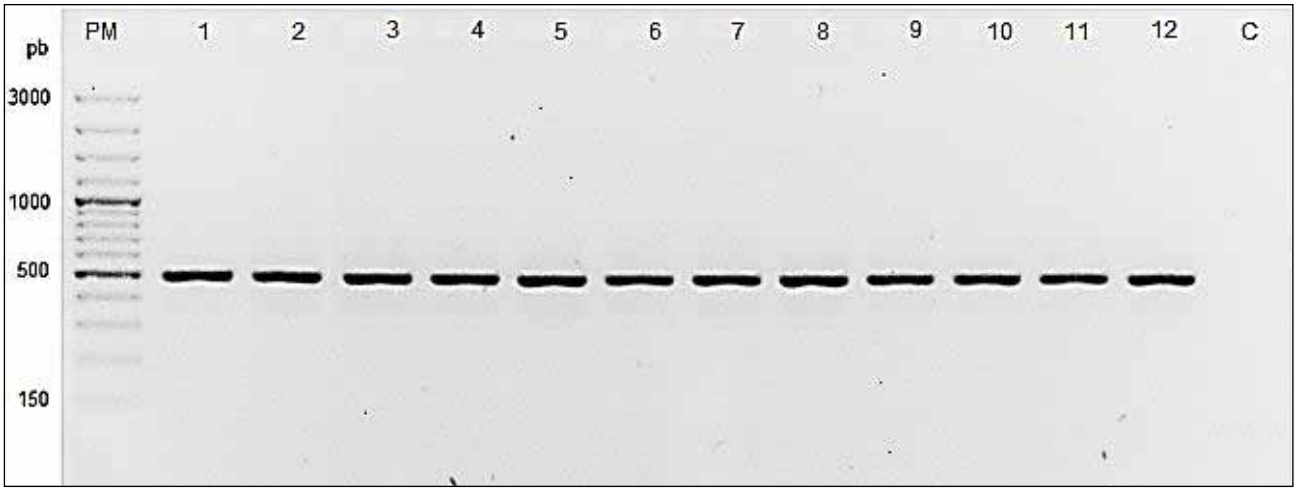


Figura 1. Padrão de bandas do produto de PCR com o oligonucleotídeo específico CaInt2/ITS4. PM: 100 pb "DNA Ladder Plus" (Fermentas). Números de 1 a 11 correspondem a isolados identificados como *Colletotrichum acutatum* e o número 12 referente a isolado padrão, classificado como *Colletotrichum acutatum* mediante sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2. C: "mix" livre de DNA.

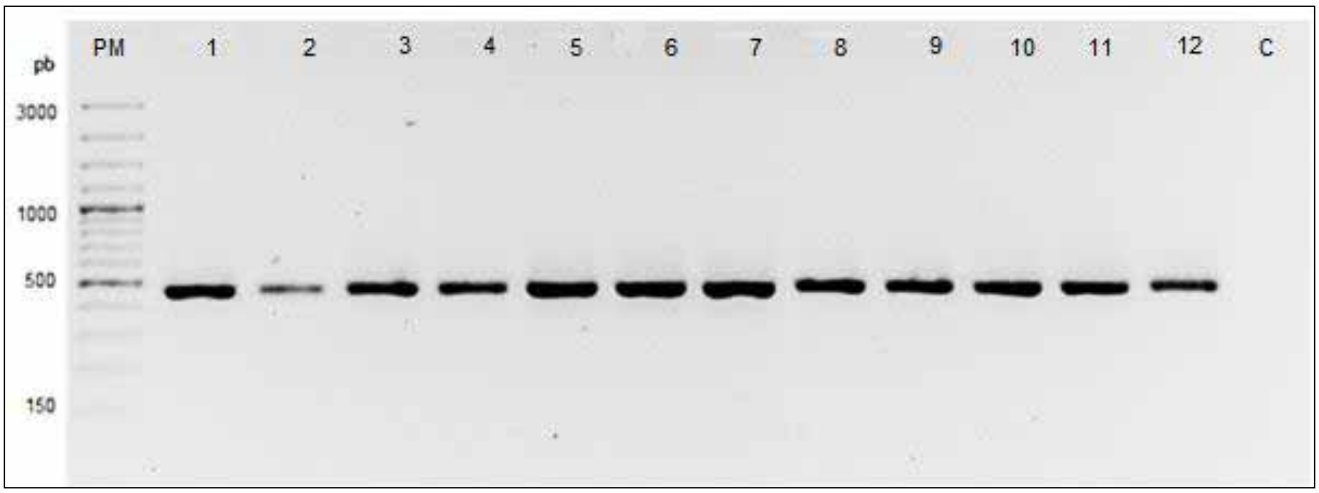


Figura 2. Padrão de bandas do produto de PCR com o oligonucleotídeo específico CgInt/ITS4. PM: 100 pb "DNA Ladder Plus" (Fermentas). Números de 1 a 11 correspondem a isolados identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* e o número 12 referente a isolado padrão, classificado como *Colletotrichum gloeosporioides* mediante sequenciamento da regiãoITS1-5.8S-ITS2. C: "mix" livre de DNA.

4.3. Seleção dos marcadores ISSR

Dos 28 iniciadores, dez foram selecionados, sendo escolhidos os que apresentaram maior polimorfismo, conforme disposto na Tabela 4, juntamente com suas sequências e temperaturas de amplificação.

Tabela 4. Relação de iniciadores utilizados, suas respectivas sequências, temperaturas de amplificação e número de bandas obtidas.

Iniciador	Sequência (5'– 3')	Temperatura de Amplificação	N° de Bandas
P7	ACAACAACAACAACA	48 °C	15
P8	AACAACAACAACAAC	48 °C	15
P10	AAGAAGAAGAAGAAGAAG	48 °C	11
P12	GACAGACAGACAGACA	48 °C	9
P14	GACACGACACGACAC	53,8 °C	14
P20	CTGAGAGAGAGAGAGAGA	48 °C	15
P22	GAGCAACAACAACAACAA	53,8 °C	9
AF80820	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48 °C	18
AF80821	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48 °C	19
AF80824	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	48 °C	13

O maior polimorfismo foi registrado quando se utilizou o iniciador AF80821 que amplificou 19 bandas, enquanto o menor número ocorreu mediante o emprego dos iniciadores P12 e P22, com nove bandas polimórficas.

O gel de eletroforese ilustrando o produto da amplificação utilizando um iniciador ISSR com elevado polimorfismo (AF80820) para *C. gloeosporioides e C. acutatum* encontra-se apresentado na Figura 3.

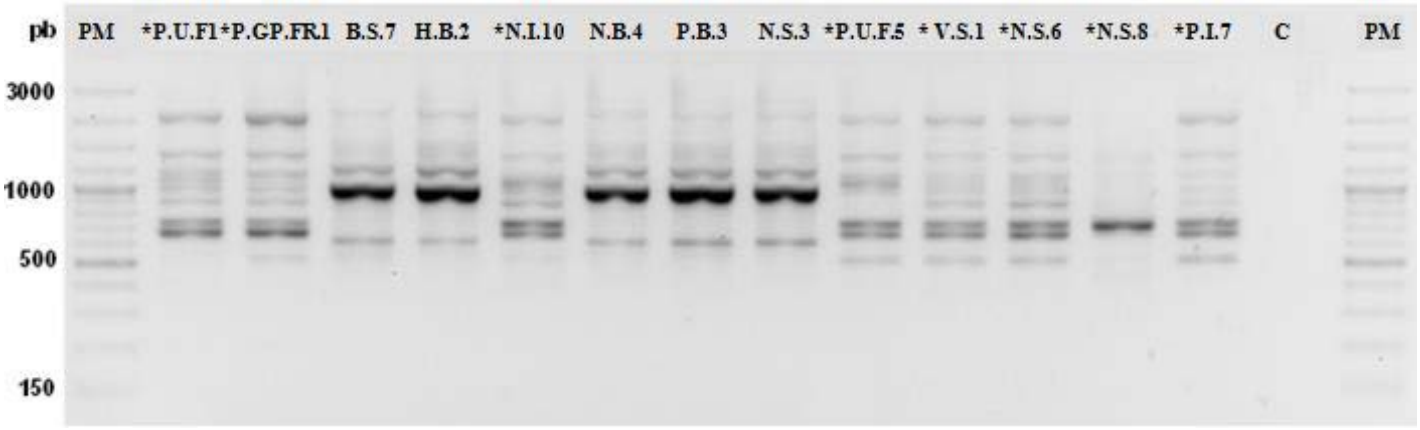


Figura 3. PCR com o iniciador ISSR (AF80820) referente a isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (*) e *C. acutatum* ( ). PM: "DNA Ladder Plus" (Fermentas). C: controle negativo, "mix" livre de DNA.

4.4. Análise dos marcadores ISSR

A análise do padrão de bandas geradas por cada um dos dez iniciadores em conjunto, possibilitou a obtenção de uma matriz binária e, subsequentemente, de uma matriz de distância, utilizada nas análises posteriores. A partir da matriz de distância foi verificada a presença de um total de 138 bandas polimórficas, assim como permitiu-se à obtenção de um dendrograma representado conforme Figura 4.

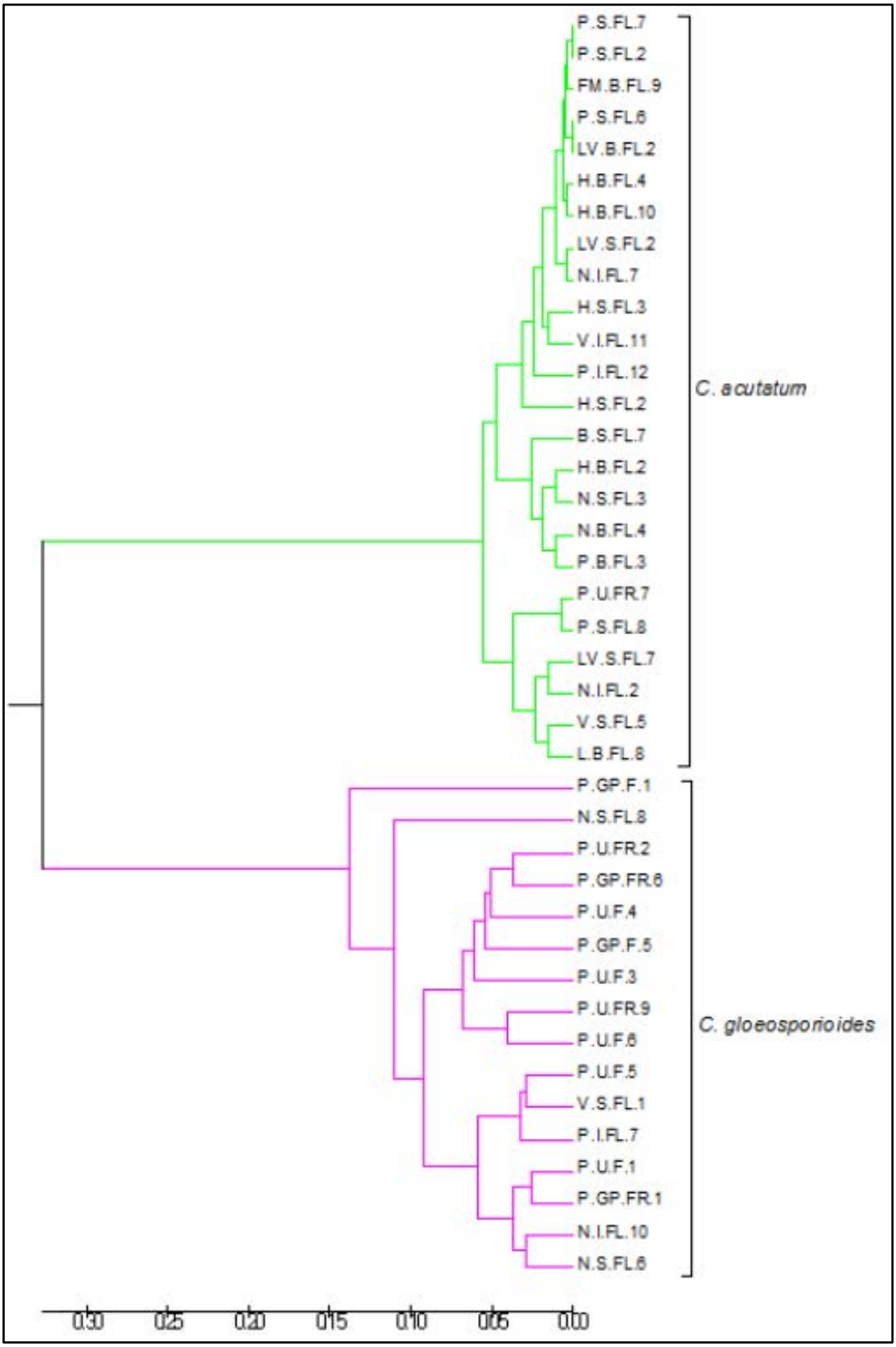


Figura 4. Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir do “software” MEGA 6.0. Os códigos à direita representam os isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados, e as respectivas espécies: *Colletotrichum acutatum* ou *C. gloeosporioides*.

Conforme dendrograma apresentado, verifica-se que foram obtidos dois grupos distintos, G1 e G2, correspondente respectivamente a *C. acutatum*, no grupo 1 (G1), e *C. gloeosporioides*, no grupo 2 (G2).

O grupo G1, constituído por 24 isolados de *C. acutatum*, é composto por 23 isolados (P.S.FL.8, LV.S.FL.7, N.I.FL.2, V.S.FL.5, L.B.FL.8, B.S.FL.7, N.B.FL.4, P.B.FL.3, H.B.FL.2, N.S.FL.3, H.S.FL.2, P.I.FL.12, H.S.FL.3, V.I.FL.11, LV.S.FL.2, N.I.FL.7, H.B.FL.4, H.B.FL.10, FM.B.FL.9, P.S.FL.7, P.S.FL.2, P.S.FL.6 e LV.B.FL.2) oriundos unicamente de flores sintomáticas, procedentes de quatro municípios do estado de São Paulo, e um isolado obtido de fruto cítrico assintomático (P.U.FR.7), coletado em Uberaba, MG. Em G1 não foi observada relação entre a espécie *C. acutatum* e a procedência da qual o tecido vegetal foi amostrado.

O grupo 2 (G2) foi constituído por 16 isolados de *C. gloeosporioides*. Desse número, cinco isolados foram obtidos de flores sintomáticas de laranjeiras Pera, Valência e Natal pertencentes a pomares cítricos localizados nos municípios de Santa Cruz do Rio Pardo e Itapetininga (P.I.FL.7, V.S.FL.1, N.S.FL.6, N.S.FL.8, N.I.FL.10), e sete de folhas assintomáticas de plantas cítricas localizadas em Uberaba e Gavião Peixoto (P.U.F.1, P.U.F.3, P.U.F.4, P.U.F.5, P.U.F.6, P.GP.F.1, P.GP.F.5). Os quatro isolados restantes provieram de frutos assintomáticos, coletados em Uberaba e Gavião Peixoto (P.U.FR.2, P.U.FR.9, P.GP.FR.1, P.GP.FR.6).

No geral, em G2 não foi constatada relação entre a espécie *C. gloeosporioides* e a procedência dos isolados, assim como quanto a município, órgãos das plantas ou variedades de citros das quais os mesmos foram obtidos.

A análise de "bootstrap" contou com uma matriz de dados de ISSR com 132 caracteres, sendo quatro constantes, 15 caracteres variáveis, porém não informativos para parcimônia, e 119 caracteres informativos. Esta análise reafirmou a presença de um grupo formado por isolados de *C. acutatum* com uma porcentagem de "bootstrap" (PB) de 100% (Figura 5). Os isolados N.S.FL.8, P.U.F.1, P.GP.FR.1, N.I.FL.10, P.U.F.5, V.S.FL.1 e P.I.FL.7, embora classificados como *C. gloeosporiodes* segundo os primers específicos, mostrou maior proximidade filogenética dos isolados de *C. acutatum* com PB de 68%.

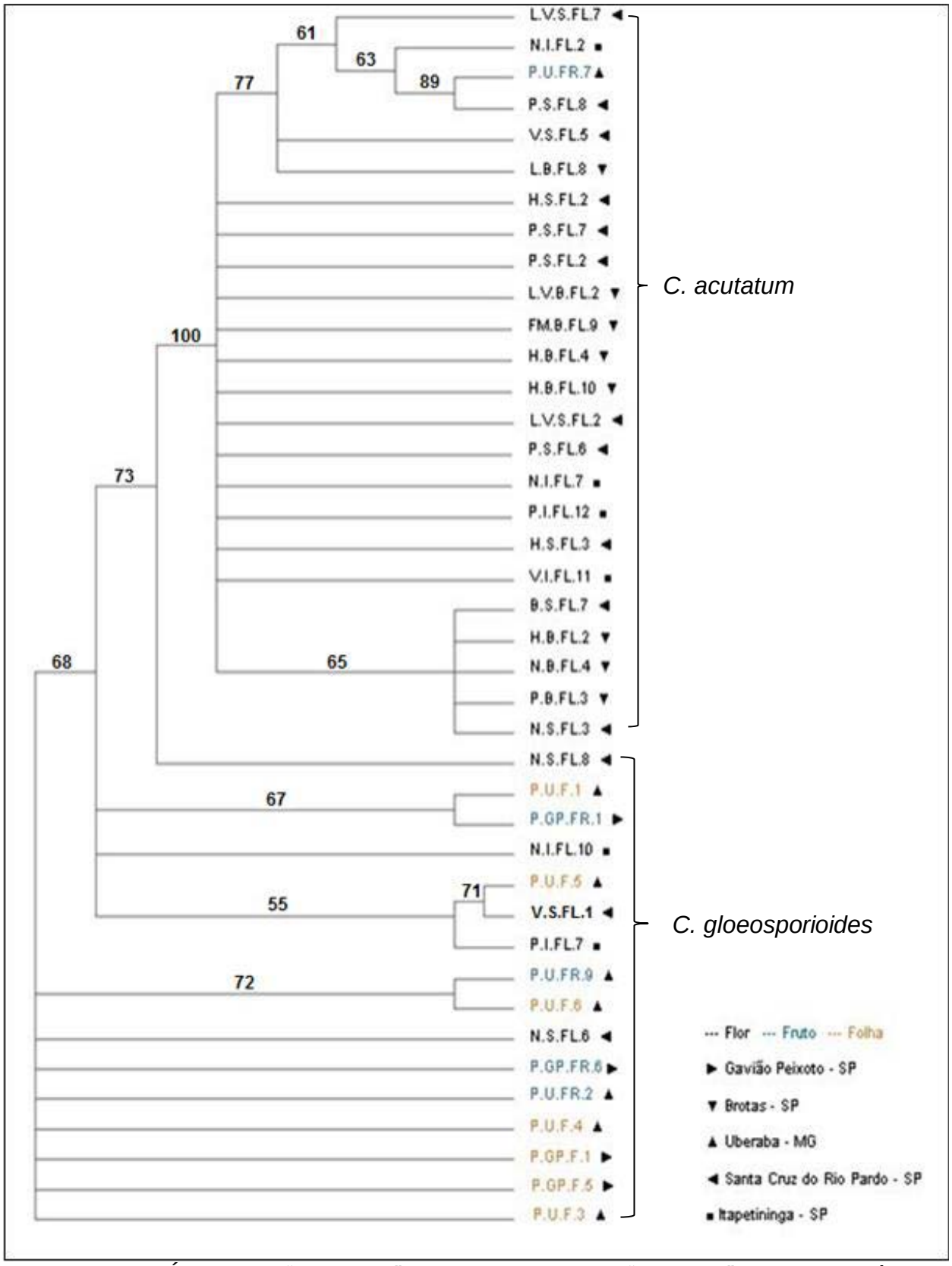


Figura 5. Árvore de “bootstrap” gerada a partir do “software” Paup. Os códigos à direita representam os isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente, e os números entre os ramos representa a porcentagem de “bootstrap”.

De acordo com a literatura, *C. acutatum* comporta-se, em citros, como necrotrófico durante o curto período de florescimento, porém, pode viver biotroficamente, por muito tempo, na forma de apressórios, ou na forma de infecção quiescente em folhas, ramos e em cálices retidos (AGOSTINI; TIMMER, 1994; ZULFIQAR et al., 1996; PERES et al., 2005). De acordo com tal comportamento, admite-se a possibilidade que o mesmo possa eventualmente ser detectado em diversos tecidos da parte aérea da planta. Todavia, não há na literatura registros da sua detecção em frutos, mesmo assintomaticamente. A sua presença ocasional não é descartada, porém estudos para um melhor entendimento dessa relação fazem-se necessários.

Os resultados quanto as relações agrupamentos/origem dos isolados, ora obtidos, mostram-se convergentes àqueles obtidos por Nguyen et al. (2009). Segundo esses autores, mediante emprego de marcadores RAPD e microssatélites aplicados na caracterização molecular de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de grãos de café com sintomas de antracnose, de diferentes locais no Vietnã, verificou-se que não houve discriminação quanto à relação envolvendo agrupamento e sua procedência, assim como entre os respectivos agrupamentos e respostas quanto aos seus níveis de expressão de sintomas. De forma semelhante, Souza et al. (2013), mediante estudos realizados com isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* obtidos de mangueiras (*Mangiferae indicae*), verificaram que esses patógenos enquadraram-se em dois grupos distintos, porém, de forma semelhante ao obtido no presente estudo, sem relação quanto a munícipio, órgão vegetativo e variedades de mangas avaliadas.

Mediante análise da distância genética entre os isolados, observou-se que os isolados de *C. acutatum* (G1) apresentaram menor diversidade genética (0,079) em relação aos isolados de *C. gloeosporioides* (G2) (0,172), acompanhado também, de uma alta diversidade genética entre os isolados das duas espécies (0,655).

Os estudos com marcadores moleculares ISSR apontaram uma alta diversidade genética entre os isolados *C. gloeosporioides* (aproximadamente 65%), em relação ao grupo de *C. acutatum*. A variabilidade genética é uma condição presente nos patossistemas silvestres preservados e é aumentada nos agroecossistemas. A alteração do padrão dos cultivos, por meio do melhoramento, a

ampliação de fronteiras agrícolas, e o uso intensivo de defensivos agrícolas são fatores que aumentam a força da seleção exercida sobre as populações de patógenos, favorecendo a geração de novos genes de virulência e aumento no grau de polimorfismo na estrutura dessas populações (ARAYA, 2003). Possivelmente a maior diversidade genética na população de *C. gloeosporiodes* resulta do longo período de coexistência dessa espécie às plantas cítricas, e pela elevada pressão de seleção decorrente das profundas modificações do ecossistema citrícola, especialmente do uso intensivo de defensivos empregados na cultura nos últimos anos.

O fungo *C. acutatum* é reconhecido como fungo cosmopolita, ocorrendo em citros e em diversas espécies de plantas, causando vários tipos de doenças (PERES et al., 2005). Comportamento semelhante aplica-se para *C. gloeosporioides*, igualmente cosmopolita, com consequente produção de infecções em flores de plantas cítricas (LIMA et al., 2011), e em dezenas de hospedeiros e por muitos anos apresentou um comportamento parasito facultativo, sendo importante como agente causador de doenças de pós-colheita dos frutos, ou, eventualmente, após ferimentos em diversos órgãos da planta (WHITESIDE, 1988). Tal condição saprofítica, grande facilidade de sobrevivência e alta produção de conídios (TIMMER et al., 2000) poderão ser fatores para contribuição do seu incremento populacional e, consequentemente, maior impacto econômico ao agronegócio citrícola. Porém, a importância relativa dessas espécies em citros, de forma individual e comparativa ainda não foi determinada.

Especula-se, entretanto, que sob condições práticas a população *C. acutatum* é a mais predominante, como observado no presente estudo, cuja frequência foi mais significativa, especialmente quando da análise em flores sintomáticas. Entretanto, a frequência de isolados de *C. gloeosporioides* encontrada nos órgãos florais é indicação de que o predomínio de isolados de *C. acutatum* poderá ser alterado, ao longo do tempo, advindo o equilíbrio, ou, possivelmente, com sobreposição de *C. gloeosporiodes* à população de *C. acutatum*.

5. CONCLUSÕES

Descarta-se o envolvimento de uma espécie adicional de *Colletotrichum* associado à podridão floral dos citros, contando-se como agentes causais apenas *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Marcadores ISSR são eficientes na caracterização taxonômica de isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* associados a flores de plantas cítricas com sintomas de PFC, assim como de folhas e frutos cítricos assintomáticos.

Existe diversidade genética entre isolados de *Colletotrichum* associados a flores de plantas cítricas com sintomas de PFC, assim como de folhas e frutos cítricos assintomáticos, especialmente em *C. gloeosporioides*.

Não há relação entre espécies de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* associadas a flores de plantas cítricas com sintomas de PFC, assim como de folhas e frutos cítricos assintomáticos, e respectivos órgãos amostrados e procedências.

De forma inédita, e ainda que assintomaticamente, foi detectada a presença de um isolado de *C. acutatum* associado a frutos cítricos.

6. REFERÊNCIAS

ABANG, M. M.; ASIEDU, R.; HOFFMANN, P.; WOLF, G. A.; MIGNOUNA, H. D.; WINTER, S. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 51-61, 2006.

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

AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 420-425, 1994.

AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W.; MITCHELL, D. J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 82, n. 11, p. 1377-1382, 1992.

AGRIANUAL 2014: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2009. 267 p.

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

ARAYA, C. M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 221-228, 2003.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** AGROFIT. Disponível em: <http: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons >. Acesso em: 27 dez. 2014.

BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L. W. Molecular characterization of Slow-growing Orange and Key Lime Antracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.

BROWN, G. E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 65, p. 404-409, 1975.

BROWN, G. E.; BARMORE, C. R. The effect of ethylene on susceptibility of Robinson tangerines to anthracnose. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 67, p. 120-123, 1977.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum.* **Fungal Diversity,** Chiang Mai, v.39, n. 1, p.183–204, 2009.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** Oxford, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHARTERS. Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as “in-groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 100, p. 160-166, 2000.

CHUNG, K. R.; SHILTS, T.; ERTURK, U.; TIMMER, L. W.; UENG, P. P. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. **FEMS Microbiology Letters,** New York, v. 226, p. 23-30, 2003.

CHUNG, K. R.; YUAN, R.; BURNS, J. K.; TIMMER, L. W. Involvement of hormones in symptomatology of postbloom fruit drop (PFD) of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 92, supl., p. 15, 2002.

CINTRA, G. S. **Podridão floral dos citros: Variabilidade, sobrevivência e controle do agente causal, *Colletotrichum acutatum*.** 2009. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal, 2009.

CORRELL, J. C.; MORELOCK, T. E.; GUERBER, J. C. Vegetative Compatibility and Virulence of the Spinach Anthracnose Pathogen, *Colletotrichum dematium*. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 77, n.7, p. 688-691, 1993.

DENHAM, T. G. Postbloon fruit drop disease, In: Whiteside, J. O; Garnsey, Timmer, L. W., Eds. **Compendium of citrus disease,** Saint Paul: APS Press, 1989. p. 24-25.

DENHAM, T. G.; WALLER, J. M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology,** Warwickshire, v. 98, n. 1, p. 65- 77, 1981.

DORNELLES, C. M. M. O problema da queda prematura de frutos jovens de citros no Rio Grande do Sul. In: **Mesa redonda para estudo da queda dos frutos jovens em citros**. Taquari, 1977. p. 3-6.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; VAILLANCOURT, L. J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia,** New York, v. 97, p. 641-658, 2005.

FAGAN, H. J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease Epidemiology. **Turrialba,** San Jose, v. 34, n. 2, p. 173-177, 1984a.

FAGAN, H. J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial and ground spraying. **Turrialba,** San Jose, v. 34, n. 2, p. 179-186, 1984b.

FAGAN, H. J. Postbloom fruit drop: a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology,** London, v. 91, n. 1, p. 13- 20, 1979.

FALEIRO, F. G.; NIELLA, G. R.; CERQUEIRA, A. R. R. N.; DAMACENO, V. O.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, A. S. G. Produção de micélio de *Crinipellis perniciosa* em quarto diferentes meios de cultura, visando extração de DNA. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 29, p. 312-315, 2004.

FAWCETT, H.S. **Citrus diseases and their control**. New York and London, Mc Graw, 1936. p. 656.

FEICHTENBERG, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Ceres, 2005. v. 2, p.239-269.

FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja,** Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-28, 1994.

FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja,** Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 513-521, 1991.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN, A. F.; CMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. 3. Ed. São Paulo: Editora Ceres, 1997. v.2, p. 280-284.

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

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology,** Saint Paul**,** v.91, n.10, p. 986-992. 2001.

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

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 66, n. 12, p. 5267-5272, 2000.

FREEMAN, S.; SHALEV, Z.; KATAN, J. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 86, n. 9, p. 965-970, 2002.

GOES A.; CRESTE J. E. Uso do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) na avaliação de folhas de plantas cítricas com sintomas de queda prematura de frutos. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 26, p. 237-240, 2000.

GOES, A. **Queda prematura dos frutos cítricos: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. [Sensu Arx, 1957], e controle da doença.** 1995. 143 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

GOES, A.; GARRIDO, R. B. O.; REIS, R. F.; BALDASSARI, R. B.; SOARES, M. A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporiodes*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 71-76, 2008.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 10-14, 1997a.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 4-9, 1997b.

GRAUR, D.; LI, W. **Fundamentals of Molecular Evolution**. 2ª edição, Sinauer Associates, Sunderland, 2000. P. 481.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum.* **Phytopathology,** Saint Paul, v. 92, n. 7, p. 743-749, 2002.

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**, Chiang Mai, v. 39, p. 147-182. 2009a.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 39, p. 1-17, 2009b.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M. R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, p. 186-190, 2008.

KIM, H.; LIM, T. H.; KIM, J.; KIM, Y. H.; KIM, H. T. Potential of crossinfection of *Colletotrichum* species causing anthracnose in persimmon and pepper. **The Plant Pathology Journal,** Suwon, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2009.

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

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J. K.; TIMMER, L. W.; CHUNG, K. R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** Geneva, v. 128, p. 578-583, 2003.

LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F. P.; MELO FILHO, P. A. *Colletotrichum gloeosporiodes*, a new causal agent of citrus postbloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, p. 157-165, 2011.

MATTHEWS, D.; MCNICOLL, J.; HARDING, K.; MILLAM, S. 5'-anchored simple-sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. **Plant Cell Reports,** Windsor, v. 19, p. 210-212, 1999.

McMILLAN, Jr., R. T.; TIMMER, L. W. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 73, n. 1. p. 81, 1989.

MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruit. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). ***Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control**, Wallingford: CAB International, p.269-288,1992a.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters,** New York, v.98, p. 137-143, 1992b.

MORIWAKI, J., SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* boninense sp. nov. from Japan. **Mycoscience,** Tokyo, v. 44, p. 47- 53, 2003.

NAGAOKA, T.; OGIHARA Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 94, p. 597-602, 1997.

NEI, M. & KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press. New York, 2000. p. 333.

NGHIA, N. A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M. P.; MALIK, A.; NAPIS, S. Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia,** The Hague, v. 166, p. 189-201, 2008.

NGUYEN, P. T. H.; PETTERSSON, O. V.; OLSSON, P.; LILJEROTH, E. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. **European Journal of Plant Pathology,** Dordrecht, v. 127, p. 73-87, 2010.

NGUYEN, P. T. H.; SALL, T.; BRYNGELSSON, T.; LILJEROTH, E. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. **Plant Pathology,** Oxford, v. 58, p. 898-909, 2009.

NORMAN, D. J.; STRANDBERG, J. O. Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leather leaf fern. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1177-1180, 1997.

NOTÍCIAS AGRÍCOLAS. **Carbendazim:** Fundecitrus orienta para a substituição de fungicida rejeitado pelos EUA. Disponível em: <http://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/laranja-citrus/101880>.Acesso em: 29/03/2012.

OROZCO SANTOS, M.; GONZÁLEZ GARZA, R. Caída de fruto pequeño y su control en naranja 'Valencia' en Veracruz. **Agricultura Técnica en México,** Del. Benito Juárez v. 12, n. 2, p. 259- 269, 1986.

PERES, N. A. R. **Caracterização patogênica, morfológica, cultural e molecular de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum* spp. em frutas pós-colheita.** 1998. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

PERES, N. A. R; MACKENZIE, S. J.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum.* **Phytopathology,** Saint Paul, v. 98, n. 3, p. 345-352, 2008.

PERES, N. A. R.; SOUZA, N. L.; ZITKO, S. E.; TIMMER, L. W. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 86, n. 6, p. 620-624, 2002.

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

PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J.; FORD, R.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, H. C.; HYDE, K. D. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity,** Chiang Mai, v. 18, p. 117-133, 2005.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE E. H. C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Indonesia, v. 44, n.1, p. 33-43, 2010.

PILEGGI, S. A. V.; OLIVEIRA, S. F. V.; WACULICZ-ANDRADE, C. E.; VICENTE, V. A.; DALZOTO, P. R.; CRUZ, G. K.; GABARDO, J.; MASSOLA, N. S .Jr.; TORRES, H. J. Jr.; PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERESAWA, L. V.; PIMENTEL, I. C.; GLIENKE, C. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*, **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 55, p. 1076-1088, 2009.

PORTO, O. de M; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C. M. M. Queda de frutos jovens de citros, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p. 681-692.

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

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

SCHWARZ, R. E.; KLEIN, E. H. J.; MONSTED, P. Fungal infection of citrus flowers: probable cause of abnormal fruit drop in the Parana mist zone of Misiones, Argentina. In: INTERNATIONAL PLANT PATHOLOGY CONGRESS, 3, 1978, Munich. **Abstract…** Munich: International Plant Pathology Society, 1978. p. 130.

SILVA-MANN, R.; MACHADO, J. da C.; CARVALHO, K. C. S.; VIEIRA, M.G.C. Estudo da variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodão por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia brasileira,** Brasília, v. 27 n. 1, p. 27-32, 2002.

SONODA, R. M.; PELOSI, R. R. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. **Proceedings of the Florida State Horticulture Society,** Winter Haven, v. 101, p. 36-38, 1988.

SOUZA, A.; CARBONI, R. C. D.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M.; GOES, A. Lack of host specificity of *Colletotrichum* spp. isolates associated with anthracnose symptoms on mango in Brazil. **Plant Pathology,** Oxford, v. 62, p. 1038-1047, 2013.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R. E.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus.* **Pesquisa agropecuária brasileira,** Brasília, v. 43, p. 843-849, 2008.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. **Mycological Research,** London, v. 98, p. 186-188. 1994.

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

SWOFFORD, D. L. **PAUP:** phylogenetic analysis using parcimony, version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution,** Oxford, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAYLOR, J. W. Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of mitosporic and meiosporic fungi. **Canadian Journal of Botany,** Ontario, v. 73, p. 754-759, 1995.

TEBEEST, D. O.; CORRELL, J. C.; WEIDEMANN, G. J. Specification and population biology in *Colletotrichum*. In: ESSER, K.; LEMKE, P. A. **The Mycota V, part B**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. p.157-168.

THAN, P. P.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P. W. J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology,** Oxford, v. 57, p. 562-572, 2008.

THAUNG, M. M. Coelomycete systematics with special reference to *Colletotrichum*. **Mycoscience,** Tokyo, v. 49, p. 345-350, 2008.

TIMMER L. W.; AGOSTINI, J. P.; ZITKO, S. E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 329-334, 1994.

TIMMER, L. W.; ZITKO, S. E. Relationship of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 77, n. 5, p. 501-504, 1993.

TIMMER, L. W.; BROWN, G. E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds). ***Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 300-316.

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

VALÉRIO, H. M.; RESENDE, M. A.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; CASELA, C. R. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. **Mycopathologia,** The Hague, v. 159, p. 449-459. 2005.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. **Sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA na identificação dos isolados de *Colletotrichum* endofíticos de *Maytenus ilicifolia*** Mart. ex Reiss. Monografia de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WEEDS, P. L.; CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. A.; RAMESH, C. R.; KEXIAN,Y.; KELEMU, S. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 93, n. 2, p. 176-185. 2003.

WEISING, K., WEIGAND, F., DRIESEL, A., KAHL, G., ZISCHER, H., EPPLEN, J. T. Polymorphic sample GATA/GACA repeats in plant genomes. **Nucleic Acid Research,** Oxford, v. 17, n. 23, p. 10128-10128, 1989.

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

WHITELAW-WECKERT, M. A.; CURTIN S. J.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; BLANCHARD, C. L.; ROFFEY, P. E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. **Plant Pathology,** Oxford, v. 56, p. 448-463, 2007.

WHITESIDE, J. O. Symptomless and quiescent infections by fungi. In: J. O. Whiteside, S. M. Garnsey, and L. W. Timmer, **Compendium of Citrus Diseases,** Saint. Paul, 1988. p. 30.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia,** Stanford, v. 88, p. 121-128, 1996.