

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Pós-graduação em Agronomia

**Caracterização morfológica, patogênica,
molecular e sensibilidade a fungicidas de
isolados de *Colletotrichum
gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.
agente causal da antracnose da mangueira
(*Mangifera indica* L.)**

Elaine Cristina de Matos

1210001413



Ilha Solteira - SP

unesp



CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA, MOLECULAR E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*
gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE
DA MANGUEIRA (*Mangifera indica* L.)

ELAINE CRISTINA DE MATOS

Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Stradioto Papa

1210001413



Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Ilha Solteira - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Agronomia,
Área de concentração: Sistemas de Produção.

Ilha Solteira – São Paulo
Agosto – 2003

Proc. 053/2003-NPD 155

UNESP - "CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA"	
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO	
DATA DE CHEGADA	DATA DE TOMBO
02.09.03	30.09.03
REGISTRADO POR	TOMBO
Ailza	Te. 1413
AQUISIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
Ilha Solteira Anexo R\$ 10,00	M433c

Co
Sys 207886
Sys 55637
50102010



FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação/Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da FEIS/UNESP

Matos, Elaine Cristina de

M433c Caracterização morfológica, patogênica, molecular e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. agente causal da antracnose da mangueira (*Mangifera indica* L.) / Elaine Cristina de Matos. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2003
x, 52 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de concentração: Sistemas de Produção, 2003.

Orientador: Marli de Fátima Stradioto Papa

Bibliografia: p. 38-46

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Fungos-Genética. 3. Fungicidas.

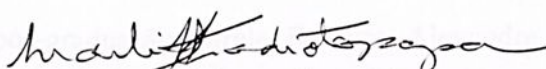
50102010

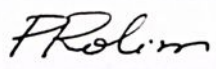
**Caracterização morfológica, patogênica,
molecular e sensibilidade a fungicidas de
isolados de *Colletotrichum
gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.
agente causal da antracnose da mangueira
(*Mangifera indica* L.)**

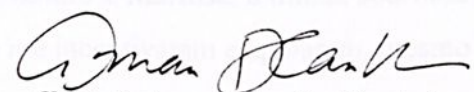
Elaine Cristina de Matos

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DO CÂMPUS
DE ILHA SOLTEIRA – UNESP COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM AGRONOMIA**

COMISSÃO EXAMINADORA:


Profª Drª Marli de Fátima Stradioto Papa (Orientadora)


Drª Palmira Regina Righetto Rolim


Profª Drª Ana Maria Rodrigues Cassiolato

**Ilha Solteira/SP
agosto de 2003**



AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pela constante presença em meu caminho.

À Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização deste curso.

À professora Marli de Fátima Stradioto Papa, pelos ensinamentos e orientação.

À professora Eiko E. Kuramae da Faculdade de Ciências Agrônômicas, FCA, UNESP, Campus de Botucatu e sua orientada Andréia Kazumi Nakatani, pelo auxílio nas análises de Biologia Molecular.

Aos professores Dr. Paulo César Ceresini, Dra. Aparecida Conceição Boliani, Dra. Ana Maria Rogrigues Cassiolato, pela ajuda em algumas etapas do trabalho.

Aos professores Dr. Walter Valério Valeriano Filho, Dr. João Antônio da Costa Andrade, Dr. Pedro César dos Santos e Dr. Salatier Buzetti, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários Vera e José Antônio, pelo auxílio direto no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Mirele, Roberto, Alexandre, Toninho, Digão, Flávia, Sueli, Meire, Ananda, Eliana, Adriana, Dolorice, Anny e a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

E finalmente, agradeço especialmente aos meus pais Manoel e Santina, aos meus irmãos Joselaine, Evandro e Marilisa, à minha sobrinha Eyme, à minha tia Judith, e ao Cláudio Ricardo, que sempre me incentivaram e apoiaram, mesmo nos momentos difíceis.



MATOS, E. C. Caracterização morfológica, patogênica, molecular e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. agente causal da antracnose da mangueira (*Mangifera indica* L.). Ilha Solteira, 2003. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Quinze isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., obtidos de folhas e frutos de mangueira (*Mangifera indica* L.) com sintomas típicos de antracnose, foram utilizados neste trabalho, que teve por objetivo estudar a patogenicidade dos isolados, sua sensibilidade a fungicidas *in vitro* e a variabilidade genética dos mesmos. No teste de patogenicidade constatou-se que 12 isolados foram patogênicos às folhas de mangueira e entre eles ocorreram diferenças na severidade. Foram utilizados 16 fungicidas para avaliar a inibição do crescimento micelial dos isolados de *C. gloeosporioides*, nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo, pelo método de incorporação dos fungicidas ao meio de Batata-Dextrose-Ágar. Oito fungicidas foram utilizados nas avaliações do efeito inibitório sobre a germinação de esporos de seis isolados de *C. gloeosporioides*, nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo. Constatou-se diferença significativa na sensibilidade dos isolados em relação aos fungicidas imibenconazole, fluquinconazole, azoxystrobin, trifloxystrobin, oxiclreto de cobre, mancozeb e folpet. Benomyl, carbendazin, tiofanato metílico, difenoconazole, tebuconazole, procloraz e fenarimol inibiram totalmente o crescimento micelial de todos os isolados, na menor concentração utilizada. Mancozeb foi o único fungicida que inibiu a germinação de esporos para todos os isolados de *C. gloeosporioides* a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em função do comportamento dos isolados aos fungicidas fluquinconazole, azoxystrobin e trifloxystrobin, estes foram separados em dois grupos, o primeiro grupo apresentou 79% ou mais de inibição do crescimento micelial e o segundo, uma percentagem de inibição inferior a este valor. Nos estudos da variabilidade genética usando marcadores moleculares RAPD (Polimorfismo de DNA



Amplificado ao Acaso). Foi possível separar três grupos geneticamente distintos entre os isolados de *Colletotrichum*, por meio da construção do dendograma gerado com base nos coeficientes de similaridade. Não foi possível afirmar, entretanto, que os três grupos são realmente da mesma espécie.

Palavras-chave: Inibição do crescimento micelial, inibição da germinação de esporos, variabilidade, patogenicidade, RAPD.

Key-words: Mycelial growth inhibition, spore germination inhibition, variability, pathogenicity, RAPD.

Matos, E. C. **Morphological, pathogenical, molecular characterization and fungicides sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. isolates causing anthracnosis on mango (*Mangifera indica* L.).** Ilha Solteira, 2003. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Fifteen isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc] obtained from leaf and fruits of mango (*Mangifera indica* L.) with typical symptoms of anthracnosis were utilized in this research for evaluating their pathogenicity, sensitivity to fungicides (in vitro) and genetic variability. The pathogenicity test indicated twelve isolates as pathogenic to mango; difference in virulence was also observed. Sixteen fungicides were used for evaluating the mycelial growth inhibition of *C. gloeosporioides* isolates at 10, 100 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of fungicide concentration using the method of incorporating fungicides into potato dextrose agar medium. Eight fungicides were also utilized for evaluating the inhibitory effect on spores germination of six isolates of *C. gloeosporioides* at 1, 10 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of fungicide concentration. There were significant differences in fungicide sensitivity among isolates for imibenconazole, fluquinconazole, azoxystrobin, trifloxystrobin, oxicloreto de cobre, mancozeb and folpet. Benomyl, carbendazin, methyl tiophanate, difenoconazole, tebuconazole, procloraz and fenarimol totally inhibited the mycelial growth at the lowest concentration. Mancozeb was the only fungicide to inhibited germination of spores of all of *C. gloeosporioides* isolates at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Based on the sensitivity to fluquinconazole, azoxystrobin and trifloxystrobin, the isolates were splitted in two groups: the first one presenting 79% or more of mycelial growth inhibition while for the second group the inhibition was much lower. The studies of genetic variability among *Colletotrichum* isolates were carried out using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. Three genetically distinct groups of *Colletotrichum* isolates were identified basead on the dendogram generated with the similarity coefficients among them. However it was not possible to state clearly that the three groups belonged to the same species.

Key-words: Mycelial growth inhibition, spore germination inhibition, variability, pathogenicity, RAPD.



SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Agente causal e epidemiologia	03
2.2 Sintomas	04
2.3 Controle	05
2.4 Variabilidade de <i>C. gloeosporioides</i> quanto à sensibilidade a fungicidas.....	09
2.5 Caracterização molecular.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Meios de cultura utilizados	14
3.2 Origem e manutenção da cultura	15
3.3 Patogenicidade dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> em folhas de mangueira	16
3.4 Efeito de fungicidas no crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	17
3.5 Efeito de fungicidas na inibição da germinação de conídios de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	18
3.6 Caracterização genética dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	20



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Teste de patogenicidade e características morfológicas dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	22
4.2 Efeito de fungicidas na inibição do crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	24
4.3 Efeito de fungicidas na inibição da germinação de conídios de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	29
4.4 Caracterização genética dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	30
5. DISCUSSÃO GERAL	34
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	38
8. ANEXOS	47



LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01	Designação, procedência e informações da origem de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolado de mangueira, utilizados na experimentação..... 15
02	Relação dos fungicidas utilizados nas avaliações..... 18
03	Concentração de DNA e suas respectivas razões obtidas no aparelho GenQuant. Botucatu, 2002..... 21
04	Diâmetro médio de lesões de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> desenvolvidas em folhas de mangueira cultivar Bourbon, inoculadas na superfície abaxial, sem ferimentos e avaliadas aos 3 e 5 dias após a inoculação. Médias de quatro repetições. Ilha Solteira, 2002..... 23
05	Características morfológicas dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Ilha Solteira, 2002..... 24
06	Valor médio da concentração do ingrediente ativo do fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial (ED_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$) de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>in vitro</i> . Ilha Solteira, 2002..... 25
07	Valor médio da concentração do ingrediente ativo do fungicida capaz de inibir 50% da germinação de conídios (ED_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$) de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Ilha Solteira, 2002..... 29



LISTA DE FIGURAS

Figura

Página

- 01 Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA genômico de 12 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* com o iniciador OPA 18..... 32
- 02 Dendrograma obtido com base nos coeficientes de similaridade entre os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da mangueira..... 32



1. INTRODUÇÃO

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma fruteira tropical de grande importância como planta de exploração doméstica e comercial. Seu cultivo tem difundido-se por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (MANICA, 1981, 99-102). Litz (1994, p.33), relata que o maior produtor do fruto é a Índia, com 70% da produção mundial. O Brasil produziu 96.894 t/ha em 2000 (NEHMI et al., 2003, p.398). A produção brasileira vem crescendo de forma significativa, por meio do incremento de uso de técnicas de manejo da irrigação e indução floral, isto possibilita colheitas durante a maior parte do ano, aumentando o rendimento e contribuindo para a expansão dos mercados interno e externo (CUNHA et al, 1993, 104p.).

As doenças da mangueira têm um importante papel na irregularidade produtiva dos pomares. Além da produtividade, as doenças afetam a qualidade dos frutos. Portanto, produção e qualidade elevadas são obtidas com controle eficiente das principais doenças e associação de métodos de controle para otimizar o manejo da doença (MEDCALF, 1980, p.108-111; CUNHA et al., 1993, 104p.; RIBEIRO, 1997, v.2, p.511-524).

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., é uma das principais doenças da mangueira. Ocorre em todas as áreas produtoras de mangueira do mundo, variando a sua intensidade em função das condições do ambiente e da resistência do cultivar. No Brasil, ela encontra-se amplamente disseminada em todas as regiões produtoras de mangueira (CUNHA et al., 1993, 104p.; RIBEIRO, 1997, v.2, p.511- 524).

Os danos causados pela antracnose são o desfolhamento e a queda de flores e frutos, com a conseqüente diminuição da produtividade da planta. Na fase de maturação e pós-colheita, a qualidade do fruto pode sofrer total depreciação, em virtude do aparecimento de manchas e podridões na superfície. Além de reduzir a produtividade e depreciar os frutos, a antracnose provoca ferimentos ou lesões, tanto nos ramos como nos frutos, que são portas abertas para a infestação de fungos oportunistas e coleobrocas, que podem provocar rapidamente a morte da planta ou da parte desta que foi afetada. Nos pomares de mangueira destinados para o mercado externo, a antracnose requer tratamento pós-colheita, para que os frutos cheguem aos importadores em boas condições de comercialização (CUNHA et al., 1993, 104p.; PLOETZ, 1994, p.35-36; RIBEIRO, 1997, v.2, p.511-524).

C. gloeosporioides é um fungo cosmopolita, com ampla gama de hospedeiros e variabilidade relatada para as características genéticas, morfológicas, fisiológicas, patogênicas e na sensibilidade a fungicidas (SPALDING, 1982, v.66, p.1185-1186; SINGH et al., 1999, v.125, p.566-572; GUTHRIE et al., 1992, v.82, p.832-835).

O uso de técnicas de biologia molecular por meio de marcadores genéticos tem representado um grande avanço nos trabalhos de determinação e estimativa da variabilidade genética de fungos, que serve como explicação de resultados contraditórios dentro de uma mesma espécie de fitopatógeno.

Considerando a importância da cultura da mangueira e da antracnose, a variabilidade que ocorre entre os isolados de *C. gloeosporioides*, e com isso a possibilidade de redução na eficiência do controle químico, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de avaliar a patogenicidade de quinze isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de folhas e frutos de mangueira, sua sensibilidade a fungicidas e a variabilidade genética dos mesmos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente causal e epidemiologia

O agente causal da antracnose, na fase teleomórfica corresponde a *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk., que pertence à subdivisão Ascomycotina, produz peritécios rostrados, subesféricos e agrupados em estroma ou bem separados. O estroma pode ser pouco desenvolvido ou estar ausente. Os ascos são subclavados, medindo 42-60 x 10-12 μm . Os ascósporos são hialinos, unicelulares e curvados, medindo 12-24 x 4-6 μm . A fase imperfeita corresponde a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Melanconiales – Melanconiaceae). Produz acérvulos subepidérmicos, dispostos em círculos. Os conídios, unidos nos acérvulos por uma massa viscosa de coloração rosada, são hialinos, uninucleados, com 12-19 μm de comprimento por 1,0-6,0 μm de largura e arredondados nas extremidades (BAXTER et al., 1985, v.17 p.15-18; PLOETZ, 1994, p.35-36; RIBEIRO, 1997, v.2, p. 511-524). Estes são produzidos pelo fungo sobre as folhas e outros tecidos do hospedeiro, disseminam-se por meio de água de chuva, podendo atingir as partes mais sensíveis, que são as inflorescências e os frutos (PLOETZ, 1994, p.35-36).

Estrada et al. (1993, p.360) estudaram o comportamento *in vitro* de *C. gloeosporioides* e observaram a influência da umidade e da temperatura na germinação de conídios e



desenvolvimento de apressórios. As condições ótimas estavam na faixa de 25°C e 100% de umidade relativa (UR). Em condições de baixa UR ocorreram apenas 25% da produção do apressório e da infecção pela hifa na membrana celulósica, após três dias de incubação.

Longos períodos de chuva coincidindo com crescimento ativo e florescimento, são as condições ideais para a ocorrência de epidemias. O período de umidade necessário à infecção é de 12-18 horas, sendo o desenvolvimento da doença favorecido por chuvas, que ocorrem no fim da tarde, prolongando-se durante toda a noite. Períodos chuvosos e encobertos ou orvalho no período noturno, freqüentes no inverno paulista, são favoráveis à ocorrência da antracnose (RIBEIRO, 1997, v.2, p.511-524). Deste modo, a principal forma de disseminação se dá por meio de respingos de chuva. A severidade da doença está diretamente relacionada com as condições climáticas, sendo que em condições de temperaturas extremas, o fungo é inativado (PLOETZ, 1994, p.35-36).

2.3 Controle

2.2 Sintomas

Nas folhas, os sintomas de antracnose podem ser observados pelo aparecimento de manchas marrons arredondadas ou irregulares, de tamanho variável (1-10 mm de diâmetro). As lesões podem surgir tanto no ápice e nas margens das folhas como no centro do limbo foliar. Sob condições ambientais propícias, elas aumentam de tamanho, chegam a coalescer e podem causar o rompimento do limbo foliar, assumindo a aparência de queimadura. Nas brotações e ramos novos surgem lesões escuras e necróticas, que podem evoluir com o tempo. Em consequência, os ramos secam e escurecem a partir da ponta para a base, causando o seu desfolhamento (CUNHA et al., 1993, 104p.).

Segundo Ribeiro (1997, v.2, p.511-524), na raque e suas ramificações aparecem pequenas manchas de coloração marrom-escura, profundas e secas, alongadas no sentido longitudinal, destruindo grande número de flores. As ráquis e ramificações danificadas quebram com facilidade, causando a queda dos frutos antes da maturação fisiológica.

Os frutos podem ser afetados em qualquer estágio de seu desenvolvimento e quando novos, chegam a cair. Nos frutos maiores, a infecção pode, a princípio, ficar latente, depois desenvolver-se e provocar o apodrecimento durante o processo de amadurecimento. Nos frutos

maduros, os sintomas se apresentam sob a forma de manchas ou lesões escuras, levemente deprimidas, de tamanho variável mas em geral, arredondadas. Com o passar do tempo, as lesões podem coalescer e envolver todo o fruto, às vezes causando rachaduras na casca (CUNHA et al., 1993, 104p.). Embora os sintomas se desenvolvam rapidamente após a infecção, podem permanecer latentes nos frutos por meses, assim, os frutos que parecem sadios na colheita podem desenvolver significantes sintomas de antracnose depois de colhidos. A disseminação do patógeno via fruto a fruto, após a colheita, é incomum (PLOETZ, 1994, p.35-36).

Na Austrália, *C. gloeosporioides* var. *minor* Simmonds, uma variante de *C. gloeosporioides* que produz conídios menores, é relatado como agente causal da antracnose em mangueira (PLOETZ, 1994, p.35-36).

2.3 Controle

As medidas de controle a serem adotadas na cultura da mangueira baseiam-se na associação de métodos cultural, químico e genético. Como medidas culturais são citadas: maior espaçamento, favorecendo a ventilação e insolação de plantas; podas leves abrindo a copa, para penetração dos raios solares; poda de limpeza, reduzindo as fontes de inóculo; instalação dos pomares em regiões mais secas (RIBEIRO, 1997, v.2, p.511-524); e indução de floração, para produção em época desfavorável ao fungo (CUNHA et al., 1993, 104p.).

Segundo Donadio et al. (1982, p.3-12) e Ribeiro (1997, v.2, p. 511-524), os cultivares de mangueira relatados como suscetíveis a antracnose são: Haden, Palmer, Sensation, Zill e Bourbon e com resistência moderada: Keitt, Tommy Atkins e Julie.

De acordo com Cunha et al. (1993, 104p.), o controle da antracnose é variável dependendo das condições climáticas e da intensidade e frequência com que a doença se manifesta. De modo geral, o produtor deve estar atento às condições climáticas do local e adotar um sistema de acompanhamento freqüente no campo, principalmente nos períodos de floração, frutificação e colheita.

O controle químico usado antigamente era baseado exclusivamente nos fungicidas cúpricos, com variáveis graus de sucesso, utilizando a calda bordalesa, óxido cuproso, oxiclreto de cobre e sulfato básico de cobre. Depois vieram as recomendações para o uso dos fungicidas

orgânicos zineb, maneb e captam, em pulverizações semanais durante o florescimento. Estes produtos foram considerados eficientes no controle da antracnose, porém nenhum deles se iguala aos cúpricos nas pulverizações pós-florescimento. Os fungicidas orgânicos possuem algumas vantagens, pois não causam desequilíbrio na população de insetos, como o aumento de cochonilhas, causam menos injúrias às flores abertas e não interferem na atividade dos insetos polinizadores (RIBEIRO, 1997, v.2, p.511-524). São compostos que devem ser utilizados preventivamente no controle da doença. No metabolismo do fungo, interferem na produção de energia, podendo ser considerados como inibidores não específicos ou de ação múltipla (BRAGA, 1993, p.349-367).

Ribeiro (1997, v.2, p.511-524) recomenda que, em pomares com histórico de ataque intenso, as pulverizações sejam iniciadas logo após o intumescimento das gemas florais, e nos demais casos, antes da abertura das flores, quando as panículas florais tiverem poucos centímetros de comprimento. As pulverizações devem prosseguir até que os frutinhas estejam formados. Nos pomares cujos frutos destinam-se à exportação, recomenda fazer duas pulverizações com benomyl a 0,03% ou procloraz a 0,045%, iniciadas 15 dias antes e nas vésperas do início da colheita. Frutos destinados à exportação e provenientes de pomares com grande infestação, devem passar por um tratamento pós-colheita, que consiste na imersão dos frutos em uma solução fungicida a 55°C, durante 5 minutos. Os fungicidas podem ser benomyl a 0,2% ou procloraz a 0,045%, acrescentando-se na solução um espalhante adesivo ou detergente a 0,1%. Em variedades sensíveis ao tratamento térmico, faz-se um banho fungicida com procloraz a 0,045% acrescido de um espalhante adesivo em água em temperatura ambiente, por dois minutos.

Os fungicidas pertencentes ao grupo dos benzimidazóis (benomyl, carbendazim, tiabendazole e tiofanato metílico) têm como modo de ação a inibição da síntese da beta-tubulina, reduzindo assim a formação dos microtúbulos e prejudicando as divisões celulares, essencial ao crescimento micelial e produção de esporos (Hassal, citado por FORCELLINI et al., 2001, p.339-381).

Balardin & Rodrigues (1995, v.20 p.494-497) estudaram a sensibilidade *in vitro* de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav. a fungicidas sistêmicos e protetores, observando uma maior inibição do crescimento micelial pelos fungicidas de ação

Para o controle da antracnose em seringueira, causada por *C. gloeosporioides*, Rolim (1991, 57p.) destaca os fungicidas procloraz, propiconazole e tebuconazole como os mais eficientes em testes *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos por Kimura (1999, 131p.) em estudos realizados com o fungo *Botrytis cinerea* (Pers. Fr.) que demonstrou alta sensibilidade ao tebuconazole, propiconazole e imibenconazole, com ED_{50} calculado menor que $1\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o mancozeb e o tiofanato metílico constatou inibição do crescimento dos isolados a $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de i.a., e o benomyl se colocou entre os menos eficientes. Azoxystrobin, folpet, dithianon, quintozene, mesmo em altas concentrações não foram capazes de inibir o fungo comportando-se como ineficientes.

Rava et al. (1998, v.24, p.45-48) conduziram experimentos *in vitro* e *in vivo* para determinar a eficiência dos fungicidas benomyl, fluazinam, chlorotalonil e mancozeb em seis concentrações, no controle de *C. lindemuthianum*. No experimento *in vitro*, o fungicida fluazinam apresentou a maior diminuição do crescimento micelial, seguido pelo benomyl. No que se refere à inibição de germinação de conídios, o chlorotalonil foi o mais eficiente; por outro lado, *in vivo* foi o benomyl, diferindo significativamente do mancozeb que, por sua vez, diferiu significativamente dos fungicidas fluazinam e chlorotalonil, que não apresentaram controle.

Singh et al. (1999, v.125, p.566-572) utilizaram em testes *in vitro*, nove fungicidas, para o controle de *Colletotrichum graminicola* [(Cesati) G.W. Wilson] e todos eles foram efetivos em inibir o crescimento micelial do patógeno, porém carbendazim e tiofanato metílico foram altamente tóxicos em todas as seis concentrações. Na avaliação da germinação de esporos, os fungicidas que proporcionaram maior percentagem de inibição foram carbendazim e tiofanato metílico com 95% de inibição a $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em experimentos conduzidos por Lima et al. (1975, v.1, p.62-66), avaliando a ação tóxica de fungicidas sobre *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose do cajueiro, os autores observaram que de modo geral, os fungicidas benzimidazóis e triazóis proporcionaram inibição do crescimento micelial, diferindo estatisticamente da testemunha. Os fungicidas cúpricos e o mancozeb não foram estatisticamente diferentes da testemunha a $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo Paredes & Muñoz (2002, v.21, p.11-15), o uso de fungicidas, como o benomyl, para controle da antracnose do morangueiro, na maioria dos casos leva à resistência do patógeno, mas sua mistura com propiconazole, pode reduzir a ocorrência de resistência ao patógeno. Em testes *in vitro*, este



último fungicida proporcionou alta inibição do crescimento micelial, na menor concentração, enquanto que o benomyl foi ineficiente.

Smith & Black (1993, v.348, p.509-512) testaram 28 fungicidas no controle de *Colletotrichum fragariae* (Brooks) e todos os fungicidas testados reduziram significativamente o crescimento micelial na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os melhores resultados foram obtidos pelos fungicidas sistêmicos, particularmente os inibidores da biosíntese do ergosterol, que reduziram o crescimento micelial de *C. fragariae* em comparação aos fungicidas convencionais testados.

Lim & Wai (1986, v.11, p.67-74) estudaram o efeito de fungicidas sobre *C. gloeosporioides* da mangueira em testes *in vitro* e verificaram que entre os seis fungicidas utilizados nos testes, o mais eficiente foi o captafol com valores de ED_{50} de 1 e $1,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ para crescimento micelial e germinação de esporos, respectivamente, e o menos fungitóxico foi o mancozeb com valores de ED_{50} superiores a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para crescimento micelial e superior a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para germinação de esporos.

Forcellini (1994, v.2, p.335-355) cita que os fungicidas triazóis constituíam um dos mais modernos e importantes grupos de fungicidas em uso naquela época. Essa importância foi atribuída a características especiais, como: elevada ação inibitória sobre a formação de componentes da membrana celular; rápida absorção e translocação pela planta; eficiência em doses pequenas; ação curativa; efeito residual prolongado; amplo espectro de ação; flexibilidade para uso em tratamento de sementes e da parte aérea e via sistema radicular; e moderado risco de resistência. Mas se o produto for utilizado de forma inadequada, poderia levar ao surgimento de mutantes resistentes, afetando por reação cruzada, todos os compostos deste grupo e expondo inúmeras culturas a epidemias.

Segundo Koller & Scheinpflug (1987, v.71, p.1066-1074), o fenarimol é um fungicida que ao ser absorvido pelas folhas, inibe a biossíntese de ergosterol e impede o desenvolvimento do fungo. Esse fungicida possui ação preventiva, impedindo a germinação dos conídios, e também possui ação curativa, impedindo a esporulação e evitando assim, a disseminação da doença. Desse modo, as aplicações do produto devem ser realizadas no início do aparecimento dos primeiros sintomas (PICININI, 1994, v.2, p.357-407).

Os fungicidas do grupo das estrobilurinas atuam por meio da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre citocromo b e o citocromo c_1

(complexo III), sendo que esta inibição interfere na formação de ATP (VENÂNCIO et al., 1999, v.7, p.103-155; GULLINO et al., 2000, v.19, p.1-11).

Atualmente, os produtos registrados para o controle da antracnose na cultura da mangueira são o oxicleto de cobre, o hidróxido de cobre, o óxido cuproso, o tebuconazole, o mancozeb, o tetraconazole e o procloraz (WIN FIT 2000, 2001).

2.4 Variabilidade de *C. gloeosporioides* quanto à sensibilidade a fungicidas

O uso dos fungicidas sistêmicos para o controle de doenças de plantas apresentam várias vantagens (PRIOR et al., 1992, p.326-336; ROLIM, 1991, 57p.; DAVIS, 1999, v. 112, p. 197-200; NASCIMENTO et al., 2000, v. 26, p. 379-382). Entretanto, por estes fungicidas possuírem alto grau de especificidade bioquímica, e freqüentemente inibirem um ou dois sítios metabólicos, modificações em um gene do fungo é freqüente e suficiente para induzir mudanças no sítio de ação, podendo desenvolver um isolado resistente (DEKKER, 1976, v.14, p.405-428). Os primeiros casos de resistência ocorreram após a introdução do benomyl, lançado em 1969. Com o uso de outros fungicidas sistêmicos dos grupos químicos: fenilamidas, dicarboximidas e inibidores da síntese de esterol (triazóis, imidazóis, pirimidinas), casos de resistência de fungos a fungicidas foram registrados em várias culturas (Eckert citado por KIMURA, 1999, 131p.), a partir de 1980.

Spalding (1982, v.66, p.1185-1186) estudando a sensibilidade de isolados de *C. gloeosporioides* da mangueira a fungicidas, constatou para o tiofanato metílico e thiabendazole, 80 e 56% respectivamente, de isolados resistentes.

Astua et al. (1994, v.18, p.35-39) compararam dois isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de plantios comerciais de mamoeiros com uso intensivo de benomyl, com outros dois isolados obtidos de plantios sem controle químico. Dos resultados obtidos constataram redução na sensibilidade a thiabendazole para os isolados provenientes de plantios comerciais, comparando-se com os isolados de plantios sem controle químico, que foram sensíveis ao fungicida. Rolim (1991, 57p.) observou variação entre três isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de seringueira, quanto à sensibilidade a tiofanato metílico, benomyl, diniconazole, penconazole e triflumizol. Para um dos isolados, entre os três utilizados, constatou-se maior

sensibilidade aos benzimidazóis e menor aos triazóis. Para outro isolado constatou-se comportamento inverso para os mesmos fungicidas.

Adaskaveg & Hartin (1997, v.87, p.979-987) compararam isolados de *C. gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* (Simmons) e concluíram que todos os isolados de *C. gloeosporioides* testados foram sensíveis ao benomyl, nas concentrações de 300, 600 e 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo, enquanto que os isolados de *C. acutatum* foram pouco sensíveis. Goes & Kimati (1998, v.24, p.246-253) verificaram que isolados de *C. gloeosporioides* mostraram-se mais sensíveis ao benomyl, inibindo o crescimento micelial a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo, do que isolados de *C. acutatum*, que foram insensíveis ao produto até na dosagem de 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo. Também avaliaram isolados de *C. acutatum* coletados de pomares com históricos diferentes quanto à regularidade de uso desse fungicida, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os isolados, nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esse fato indica que não se trata de “resistência” e sim de insensibilidade ao fungicida.

Estudando o efeito de doses crescentes de benomyl na esporulação de isolados de *C. gloeosporioides*, Goes (1995, 143p.) concluiu que houve um incremento significativo na esporulação dos isolados, mediante o seu cultivo em BDA acrescido de benomyl na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.5. Caracterização molecular

A caracterização de fungos consiste na determinação da variabilidade genética interespecífica, assim como na identificação, ao nível de população, isolado ou linhagem. A caracterização de fungos tem vários objetivos como a elucidação das relações filogenéticas das populações e a identificação de linhagens por razões práticas, tais como: epidemiologia, monitoramento de patógenos, registros e patenteamento de linhagens modificadas geneticamente e a autenticação de acessos em coleções fúngicas (WILLIAMS et al., 1989, v.218, p.704-740).

O uso de técnicas de biologia molecular por meio de marcadores genéticos tem representado grande avanço nos trabalhos de determinação e estimativa de variabilidade genética, criando novas oportunidades de diagnóstico na fitopatologia e, se exploradas eficientemente,

deverão aumentar os métodos de controle de doença. A estratégia para o uso de marcadores requer o conhecimento básico sobre a natureza genética do caráter estudado, se qualitativo ou quantitativo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995, 220p.).

As diversas técnicas de biologia molecular atualmente disponíveis para a detecção da variabilidade genética em nível de DNA permitem o estudo amplo do genoma do organismo por meio de marcadores moleculares. Estes podem ser definidos como fenótipos de genes expressos ou segmentos específicos de DNA (GUTHRIE et al, 1992, v.82, p.832-835).

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase) é uma técnica rápida e versátil, que permite estudos de grande número de indivíduos e passou a ser amplamente utilizada. Esta técnica baseia-se na geração de grandes quantidades de DNA de segmentos específicos, na presença da enzima DNA polimerase. Cada ciclo da PCR compreende três etapas na sequência: *Desnaturação* da fita molde, *Pareamento* do oligonucleotídeo (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primer*) e *Alongação* da fita complementar, a partir dos *primers* pareados pela *taq* polimerase. Pelo fato de as fitas complementares sintetizadas em um ciclo servirem como molde para o próximo ciclo, o número de cópias da região-alvo aproximadamente dobra a cada ciclo de amplificação. No final do processo tem-se grande quantidade de DNA de uma sequência específica de interesse, podendo assim ser facilmente detectado a olho nu, diretamente em gel de eletroforese por meio de corantes específicos para DNA, como brometo de etídio (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995, 220p.).

Dentre as técnicas baseadas em marcadores moleculares destacam-se o RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) e o RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso). O RAPD representou um avanço na área de biologia molecular envolvendo marcadores, pois diferentemente da técnica de PCR, não depende do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos do DNA em estudo, o que constitui limitação para a obtenção de grande número de marcadores moleculares. O RAPD nada mais é do que uma variação do PCR com duas características distintas para dirigir a reação de amplificação, a utilização de um único *primer* e o uso de *primers* de sequências arbitrárias, cuja sequência alvo de DNA é desconhecida. Isso fez com que a análise genética de espécies antes não contempladas passasse a ser possível (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995, 220p.).

A principal vantagem da técnica de RAPD é o poder de detecção de polimorfismo para o estudo da variabilidade genética, não requerendo o desenvolvimento de um conjunto amplo de



primers ou marcadores específicos para o estudo de um dado organismo. Um conjunto único de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Uma outra vantagem é a quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo (TINGEY & DELTUFO, 1993, v.101, p.349-352).

A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informações por *loco* (banda presente ou ausente), pois apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto as demais variações alélicas são classificadas como nulas. Outro aspecto que constitui uma desvantagem da técnica é o desconhecimento prévio da base genética das bandas de RAPD, pois a banda observada no gel só pode ser considerada marcador de comportamento mendeliano depois de verificada sua segregação de parentais para os descendentes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995, 220p.).

Estudos realizados por Peres (2002, v.150, p.128-134), sobre a caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* spp. afetando frutos pós-colheita no Brasil, usando *primers* específicos para *C. acutatum*, amplificou fragmentos de DNA de isolados de morango e goiaba, que de acordo com a região ITS de rDNA corresponderam a *C. acutatum*, enquanto que isolados de abacate, banana, mamão e manga correspondem a *C. gloeosporioides*. Isolados de morango e goiaba foram moderadamente sensíveis ao benomyl, isolados de abacate, banana e manga foram sensíveis ao produto e isolados de mamão foram insensíveis.

Igarashi (1984, 57p.) realizou trabalhos com *Colletotrichum* spp. e avaliou a sensibilidade a fungicidas, a caracterização morfológica, patogênica e serológica, concluindo que isolados resistentes ao benomyl são morfológica, patogênica e serologicamente distintos dos isolados sensíveis. Resultados semelhantes foram obtidos por Kuramae-Izioka et al. (1997, v.103, p.323-329) que demonstrou o potencial da técnica de RAPD para a caracterização molecular de *Colletotrichum* spp. Com esta técnica separaram-se os isolados em dois grupos. No grupo I, provavelmente de *C. acutatum*, foram colocados isolados sensíveis ao benomyl e no grupo II, foram colocados os isolados que se comportaram como resistentes ao fungicida, que os autores consideraram tratar-se de *C. gloeosporioides*.

Resultados de diversos trabalhos evidenciam a possibilidade do uso de RAPD para a classificação de patótipos de fungos, em que bandas específicas de DNA podem ser relacionadas com os genes de virulência já identificados (VILARINHOS et al., 1995, v.20, p.194-197). A



técnica também foi usada para diferenciar isolados agressivos dos não agressivos em *Phoma lingam* (SCHAFFER & WOSTMEYER, 1992, v.136, p.124-136).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no período de maio de 2001 a dezembro de 2002, no Laboratório de Micopatologia e Fisiologia da Resistência de Plantas, FE de Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Campus de Ilha Solteira, SP e no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP, Campus de Botucatu, SP.

3.1 Mídias de cultura utilizadas

Para o isolamento de *P. lingam* foram utilizadas inicialmente a meio Agar-Agar (AA) composto por 1% g de agar e 1000 ml de água destilada. Em seguida os isolados foram cultivados no meio de Biala Oxalato-Agar (BOA) que foi preparado na proporção de 20g, 30 e 10 g de biala, óxido de cobre e água, respectivamente e água destilada para completar 1000 ml. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120°C, 1 atm por 15 minutos durante 20 minutos.

3.2 Origem e manutenção da cultura

Um isolado de *C. gloeosporioides* foram obtidos por meio de isolamento direto de folhas e frutos de mangueira doente, os quais foram mantidos em lâmpada fria por 24 h, até ser constatada presença de esporos na superfície da lesão. Mediante observação ao microscópio estereoscópico, pequena massa de esporos foi transferida, com o auxílio de alfinete, para placas de Petri contendo meio AA ou BDA (TUTTE, 1959, 249p). Após três dias, quando se observou o crescimento das colônias e a formação de esporos, transferiram-se discos de

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no período de junho de 2001 a dezembro de 2002, no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Faculdade de Engenharia, FE, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Ilha Solteira, SP e no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agronômicas, FCA, UNESP, Campus de Botucatu, SP.

3.1 Meios de cultura utilizados

Para o isolamento de *C. gloeosporioides*, utilizou-se inicialmente o meio Ágar-Água (AA), composto por 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. Em seguida os isolados foram cultivados no meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), que foi preparado na proporção de 200, 20 e 15 g, de batata, dextrose e ágar, respectivamente e água destilada para completar 1000 mL. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

3.2 Origem e manutenção da cultura

Os isolados de *C. gloeosporioides* foram obtidos por meio de isolamento direto de folhas ou frutos de mangueira doente, os quais foram mantidos em câmara úmida por 24 h, até ser constatada presença de acérvulos na superfície da lesão. Mediante observação ao microscópio estereoscópico, pequena massa de conídios foi transferida, com o auxílio de estilete, para placas de Petri contendo meio AA ou BDA, (TUIITE, 1969, 239p.). Após três dias, quando se observou o crescimento das colônias dos isolados, transferiram-se discos de BDA com o fungo para placas de Petri contendo BDA. Posteriormente, das colônias desenvolvidas realizou-se a preservação dos isolados, retirando-se das bordas das colônias fúngicas discos com cinco milímetros de diâmetro, que foram colocados em tubos de ensaio contendo solução salina, a 0,85%, previamente autoclavados. Em cada tubo de ensaio colocaram-se cinco discos. Os tubos de ensaios contendo a solução salina e os discos foram vedados com algodão e envolvidos por filme plástico, identificados e mantidos à temperatura de 6°C.

Os isolados obtidos por meio do isolamento, estão descritos no Tabela 1.

Tabela 1- Designação, procedência e informações da origem de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de mangueira, utilizados na experimentação.

Isolado	Procedência	Material	Tipo de cultivo da planta	Cultivar
I 1	Selvíria, MS	Folha	Caseiro	Haden
I 2	Jales, SP	Folha	Comercial	Tomy Atkins
I 3	Tupã, SP	Folha	Caseiro	Coquinho
I 4	Três Lagoas, MS	Folha	Caseiro	Espada
I 5	Jales, SP	Folha	Caseiro	Coquinho
I 6	Marília, SP	Folha	Comercial	Espada
I 7	Selvíria, MS	Folha	Comercial	Haden
I 8	Mirandópolis, SP	Folha	Comercial	Extrema
I 9	Pereira Barreto, SP	Folha	Caseiro	Extrema
I 10	São Carlos, SP	Folha	Comercial	Espada
I 11	Ilha Solteira, SP	Folha	Caseiro	Bourbon
I 12	Junqueirópolis, SP	Folha	Caseiro	Haden
I 13	Três Lagoas, MS	Folha	Caseiro	Espada
I 14	Mossoró, RN	Fruto	Comercial	Desconhecida
I 15	Andradina, SP	Folha	Comercial	Haden

3.3 Patogenicidade dos isolados de *C. gloeosporioides* em folhas de mangueira

Foram utilizadas folhas jovens de mangueira do cultivar Bourbon, coletadas em plantas cultivadas no Pomar da FE, UNESP, Ilha Solteira, SP.

No laboratório, as folhas foram lavadas em água esterilizada e seus pecíolos envolvidos em algodão umedecido em água esterilizada. As folhas preparadas foram colocadas em placas de Petri, as quais continham em seu fundo dois discos de papel de filtro, umedecidos em água e um disco de tela, acondicionando-se duas folhas de mangueira por placa de Petri.

O preparo do inóculo realizou-se a partir da repicagem das culturas dos isolados, mantidas em solução salina, que foram repicadas para placas de Petri com BDA suplementado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina. As culturas permaneceram em estufa incubadora à temperatura de 25°C , por cinco dias, em ausência de luz. Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias fúngicas e usados para a inoculação.

A inoculação foi realizada na superfície abaxial da folha, sem ferimentos, em dois locais: um no terço basal e outro no terço médio do limbo. As placas de Petri, contendo as folhas de mangueira inoculadas, foram mantidas em estufa incubadora à temperatura de 25°C , por 48 h e em seguida foram para uma prateleira, em condições de laboratório.

Na avaliação, mediu-se o maior e o menor diâmetro das lesões, aos três e cinco dias após a inoculação, descontando-se os cinco milímetros, referentes ao diâmetro do disco de inóculo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de 15 isolados de *C. gloeosporioides* (Tabela 1) mais a testemunha, com quatro repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri, contendo duas folhas de mangueira.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada considerando o desenvolvimento ou não de lesão. A severidade foi determinada em função do diâmetro médio da lesão desenvolvida. Os isolados considerados não patogênicos foram descartados.



3.4 Efeito de fungicidas no crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides*

Para avaliar a inibição do crescimento micelial utilizaram-se os isolados de *C. gloeosporioides* relacionados na Tabela 1, exceto os isolados 5, 6 e 9, os quais não foram patogênicos, segundo avaliação do item 3.3.

Os fungicidas utilizados encontram-se na Tabela 2, e foram avaliados nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo. Foram preparadas soluções-estoque dos fungicidas e realizadas diluições em série de modo que, ao se adicionar 1 mL da solução-estoque a 100 mL de BDA autoclavado e fundente, fosse obtida a concentração desejada do ingrediente ativo.

Em seguida o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e deixado solidificar. Um disco de 5 mm de diâmetro obtido dos bordos da colônia foi transferido para o centro das placas de Petri contendo o meio de BDA com fungicida, e procedeu-se a incubação. Como testemunha, utilizou-se o meio BDA sem fungicida. O procedimento para a obtenção do disco do meio mais o fungo foi o mesmo descrito no item 3.3.

O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados com os tratamentos arranjos em esquema fatorial (12 x 3), sendo doze isolados e três concentrações do produto, com 4 repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri.

Após o período de incubação, de cinco dias a 25°C, avaliou-se o diâmetro do crescimento micelial da colônia, medindo-se em dois sentidos perpendiculares, usando uma régua graduada em milímetro (mm). Os dados dos tratamentos com fungicidas foram comparados com a testemunha, calculando-se o Percentual de Inibição do Crescimento micelial (P.I.C.), por meio da fórmula (PIC).

$$\text{P.I.C.} = \frac{\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}}{\text{diâmetro da testemunha}} \times 100$$



Tabela 2-Relação dos fungicidas utilizados nas avaliações.

Ingrediente ativo (i.a.)	Nome comercial	Formulação	Grupo químico
Azoxystrobin	Amistar	Granulo Dispersivo (WG)	Estrobilurina
Trifloxystrobin	Flint	Granulo Dispersivo (WG)	Estrobilurina
Benomyl	Benlate	Pó Molhável (PM)	Benzimidazol
Carbendazim	Derosal	Suspensão Concentrada (SC)	Benzimidazol
Tiofanto metílico	Cercobim	Pó Molhável (PM)	Benzimidazol
Fenarimol	Rubigan	Concentrado Emulsionável (CE)	Pirimidina
Difenoconazole	Score	Concentrado Emulsionável (CE)	Triazol
Fluquinconazole	Flamenco	Suspensão Concentrada (SC)	Triazol
Fluquinconazole	Palisade	Pó Molhável (PM)	Triazol
Imibenconazole	Manage	Pó Molhável (PM)	Triazol
Tebuconazole	Folicur	Concentrado Emulsionável (CE)	Triazol
Triadimenol	Bayfidan	Concentrado Emulsionável (CE)	Triazol
Folpet	Folpan	Pó Molhável (PM)	Ftalimida
Mancozeb	Dithane	Pó Molhável (PM)	Ditiocarbamato
Procloraz	Sportak	Concentrado Emulsionável (CE)	Imidazole
Oxicleto de cobre	Recop	Pó Molhável (PM)	Cúprico

O experimento foi repetido duas vezes, utilizando-se o valor médio do P.I.C. para a análise estatística. Devido a natureza quantitativa dos níveis dos tratamentos (doses crescentes de fungicida), os graus de liberdade do efeito principal de isolados foram desdobrados para o estudo dos efeitos linear e quadrático. Os valores do crescimento micelial foram considerados variáveis dependente, enquanto as doses de fungicida foram a variável independente. Calcularam-se também os valores da concentração capazes de inibir 50% do crescimento micelial (ED_{50}).

3.5 Efeito de fungicidas na inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides*

Dentre os doze isolados de *C. gloeosporioides* patogênicos (Tabela 1), foram selecionados aleatoriamente os isolados 1, 2, 3, 4, 11 e 15 para a realização deste ensaio.

Uma pequena porção do material preservado foi transferida para placas de Petri contendo BDA, e incubada a 25°C, com fotoperíodo de 12 h/12 h de claro/escuro, durante

sete dias. Preparou-se então uma suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* e sua concentração foi ajustada, com o auxílio de hemacitômetro a 2×10^5 conídios mL^{-1} .

Foram escolhidos ao acaso os fungicidas: azoxystrobin, tiofanato metílico, triadimenol, fluquinconazole (PM), imibenconazole, mancozeb, procloraz e oxicloreto de cobre (Tabela 2). Estes fungicidas foram preparados nas concentrações de 2, 20 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo, de modo que, ao adicionar-se 1 mL da suspensão de conídios em 1 mL da suspensão do fungicida, fossem obtidas as concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ingrediente ativo dos fungicidas, e uma suspensão de conídios de $1,0 \times 10^5$ conídios mL^{-1} . Como testemunha acrescentou-se 1 mL de água em 1 mL da suspensão de conídios.

Duas gotas da suspensão de conídios mais fungicida, foram depositadas em lâmina de vidro, que foi acondicionada em uma placa de Petri, contendo em seu interior papel de filtro previamente umedecido com água destilada, e mantida a 25°C , por doze horas.

Após o período de incubação, adicionou-se uma gota de lactofenol em cada gota da suspensão, com a finalidade de paralisar a germinação dos esporos. Realizou-se em seguida, com o auxílio de microscópio óptico, a contagem de 100 conídios em cada gota, separando-os em germinados e não germinados. Como conídio germinado considerou-se o conídio que apresentava tubo germinativo maior ou igual à sua largura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjados em um esquema fatorial (6×3) sendo 6 isolados e 3 concentrações do fungicida, com 6 repetições por tratamento. Cada gota foi considerada uma repetição.

Os dados dos tratamentos com fungicidas foram comparados com a testemunha, calculando-se o Percentual de Inibição da Germinação de conídios (P.I.G.), semelhante ao descrito no item anterior.

O experimento foi repetido duas vezes, utilizando-se o valor médio do P.I.G. para a análise estatística, que foi semelhante à utilizada na avaliação do efeito de fungicidas no crescimento micelial.

3.6 Caracterização genética dos isolados de *C. gloeosporioides* por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Para a extração do DNA, foram utilizados os isolados de *C. gloeosporioides* como descrito no item 3.3. Os micélios desenvolvidos foram transferidos com o auxílio de uma pinça estéril, para tubos tipo 'Eppendorf' com capacidade de 2,0 mL. Logo após, os micélios foram triturados com nitrogênio líquido e os pós obtidos foram transferidos para tubos de 1,5 mL, onde se adicionou 700 μL de tampão de extração [100 mM Tris (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 500 mM NaCl, 1% dodecil sulfato de sódio]. O homogeneizado foi incubado a 65°C durante 30 minutos em banho-maria. Em seguida, 500 μL de acetato de potássio 5 M foram adicionados às amostras, estas foram agitadas e colocadas em banho de gelo por 20 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 RPM (rotação por minuto) e o sobrenadante aquoso foi removido para novos tubos, onde adicionou-se um volume de isopropanol para precipitar o DNA. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 14.000 RPM e os *pellets* obtidos foram lavados com 1 mL de etanol 70% e, posteriormente, secos a vácuo (*Speed Vac*). O DNA foi dissolvido em 1/10 TE (10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA) e tratado com 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RNase a 37°C, durante 10 horas.

A quantificação do DNA foi feita no espectrofotômetro GenQuant (Pharmacia), onde leu-se a razão de $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$, a qual estava entre 1,40 e 1,81 indicando que estes estavam livres de proteínas e carboidratos (Tabela 3).

Utilizaram-se 13 *primers* decaméricos de sequência arbitrária (OPG2, OPG5, OPG6, OPG7, OPG9, OPG13, OPG18, OPP6, OPP7, OPP8, OPP15, OPP20 e OPA18). Realizou-se a seguinte reação de RAPD de 20 μL para cada *primer*: 2,0 μL de tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, 2,5 μL de KCl 50 mM); 0,6 μL de (MgCl_2 15 mM); 6,15 μL de *primer* (10 ng μL^{-1}); dNTPs (10 μL de cada NTP em 360 μL de água milleQ); 5 μL de DNA genômico (5 ng μL^{-1}); 0,3 μL de (*Taq*-DNA polimerase) e 4,35 de água milleQ. Para a amplificação do DNA, a máquina de PCR foi programada para 39 ciclos e cada ciclo consistiu da desnaturação do DNA molde a 94°C por 15 segundos, pareamento do primer a 35°C por 30 segundos, seguido de extensão a 72°C por 60 segundos. Completada a amplificação, as amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5

% em Tampão 1x TBE (Tris-borato 0,09 M e EDTA 2 mM), colocando-se 20 μ L de cada amostra por orifício do gel, procedendo-se a corrida a 110 V por três horas. Como padrão dos fragmentos de DNA foi utilizado o marcador 1Kb *ladder*. A coloração do gel foi feita com o emprego de brometo de etídio e, após a separação eletroforética do mesmo, foi fotografado em transluminador UV e gravados pelo sistema de fotodocumentação Eagle Eye (Stratagene).

Tabela 3. Concentração de DNA e suas respectivas razões obtidas no aparelho GenQuant. Botucatu, 2002.

Isolado	Concentração de DNA	Razão
I1	2,9	1,52
I2	2,8	1,56
I3	11,6	1,70
I4	1,6	1,40
I7	3,2	1,48
I8	6,9	1,81
I10	1,7	1,46
I11	2,2	1,63
I12	1,9	1,53
I13	2,6	1,56
I14	5,0	1,65
I15	6,3	1,55

Os padrões de bandas obtidas dos diferentes *primers* foram analisados selecionando-se as bandas mais polimórficas. A avaliação dos padrões das bandas foi feita por meio de notas em que 1 significava a presença de banda e 0, a ausência. As análises de agrupamento foram feitas com base em distâncias genéticas calculadas pelo método euclidiano para dados binários, com auxílio do programa UPGMA.

Tabela 4 – Diâmetro médio de lesões de *Gloeosporium gloeosporioides* desenvolvidas em folhas de manga-da-cruzeira cultivar Bourbon, inoculadas na superfície abaxial, com fungos isolados e produzidos aos 3 e 5 dias após a inoculação. Médias de quatro repetições (Iguaçu, 2002).

Isolado	3 Dias (mm)	5 Dias (mm)
1	7,8 ab	10,1 ab
2	7,8 ab	10,2 a
3	6,7 ab	12,7 abc
4	3,9 ac	1,8 abc
5	7,9 ab	11,3 abc
6	7,8 ab	12,3 ab
7	7,8 ab	11,7 bc
8	7,8 ab	11,1 bc
9	7,8 ab	9,5 c
10	10,4 a	10,7 a
11	10,4 a	10,7 a
12	10,4 a	14,9 abc
13	10,4 a	10,7 a
14	10,4 a	10,7 a

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de patogenicidade e características morfológicas dos isolados de *C. gloeosporioides*

Os sintomas observados foram semelhantes àqueles produzidos em condições naturais, ocorrendo lesões necróticas com posterior decomposição do tecido e formação de acérvulos.

Os resultados do teste de patogenicidade realizado com os 15 isolados de *C. gloeosporioides*, em folhas destacadas de mangueira variedade Bourbon, estão apresentados na Tabela 4. Como isolado patogênico considerou-se o isolado que desenvolveu lesões nas folhas inoculadas até cinco dias após a inoculação. Verificou-se que, dos isolados testados, doze foram patogênicos e os três não patogênicos à mangueira, não foram utilizados nas avaliações seguintes. Entre os isolados patogênicos, os isolados 2 e 13 foram estatisticamente diferentes dos isolados 10, 11, 12 e 14, com diâmetro médio da lesão de antracnose de 16 mm para os isolados mais virulentos, enquanto que os menos virulentos apresentaram diâmetro médio da lesão de 10 mm. A variabilidade na patogenicidade e na virulência entre isolados de *C. gloeosporioides* tem sido relatada por diversos autores (WASTIE & SANKAR, 1970, v.54, p.117-121; STRADIOTO, 1993, 64p.; DAVIS, 1999, v.112, p.197-200; CHAKRABORTY et al., 2002, v.92, p.553-562).

Tabela 4 – Diâmetro médio de lesões de *Colletotrichum gloeosporioides* desenvolvidas em folhas de mangueira cultivar Bourbon, inoculadas na superfície abaxial, sem ferimentos e avaliadas aos 3 e 5 dias após a inoculação. Médias de quatro repetições. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	3 Dias (mm)	5 Dias (mm)
1	7,8 ab	15,1 ab
2	7,8 ab	16,2 a
3	6,7 abc	12,7 abc
4	5,9 bc	12,8 abc
7	7,6 ab	11,3 abc
8	7,8 ab	15,1 ab
10	5,8 bc	10,7 bc
11	4,8 bc	11,1 bc
12	4,5 c	9,5 c
13	9,4 a	16,1 a
14	6,7 abc	9,4 c
15	7,2 abc	14,0 abc
CV (%)	14,8	15,4
DMS	2,5	4,9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Os isolados 4, 7, 10, 11 e 14 apresentaram características morfológicas semelhantes, como o crescimento aéreo, a esporulação no meio de cultura visível, a coloração do micélio cinza e o diâmetro de colônia superior a 70 mm (Tabela 5). Os isolados 1, 2, 3, 8, 12, 13 e 15 apresentaram diâmetros da colônia menores que 70 mm, evidenciando um crescimento micelial mais lento em comparação com os demais isolados. As outras características observadas variaram entre os isolados. Não houve relação entre as características morfológicas e a procedência de coleta do material a ser isolado, bem como entre o cultivar, o tipo de plantio e o material utilizado para o isolamento de *C. gloeosporioides*. Vários autores relatam a possibilidade de separação de gêneros de fitopatógenos por meio de características morfológicas (THIND & JHOOTY, 1990, v.43, p.53-58; BERNSTEIN et al., 1995, v.79, p.478-482).

Tabela 5 – Características morfológicas dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	*Tipo de crescimento	Esporulação visível	Coloração da colônia	Diâmetro da colônia (mm)**
I 1	Aéreo	Não	Branca	60,0
I 2	Rasteiro	Não	Branca	58,5
I 3	Rasteiro	Não	Cinza claro	60,0
I 4	Aéreo	Sim	Cinza escuro	70,0
I 7	Aéreo	Sim	Cinza escuro	74,0
I 8	Rasteiro	Não	Branca alaranjada	64,0
I 10	Aéreo	Sim	Cinza escuro	72,5
I 11	Aéreo	Sim	Cinza escuro	70,0
I 12	Rasteiro	Sim	Branca alaranjada	50,0
I 13	Rasteiro	Não	Cinza claro	50,0
I 14	Aéreo	Sim	Cinza escuro	74,0
I 15	Aéreo	Sim	Cinza claro	64,0

* Segundo Ferraz (1977, v.38, p.163-179); Góes (1995, 143p.)

** Aos cinco dias de incubação, a 25°C.

4.2 Efeito de fungicidas na inibição do crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides*

Os resultados obtidos quanto a concentração do ingrediente ativo dos fungicidas capaz de inibir 50% do crescimento micelial dos doze isolados de *C. gloeosporioides* analisados estão apresentados na Tabela 6.

Carbendazin, benomyl, tiofanato metílico, fenarimol, difenoconazole, tebuconazole e o procloraz inibiram completamente o crescimento micelial de todos os isolados de *C. gloeosporioides* na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo-se ED_{50} menor que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o triadimenol observou-se crescimento micelial pequeno na dosagem de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, porém o valor de ED_{50} foi menor que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 6- Valor médio da concentração do ingrediente ativo do fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial (ED_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$) de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	Fungicidas															
	Benomyl	Carbendazim	Tiofanato metílico	Triadimenol	Difenoconazole	Tebuconazole	Imibenconazole	Fluquinconazole (SC)	Fluquinconazole (PM)	Fenarimol	Azoxystrobin	Trifloxystrobin	Oxicloreto cobre	Mancozeb	Folpet	Procloraz
1	<10 ¹	<10	<10	<10	<10	<10	135	>1000	<10	<10	< 10	<10	>1000	108	33	<10
2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	115	<10	<10	< 10	<10	>1000	123	56	<10
3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	105	<10	<10	< 10	<10	>1000	89	53	<10
4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	180	83	<10	<10	< 10	266	>1000	484	82	<10
7	<10	<10	<10	<10	<10	<10	106	232	<10	<10	249	315	>1000	434	76	<10
8	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	>1000	<10	<10	< 10	<10	>1000	341	47	<10
10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	92	474	<10	<10	>1000	533	>1000	480	63	<10
11	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	958	<10	<10	>1000	491	>1000	448	63	<10
12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	100	<10	<10	< 10	<10	>1000	78	24	<10
13	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	208	<10	<10	< 10	<10	>1000	40	46	<10
14	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	719	<10	<10	>1000	503	>1000	474	54	<10
15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	< 10	529	<10	<10	< 10	<10	>1000	57	49	<10



Resultados semelhantes foram relatados por Goes & Kimati (1998, v.24, p.246-253) para isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de flores de citros, ao benomyl, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Adaskaveg & Hartin (1997, v.87, p.979-987) também observaram que isolados de *C. gloeosporioides* foram sensíveis ao benomyl em todas as concentrações testadas.

Rolim (1991, 57p.) trabalhando com 16 isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de seringueira, separou-os em dois grupos segundo a sensibilidade aos benzimidazóis, benomyl e tiofanato metílico. No primeiro grupo, a inibição do crescimento micelial foi sempre acima de 90%, e no outro grupo, discordando dos resultados obtidos no presente trabalho, foram colocados os isolados que apresentaram menor sensibilidade aos fungicidas. Resultados pouco satisfatórios para a inibição do crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* de mangueira foram reportados por Spalding (1982, v.66, p.1185-1186), onde 80% dos isolados estudados foram resistentes ao tiofanato metílico. Freeman et al. (1997, v.81, p.749-752) constataram que isolados de *C. acutatum* foram sensíveis a difenoconazole e a procloraz, com valores de ED_{50} para o crescimento micelial menores que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A variabilidade na sensibilidade a fungicidas constatada para os isolados de *C. gloeosporioides* da antracnose da mangueira, no presente trabalho, também foi relatada por Spalding (1982, v.66, p.1185-1186), Davis (1999, v.112, p.197-200), Nascimento et. al. (2000, v.26, p.379-382) e por outros autores para o gênero *Colletotrichum* (BALARDIN & RODRIGUES 1995, v.20, p.494-497; KOSOSKI et al. 2001, v.26, p.662-666; RAVA et al. 1998, v.24, p.45-48) em outras culturas.

O fenarimol é recomendado para o controle da sarna da macieira e mal-das-folhas da seringueira e também para oídio em várias culturas, inclusive na mangueira (WIN FIT 2000, 2001). Smith & Black (1993, v.348, p.509-512) avaliaram o efeito do fenarimol no crescimento micelial de *C. fragariae* e obtiveram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, com redução no crescimento micelial de 70% quando comparado com a testemunha, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como o fenarimol é registrado para uso na fase de florescimento e início de frutificação da mangueira, seu uso nesta época deve também controlar a antracnose. Será interessante a condução de ensaios em campo para comprovar a eficiência do fenarimol no controle de *C. gloeosporioides*.

Entre os triazóis utilizados nas avaliações de inibição do crescimento micelial dos isolados de *C. gloeosporioides*, constatou-se para o fluquinconazole (Tabela 6) comportamento



variável entre os isolados, e as duas formulações utilizadas. Como se trata do mesmo ingrediente ativo, a diferença entre eles foi atribuída ao tipo de formulação utilizada. Para o fluquinconazole na formulação SC foram obtidas percentagens de inibição do crescimento micelial de 37 a 49% para os doze isolados de *C. gloeosporioides*, mostrando-se ineficiente. Por outro lado, fluquinconazole na formulação PM proporcionou percentagens de inibição do crescimento micelial acima de 79% para seis isolados e entre 79 e 67% para outros seis isolados.

Os isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram diferenças na sensibilidade ao azoxystrobin e trifloxystrobin com o aumento da concentração do fungicida de 10 para 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo (Anexos A, B e C), além de um pequeno incremento nas inibições do crescimento micelial. Estes fungicidas inibiram completamente o crescimento micelial de sete isolados na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ingrediente ativo. O azoxystrobin apresentou ED_{50} maior que 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados 10, 11 e 14 (Tabela 6). O trifloxystrobin apresentou valores de ED_{50} de 266,4; 314,8; 532,8; 490,8; 503,0, para os isolados 4, 7, 10, 11 e 14, respectivamente (Tabela 6). Nascimento et al. (2000, v.26, p.379-382) observaram que o isolado de *C. gloeosporioides* obtido de fruto da mangueira e avaliado para inibição do crescimento micelial pelo azoxystrobin, mostrou total inibição a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este resultado comprova a variabilidade na sensibilidade desse patógeno em relação aos fungicidas do grupo das estrobilurinas. Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho também foram relatados por Caldari Junior (1998, 51p.) e Kimura (1999, 131p.), que verificaram grande variação na inibição do crescimento micelial entre isolados de *Botrytis cinerea*, com o ED_{50} situando-se abaixo de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para alguns e, para outros isolados, em 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indicando que as estrobilurinas podem não ter nenhuma ou pouca influência no crescimento micelial *in vitro*. A seletividade das estrobilurinas parece estar baseada não sobre as diferenças de sítios mitocondriais do organismo-alvo, mas sobre as diferenças estruturais de membranas celulares na penetração e degradação dos fungos (LEROUX, 1996, v.47, p.191-197; VENÂNCIO et al., 1999, v.7, p.103-155). Salgado citado por Lombardi (2002, 120p.) relata que este fungicida, quando testado *in vitro*, tem seu potencial de controle do patógeno mascarado pois necessita da presença da planta hospedeira para apresentar eficiência de 100%, além da necessidade de aplicação juntamente com algum adjuvante para melhorar o seu desempenho no controle do patógeno-alvo.

O mancozeb, na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu totalmente o crescimento micelial de todos os isolados de *C. gloeosporioides* testados (Anexo C). Os valores médios de ED_{50} para a

inibição do crescimento micelial foram de 40,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o isolado 13 e 484,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o isolado 4. Rolim (1991, 57p.) obteve resultados de inibição do crescimento micelial inferior a 43% na maior concentração testada de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e um valor de ED_{50} acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que discorda dos resultados obtidos no presente trabalho para 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando o fungicida proporcionou 100% de inibição e valores de ED_{50} menor que 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O oxiclureto de cobre proporcionou, para todos os isolados, valores de ED_{50} para crescimento micelial maiores que 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como este fungicida apresenta modo de ação protetor, ele atua antes que ocorra a infecção, protegendo a planta. Fungicidas cúpricos foram utilizados por Lima et al. (1975, v.1, p.62-66) nas avaliações de inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolados do cajueiro, não diferindo estatisticamente da testemunha na dosagem de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Prior & Ryder (1987, v.33, p.350-352) obtiveram valores de ED_{50} menores que 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* da mangueira.

A flalimida folpet apresentou baixa ED_{50} para todos os isolados, e no caso do isolado I4, 81,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi a maior concentração capaz de inibir 50% do crescimento micelial. Resultados pouco satisfatórios foram obtidos por Kososki et al. (2001, v.26, p.662-666) para a inibição do crescimento micelial de *C. acutatum*, utilizando sete fungicidas, o folpet foi o que proporcionou maior crescimento micelial, de 15 a 18 cm^2 , posicionando-se como a terceira maior média obtida entre os fungicidas.

A eficiência de procloraz em inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em baixas concentrações também foi relatada por Nascimento et al. (2000, v.26, p.379-382), e para *C. acutatum* por Freeman et al. (1997, v.81, p.749-752) e Kososki et al. (2001, v.26, p.662-666). Os resultados obtidos para o procloraz foram o inverso do obtido pelo mancozeb, que foi inibido somente na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o procloraz resultou em 100% de inibição a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3 Efeito de fungicidas na inibição da germinação de conídios de isolados de *C. gloeosporioides*

Os resultados da concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% da germinação de conídios ($ED_{50} \mu g mL^{-1}$) para os seis isolados de *C. gloeosporioides* avaliados estão apresentados na Tabela 7.

Entre os fungicidas utilizados para os testes de inibição da germinação de conídios o mancozeb foi o ingrediente ativo que proporcionou os menores valores de ED_{50} para todos os isolados (Tabela 7). Constataram-se conídios germinados apenas na concentração de $1 \mu g mL^{-1}$, com valores de ED_{50} menor que $10 \mu g mL^{-1}$ para o mancozeb. Resultados semelhantes foram relatados por Lim & Wai (1986, v.11, p.67-74) que obtiveram valores de ED_{50} de $2,56 \mu g mL^{-1}$ para isolados de *C. gloeosporioides* da mangueira. Rava et al. (1998, v.24, p.45-48) verificaram 95,2% de inibição da germinação de conídios de *C. lindemuthianum* na concentração de $4 \mu g mL^{-1}$ do mancozeb e a concentração capaz de inibir 50% da germinação de conídios foi menor que $0,16 \mu g mL^{-1}$. Kososki et al. (2001, v.26, p.662-666) obtiveram germinação de 1 a 2% de conídios de *C. acutatum*, na concentração de $10 \mu g mL^{-1}$ de mancozeb. Discordando destes resultados, Singh et al. (1999, v.125, p.566-572) verificaram inibição da germinação de conídios de *C. graminicola* de 56,4%, na concentração de $500 \mu g mL^{-1}$ deste produto.

Tabela 7- Valor médio da concentração do ingrediente ativo do fungicida capaz de inibir 50% da germinação dos conídios ($ED_{50} \mu g mL^{-1}$) de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Ilha Solteira, 2002.

Isolados	FUNGICIDAS							
	Tiofanato metílico	Triadimenol	Imibenconazole	Fluquinconazole (PM)	Azoxystrobin	Oxicloreto de cobre	Mancozeb	Procloraz
1	4	> 100	10	>100	< 1	> 100	< 1	> 100
2	< 1	> 100	> 100	>100	< 1	> 100	1-10	> 100
3	14	> 100	50	>100	< 1	> 100	< 1	> 100
4	6	> 100	> 100	>100	> 100	> 100	1-10	> 100
11	< 1	> 100	6	>100	> 100	> 100	1-10	46
15	< 1	> 100	16	>100	< 1	> 100	< 1	> 100

O tiofanato metílico proporcionou valores variados na inibição da germinação de conídios, de acordo com os isolados, sendo a maior ED_{50} para o isolado 3, e os menores valores para os isolados 2, 11 e 15, que foram respectivamente 14 e $1\mu\text{g mL}^{-1}$. Singh et al. (1999, v.125, p.566-572) verificaram valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho, com percentagem de inibição da germinação de conídios de 95,3% a $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Lim & Wai (1986, v.11, p.67-74) testaram um outro benzimidazol, o benomyl, na inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* da mangueira, e obtiveram ED_{50} para este ingrediente ativo de $1,06\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os fungicidas do grupo dos triazóis, triadimenol e fluquinconazole, e o oxiclreto de cobre apresentaram valores de $ED_{50} > 100\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os isolados, comportando-se como ineficientes na inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* da mangueira, em testes *in vitro*. Por outro lado, o oxiclreto de cobre, o hidróxido de cobre e o óxido cuproso estão registrados para uso no controle da antracnose da mangueira (WIN FIT 2000, 2001).

Na inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* (Tabela 7), o azoxystrobin proporcionou, para quatro isolados, valores de $ED_{50} < 1$, enquanto que para os isolados 4 e 11, a ED_{50} foi maior que $100\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos na inibição do crescimento micelial (Tabela 6), em que os isolados 4 e 11 apresentaram crescimento micelial, enquanto que os isolados 1, 2, 3 e 15 tiveram crescimento micelial nulo na menor dosagem.

O procloraz proporcionou maior inibição do crescimento micelial (Tabela 6) e ED_{50} para germinação de esporos, maior que $100\mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção do isolado 11 (Tabela 7), o que não descarta a possibilidade da ED_{50} , para este fungicida, ser menor que $100\mu\text{g mL}^{-1}$, levando-se em conta que nos testes de inibição da germinação de esporos utilizaram-se apenas seis isolados. Prior et al. (1992, p.326-336) relataram que o procloraz apresentou resultados promissores quando se realizaram pulverizações pré-colheita, para o controle da antracnose em pós-colheita.

4.4 Caracterização genética dos isolados de *C. gloeosporioides* por marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A técnica de RAPD estabeleceu os padrões de banda para os 12 isolados de *C. gloeosporioides* com os 13 *primers* utilizados. Neste trabalho de avaliação da variabilidade genética foram geradas 101 bandas, sendo 68 polimórficas e 33 monomórficas, com média de



oito bandas por iniciador. Na Figura 1 está apresentado o padrão de amplificação obtido com o iniciador OPA-18. A amplificação de DNA revelou a presença de 6 bandas, todas polimórficas. À distancia genética 70, três grupos foram diferenciados entre os 12 isolados de *C. gloeosporioides*, gerando o dendograma que mostra a relação entre os isolados (Figura 2).

De acordo com a similaridade genética entre os isolados analisados (Figura 2), os isolados 1, 2, 12, 13 e 15 foram nomeados grupo 1, os isolados 3 e 8 grupo 2, e os isolados 4, 7, 10, 11 e 14, grupo 3. O grupo 3 apresentou menor similaridade em relação aos outros dois grupos. Estes resultados não apresentaram relação com a patogenicidade dos isolados. Por outro lado, houve relação entre os grupos formados pelo teste de RAPD e as características morfológicas apresentadas. Todos os isolados do grupo 3 apresentaram crescimento aéreo, coloração da colônia cinza escura e diâmetro da colônia maior que 70 mm, mostrando assim, que seu crescimento é mais rápido que o crescimento dos isolados do grupo 1, que tiveram diâmetro da colônia menor que 64 mm. A coloração da colônia neste grupo foi de branca a cinza clara, com exceção do isolado 15, que teve em média, coloração cinza escuro. O tipo de crescimento destes isolados foi em média rasteiro, com exceção dos isolados 1 e 15, que apresentaram crescimento aéreo na maioria das vezes.

Os isolados do grupo 3, se posicionaram no dendograma (Figura 2) em um grupo distante dos demais, apresentando uma similaridade próxima de 50%. No teste de patogenicidade, ambos mostraram sintomas semelhantes aos produzidos pelos demais isolados dos outros grupos, e características morfológicas semelhantes. Esta baixa similaridade entre os isolados de *C. gloeosporioides* sugere que tenha ocorrido uma maior variação genética entre os isolados e que há possibilidade de se ter mais de uma espécie de *Colletotrichum* entre os isolados testados. Resultados na variação genética também foram relatados por Silva-Mann (2002, v.27, p.27-32); Kuramae-Izioka et al. (1997, v.103, p.323-329).

Figura 2 Dendograma obtido pelo teste de similaridade de distância entre os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da mor. seta.

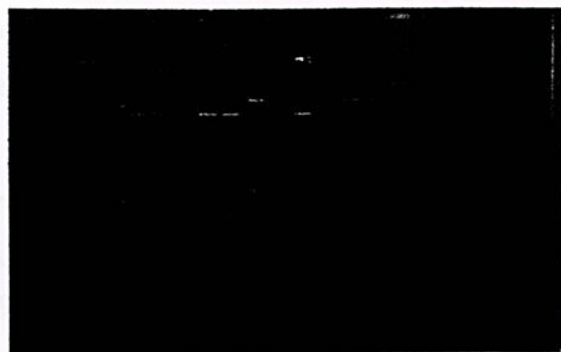


Figura 1- Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA genômico de 12 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* com o iniciador OPA-18.

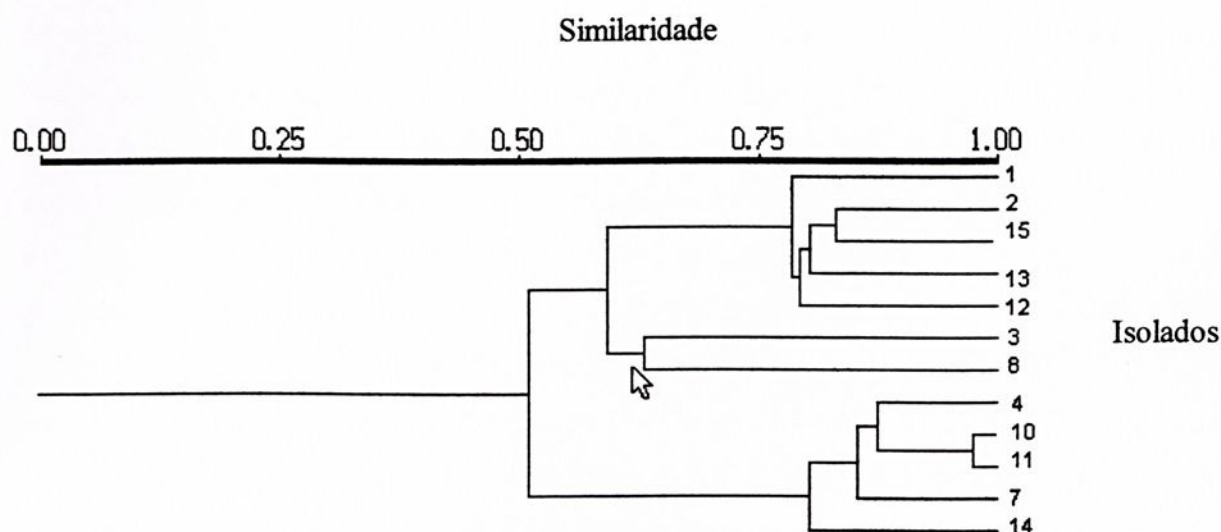


Figura 2- Dendrograma obtido com base nos coeficientes de similaridade entre os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da mangueira.

Quanto a sensibilidade a fungicidas, também houve relação com a análise de RAPD. Em geral, os isolados dos grupos 1 e 2 foram mais sensíveis aos fungicidas que os isolados do grupo 3. Trabalhos semelhantes foram realizados por Davis (1999, v.112, p.197-200) para *C. gloeosporioides* da mangueira na Flórida, que separou os isolados em sensíveis ou resistentes ao benomyl. Kuramae-Izioka et al. (1997, v.103, p.323-329) conseguiram separar, por meio da técnica de RAPD, isolados de *Colletotrichum* spp. sensíveis dos resistentes ao benomyl. Bernstein et al. (1995, v.79, p.478-482) observaram que isolados de *Colletotrichum* spp., de coloração rosada que não foram sensíveis ao benomyl na concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foram separados claramente pela análise de RFLP de isolados de coloração cinza, que foram altamente sensíveis ao fungicida.

Dessa forma, estes resultados mostram que o uso de marcadores moleculares de RAPD podem ser de grande utilidade para a identificação e diferenciação de importantes fungos fitopatogênicos, como já referido nos trabalhos de Vilarinhos et al. (1995, v.20, p.194-197); Peres et al. (2002, v.150, p.128-134); Martinez- Culebras et al. (2000, v.189, p.97-101).

5. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho foi desenvolvido considerando-se a importância da cultura da mangueira, que vem crescendo de forma significativa, e a ocorrência da antracnose, uma das principais doenças da cultura, e a presença de variabilidade entre os isolados de *C. gloeosporioides*. Assim, para a obtenção de níveis adequados de produção, o conhecimento da variabilidade do agente causal em diferentes aspectos pode contribuir no manejo da doença.

A variabilidade detectada entre os isolados de *Colletotrichum* spp. também é relatada por outros autores para as características morfológicas (SINGH et al., 1999, v.125, p.566-572; ROLIM, 1991, 57p.; GOES, 1995, 143p.; GOES & KIMATI, 1998, v.24, p.246-253), genéticas (GUTHRIE et al., 1992, v.82, p.832-835; KURAMAE-IZIOKA et al., 1997, v.103, p.323-329; PERES et al., 2002, v.150, p.128-134; SILVA-MANN et al., 2002, v.27, p.27-32), e na sensibilidade a fungicidas (SPALDING, 1982, v.66, p.1185-1186; ROLIM, 1991, 57p.; ASTUA et al., 1994, v.18, p.35-39; GOES, 1995, 143p.; ADASKAVEG & HARTIN, 1997, v.87, p.979-987; GOES & KIMATI, 1998, v.24, p.246-253; RAVA et al., 1998, v.24, p.45-48; DAVIS, 1999, v.112, p.197-200).

A metodologia utilizada neste trabalho mostrou-se adequada para detectar a variabilidade dos isolados de *C. gloeosporioides* da mangueira, que foram separados primeiramente pelas características patogênicas, morfológicas e de sensibilidade a fungicidas e, posteriormente, por análises de RAPD. A utilização de um número maior de isolados poderia contribuir para uma melhor caracterização da variabilidade de *C. gloeosporioides*.



Com base nos resultados obtidos, os isolados de *C. gloeosporioides* foram separados em três grupos pela análise de RAPD, dois grupos pelas características morfológicas e também dois grupos pela sensibilidade a fungicidas. Neste último caso, as características foram mais bem visualizadas nos fungicidas do grupo das estrobilurinas. No grupo 1 estão reunidos os isolados 1, 2, 12, 13 e 15, que foram sensíveis aos fungicidas e apresentaram características morfológicas variáveis, mas em média possuem crescimento rasteiro, coloração de colônia branca ou cinza clara e diâmetro da colônia inferior a 70 mm. A visualização da esporulação foi uma característica que variou entre os isolados neste grupo. No grupo 3, estão os isolados pouco sensíveis aos fungicidas, com características morfológicas bem definidas, sendo elas, tipo de crescimento aéreo, coloração cinza escura para todos os isolados deste grupo, com diâmetro da colônia superior a 70 mm. Entre os isolados deste grupo, apenas o 4 não apresentou esporulação visível. O grupo 2, representado pelos isolados 3 e 8, apresentou sensibilidade a fungicidas e características morfológicas semelhantes aos isolados do grupo 1.

A importância dos testes *in vitro* de fungicidas, principalmente os utilizados neste trabalho, está no fato de eles servirem como um referencial na caracterização de isolados de fungos, indicando produtos que poderão ser avaliados em condições de campo.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que:

- Existe variabilidade na patogenicidade e na virulência entre os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Os isolados de *C. gloeosporioides* pertencem a dois grupos segundo as características morfológicas estudadas.
- Os valores de ED₅₀ para a inibição do crescimento micelial e inibição da germinação de conídios variaram em função dos ingredientes ativos testados e dos isolados de *C. gloeosporioides*.
- Os fungicidas benomyl, carbendazin, tiofanato metílico, tebuconazole, difenoconazole, fenarimol e procloraz são eficientes na inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, *in vitro*.
- Entre os fungicidas testados, apenas o mancozeb apresentou ação protetora eficiente, inibindo completamente a germinação de conídios de *C. gloeosporioides*.

- Com a análise de RAPD foi possível constatar a existência de três grupos de isolados de *C. gloeosporioides*, os quais não foram identificados utilizando-se apenas as características morfológicas e sensibilidade a fungicidas.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS WEG, J. E., HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, São Paulo, v. 87, n. 9, p. 979-978, 1997.

ASTUA, G.; ARRIAZ, L. F.; UMAÑA, G. Sensibilidade referida al triazolinol em *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de papaya. *Agronomía Costarricense*, San José, v. 18, n. 1, p. 15-20, 1994.

BALARDIN, R. S.; RODRIGUES, J. C. V. Sensibilidade in vitro de isolos de *Colletotrichum Imbricatum* a fungicidas sistêmicos e protectores. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 404-407, 1995.

SAXTER, A. P.; WESTRUTZEN, V. B. C. A.; PICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytophylactica*, Pretória, v. 17, p. 15-18, 1985.

BERNSTEIN, B.; ZERA, E. I.; DEAN, R. A.; SHABBI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pear, and other hosts. *Plant Disease*, Saint Paul, v.79, n.3, p.478-482, 1995.

BRAGA, J. R. Fungicidas diliocebatoenos no controle de doenças das plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.1, p.349-367, 1991.

CALDARI JÚNIOR, P. Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais. 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

7. REFERÊNCIAS

CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. A.; THOMAS, M. R.

ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, Saint Paul, v.87, n.9, p.979-978, 1997.

CUNHA, M. M.; COUTINHO, C. C.; PINHEIRO, N. T. V.; FERREIRA, F. R. Mangas

ASTUA, G.; ARAUZ, L. F.; UMAÑA, G. Sensibilidade reducida al tiabendazole em *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya. *Agronomia Costarricense*, San Jose, v.18, n.1, p.35-39, 1994.

DAVIS, M. J. Genetic and pathological diversity of the mango anthracnose pathogen in

BALARDIN, R. S.; RODRIGUES, J. C. V. Sensibilidade *in vitro* de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas sistêmicos e protetores. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, n.3, p.494-497, 1995.

DEKKER, J. Aquecedo resistance to fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo

BAXTER, A. P.; WESTHUIZEN, V. G. C. A.; EICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytophylactica*, Pretória, v. 17, p.15-18, 1985.

DEBORA, J. A. Algumas variedades de manga e sua resistência a doenças fúngicas

do estado de São Paulo. Campinas, 1981. CATI, n. 71, p. 3-12 (Boletim técnico).

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

BRAGA, J. R. Fungicidas ditiocarbamatos no controle de doenças das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.1, p.349-367, 1993.

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. A.; THOMAS, M. R. Pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in center of diversity in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v.92, n.5, p.553-562, 2002.

CUNHA, M. M.; COUTINHO, C. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FERREIRA, F. R. **Mangas para exportação: aspectos fitossanitários**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1993. 104p. (Série publicações técnicas FRUPEX, 3).

DAVIS, M. J. Genetic and pathological diversity of the mango anthracnose pathogen in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v.112, p. 197-200, 1999.

DEKKER, J. Acquired resistance to fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.14, p.405-428, 1976.

DONADIO, L. C et al.. **Características de algumas variedades de mangueira cultivadas no estado de São Paulo**, Campinas: 1981, CATI, n.171, p.3-12 (Boletim técnico).

GULLINO, M. L.; LEROUX, P.; SMITH, C. M. Uses and challenges of plant disease control. **Crop Protection**, Guildford, v.19, p.1-11, 2000.

ESTRADA, A. B.; DODD, J. C.; JEFFRIES, P. Effects of enviroment on the *in vitro* growth and development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from the Philippines. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.341, p.360, 1993.

FERRAZ, J. F. P. Morfologia, comportamento cultural e patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. **Agronomia Lusitana**, Oeiras, v.38, n.2, p.163-179, 1977.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/ CENARGEN, 1995, 220p.

FORCELINI, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. Triazóles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.335-355, 1994.

FORCELINI, C. A.; GOELLNER, C. I.; MIO, L. L. M. Resistência de fungos a fungicidas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.9, p.339-381, 2001.

FREEMAN, S.; NIZANI, Y.; DOTAN, S.; EVEN, S.; SANDO, T. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse and field conditions. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p.749-752, 1997.

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

GOES, A.; KIMATI, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível a benomyl? **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, n.3/4, p.246-53, 1998.

GULLINO, M. L.; LEROUX, P.; SMITH, C. M. Uses and challenges of plant disease control. **Crop Protection**, Guildford, v.19, p.1-11, 2000.



GUTHRIE, P. A.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A et al. Random Amplified Polymorphic DNA Markers: A System for Identifying and Differentiating Isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, n.8, p.832-835, 1992.

IGARASHI, S. **Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica, patogênica e serológica de *Colletotrichum* spp. do morango (*Fragaria* spp.)**. 1984. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

KIMURA, M. K. **Sensibilidade e resistência in vitro de *Botrytis cinerea* a fungicidas**. 1999. 131p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

KOLLER, W.; SCHEINPFLUG, H. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. **Plant Disease**, Saint Paul, v.71, n.12, p.1066-1074, 1987.

KOSOSKI, R. M.; FURLANETTO, C.; TOMITA, C. K.; CAFÉ FILHO, A. C. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.3, p.662-666, 2001.

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

LEROUX, P. Recent developments in the mode of action of fungicides. **Pesticide Science**, Oxford, v.47, p.191-197, 1996.



LIM, T. K.; WAI, O. C. Effects of selected fungicides *in vitro* on the mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p.67-74, 1986.

LIMA, J. A. A.; MENEZES, M.; KARAM, M. Q.; OLIVEIRA, V. P.; RODRIGUES, M. G. R. Ação tóxica de alguns fungicidas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, agente causal da antracnose do cajueiro. **Fitossanidade**, Fortaleza, v.1, n.2, p. 62-66, 1975.

LITZ, R. E. Mango. In: PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W.T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. **Compendium of tropical fruit disease**, Saint Paul, p.33, 1994.

LOMBARDI, A. P. Z. **Caracterização morfológica, fisiológica, patogênica, molecular e sensibilidade a fungicidas de *Cercospora coffeicola***. 2002. 120p. (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

MANICA, I. Doenças e Pragas, In: **Fruticultura tropical: 2 manga**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981, p. 99-102.

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V.; BARRIO, E.; GARCIA, M. D.; QUEROL, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed ribosomal region. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v.189, p.97-101, 2000.

MEDCALF, J. C. Controle de moléstias da mangueira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Sociedade Brasileira de fruticultura, 1980. p.108-111.

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V.; BARRIO, E.; GARCIA, M. D.; QUEROL, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed ribosomal region. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v.189, p.97-101, 2000.



NASCIMENTO, S. R. C.; ARAÚJO NETO, S. E.; HAFLE, O. M. Uso de procloraz, azoxystrobin e bicarbonato de sódio, para o controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides*, em manga 'Tommy Atkins' **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.379-382, 2000.

NEHMI, I. M. D.; FERRAZ, J. V.; NEHMI FILHO, V. A.; SILVA, M. L. M. Manga. In: **Agrianual 2003**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformática, 2002, p.398.

PAREDES, B. S. G.; MUNÕZ, F. R. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. **Crop Protection**, Guildford, v.21, p. 11-15, 2002.

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

PICININI, E. C. Fungicidas benzimidazóis. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.357-407, 1994.

PLOETZ, R. C. Mango disease caused by fungi. In: PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. **Compendium of Tropical Fruit Disease**, Saint Paul, p.35-36, 1994.

PRIOR, C.; RYDER, K. Effect of low volume copper sprays with polyisobutene sticker on mango blossom blight (*Glomerella cingulata*) in Dominica. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v.33, n.4, p.350-352, 1987.

PRIOR, C.; ELANGO, F. WHITWELL, A. Chemical control of *Colletotrichum* infection in mangoes. In: BAYLEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.) **Colletotrichum: Biology, Pathology and control**. England: CAB International Wallingford, 1992. p.326-336.



RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; BOTELHO, S. A. Eficiência *in vitro* e *in vivo* de fungicidas no controle de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.45-48, 1998.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica* L). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1997. p.511-524.

ROLIM, P. R. R. *Colletotrichum gloeosporioides* (Sensu ARX, 1957) em seringueira (*Hevea* spp): identificação, patogenicidade e controle. 1991. 57p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

SCHAFFER, E., WOSTMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiales aggressive and non-aggressive isolates of oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal Phytopathology**, Berlin, v.136, n.10, p.124-136, 1992.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.1, p.27-32, 2002.

SINGH, D.; CHAPANDRA, J. P.; SINGH, A. B. Response of fungicides and antibiotics against anthracnose of poplar caused by *Colletotrichum graminicola*. **Indian Forester**, Dehra Dun, v.125, n.6, p.566-572, 1999.

SMITH, J. B.; BLACK, L. L. *In vitro* activity of fungicides against *Colletotrichum fragariae*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.348, p.509-512, 1993.



SPALDING, D. H. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. **Plant Disease**, Saint Paul., v.66, p.1185-1186, 1982.

STRADIOTO, M. F. **Variabilidade de *Colletotrichum* (Penzig) Penzig & Sacc. e resistência de seringueira (*Hevea* spp.) ao patógeno.** 1993. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

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

THIND, T. S.; JHOOTY, J. S. Studies on variability in two *Colletotrichum* species causing anthracnose and fruit rot of chillies in punjab. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.43, n.1, p.53-58, 1990.

TINGEY, S. V., DELTUFO, J. P. Genetic analysis with random Amplified Polymorphic DNA markers. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.101, n.3, p.349-352, 1993.

TUITE, J. **Plant pathological methods.** Minneapolis: Minn., Burgess Publishing company, 1969. 239p.

VENÂNCIO, W. S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L. Novos fungicidas. I- produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.7, p.103-155, 1999.

VILARINHOS, A. D., PAULA JUNIOR., T. J., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.194-197, 1995.



WASTIE, R. L.; SANKAR, G. Variability and pathogenicity of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea Brasiliensis*. **Transation British Mycological Society**, Great Britain, v.54, n.1, p.117-121, 1970.

WILLIAMS, J. G.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, A. J.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v.218, n.17, p.704-740, 1989.

WIN FIT 2000: **Compêndio agronômico com receituário**. Viçosa: Bioagro, 2001. 1 CD-ROOM.

ANEXOS



Anexo A- Percentual de inibição do crescimento micelial *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA contendo fungicidas na concentração de 10 µg mL⁻¹. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	Benomyl	Fungicidas														
		Carbendazim	Tiofanato metílico	Triadimenol	Tebuconazole	Difenoconazole	Imibenconazole	Fluquinconazole (SC)	Fluquinconazole (PM)	Fenarimol	Azoxystrobin	Trifloxystrobin	Oxicloreto cobre	Mancozeb	Folpet	Procloraz
1	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	69,3 fC	100,0 aA	100,0 aA	61,1 cD*	26,5 gG	85,4 bB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	2,7 bcH	31,5 fF	42,5 bE	100,0 aA
2	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	87,1 aB	100,0 aA	100,0 aA	66,3 aD	38,8 cE	79,7 cC	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	0,4 dH	35,9 eF	27,3 eG	100,0 aA
3	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	84,6 bB	100,0 aA	100,0 aA	62,2 cD	39,3 cF	72,7 deC	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	0,1 dH	48,8 aE	27,5 eG	100,0 aA
4	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	66,3 gB	100,0 aA	100,0 aA	43,4 fD	31,1 eFF	67,3 gA	100,0 aA	61,5 bC	21,6 dG	2,8 bI	38,2 dE	19,3 fH	100,0 aA
7	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	70,2 eFB	100,0 aA	100,0 aA	31,2 hEF	29,4 fF	65,6 gC	100,0 aA	31,8 eE	22,5 dG	0,9 bcdI	41,0 cD	16,3 gH	100,0 aA
8	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	82,5 cB	100,0 aA	100,0 aA	58,3 dD	26,9 gG	73,9 dC	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	5,4 aH	39,3 cdE	33,0 dF	100,0 aA
10	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	71,6 eB	100,0 aA	100,0 aA	36,4 gC	29,8 fD	70,0 fB	100,0 aA	36,2 dC	29,5 bD	1,0 bcdF	1,1 hF	16,6 gE	100,0 aA
11	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	79,5 dB	100,0 aA	100,0 aA	53,6 eC	31,9 eD	79,3 cB	100,0 aA	11,2 fG	29,3 bE	0,8 cdH	1,0 hH	17,4 gF	100,0 aA
12	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	86,6 aB	100,0 aA	100,0 aA	65,8 abC	42,5 bE	86,7 abB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	0,0 dG	31,7 fF	45,4 aD	100,0 aA
13	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	85,3 abC	100,0 aA	100,0 aA	64,3 bD	39,8 cF	87,8 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	0,0 dH	46,8 bE	36,4 cG	100,0 aA
14	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	66,9 gC	100,0 aA	100,0 aA	53,7 eD	36,5 dE	71,0 eFB	100,0 aA	30,7 eF	25,4 cG	0,0 dI	10,9 gH	26,8 eG	100,0 aA
15	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	85,4 abB	100,0 aA	100,0 aA	65,5 abC	45,4 aD	85,9 abB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	0,0 dF	32,9 fE	34,5 cdE	100,0 aA
CV	(%)	1,9														
DMS		1,87														

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Isolado	Fungicidas															
	Benomyl	Carbendazin	Tiofanato metílico	Triadimenol	Tebuconazole	Difenoconazole	Inibenconazole	Fluquinconazole (SC)	Fluquinconazole (PM)	Fenarimol	Azoxystrobin	Trifloxystrobin	Oxicloreto cobre	Mancozeb	Folpet	Procloraz
1	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	67,7 aD*	38,5 eE	87,2 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	2,3 gG	23,6 dF	69,6 bcC	100,0 aA
2	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	66,9 abD	48,2 bE	79,7 bB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	13,7 cG	21,2 eF	69,1 cC	100,0 aA
3	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	65,2 bcD	48,6 bE	79,2 bB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	7,1 eG	28,1 cF	72,1 aC	100,0 aA
4	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	49,7 eD	50,9 aD	67,6 eB	100,0 aA	67,9 bB	32,9 bE	16,0 bF	7,7 iG	57,2 eC	100,0 aA
7	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	47,1 fD	41,7 dE	67,4 eB	100,0 aA	39,6 cF	32,5 bG	8,0 eI	12,4 gH	61,0 dC	100,0 aA
8	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	66,2 abcD	41,6 dE	73,5 cB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	18,7 aF	19,7 eFf	72,2 aC	100,0 aA
10	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	51,0 eC	49,1 abD	69,9 dB	100,0 aA	36,6 dE	33,1 bF	10,4 dH	18,1 fG	71,3 abB	100,0 aA
11	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	66,2 abcC	44,4 cD	75,3 cB	100,0 aA	23,5 fF	28,7 cE	0,0 hG	28,3 cE	71,1 abB	100,0 aA
12	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	66,5 abcD	50,0 abF	86,7 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	0,0 hG	63,7 aE	72,7 aC	100,0 aA
13	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	64,9 cD	44,6 cF	87,8 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	0,0 hG	61,1 bE	68,6 cC	100,0 aA
14	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	58,8 dC	37,9 eD	71,0 dB	100,0 aA	30,7 eE	31,3 bE	5,2 fG	9,6 hF	71,8 aB	100,0 aA
15	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	67,9 aC	45,4 cE	86,6 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	16,7 bF	64,3 aD	69,0 cC	100,0 aA
CV	(%)	1,7														
DMS		1,81														

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



Anexo C- Percentual de inibição do crescimento micelial *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA contendo fungicidas na concentração de 1000 µg mL⁻¹. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	Fungicidas															
	Benomyl	Carbendazin	Tiofanato metílico	Triadimenol	Tebuconazole	Difenoconazole	Imibenconazole	Fluquinconazole (SC)	Fluquinconazole (PM)	Fenarimol	Azoxystrobin	Trifloxystrobin	Oxicloreto cobre	Mancozeb	Folpet	Procloraz
1	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	76,0 eC	55,2 eE	87,4 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	33,8 gF	100,0 aA	73,2 deD	100,0 aA
2	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	75,6 eC	58,6 dE	81,5 bB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	38,0 fF	100,0 aA	70,7 hiD	100,0 aA
3	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	75,5 eB	59,7 cD	75,7 cB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	38,2 fE	100,0 aA	73,6 cdC	100,0 aA
4	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	70,7 gC	68,7 aD	71,0 eC	100,0 aA	75,7 bB	31,6 dE	25,5 hG	100,0 aA	66,1 jE	100,0 aA
7	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	60,0 hD	54,4 eE	67,7 fC	100,0 aA	55,3 eE	31,7 dF	26,5 hG	100,0 aA	69,7 iB	100,0 aA
8	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	80,6 cB	58,1 dD	80,6 bB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	40,1 eE	100,0 aA	72,0 fgC	100,0 aA
10	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	70,1 gC	61,7 bE	70,0 eC	100,0 aA	46,6 dF	67,1 cD	34,6 gG	100,0 aA	75,3 abB	100,0 aA
11	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	70,1 gD	51,7 fE	73,6 dC	100,0 aA	36,1 fF	74,4 bC	52,6 cE	100,0 aA	76,2 aB	100,0 aA
12	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	83,6 aC	58,2 dF	86,5 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	64,1 bE	100,0 aA	72,5 defD	100,0 aA
13	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	82,3 bC	54,3 eF	87,5 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	65,2 bE	100,0 aA	71,1 ghD	100,0 aA
14	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	72,4 fC	54,2 eD	73,8 dB	100,0 aA	44,0 eE	73,7 bB	42,4 dF	100,0 aA	74,4 bcB	100,0 aA
15	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	79,1 dC	54,3 eF	86,6 aB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	66,3 aE	100,0 aA	72,3 efD	100,0 aA
CV	(%)	0,7														
DMS		1,1														

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula e maiúscula na coluna e na linha, respectivamente, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo D- Percentual de inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* a fungicidas na concentração de 1 µg mL⁻¹. Médias de quatro repetições. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	Tiofanato metílico	Fungicidas						
		Triadimenol	Imibenconazole	Fluquinconazole (PM)	Azoxystrobin	Oxicloreto de cobre	Mancozeb	Procloraz
1	31,0 aB*	29,0 bB	5,5 aC	6,5 aC	100,0 aA	0,3 aC	100,0 aA	6,1 aC
2	17,8 bcC	47,8 aB	3,7 aD	1,7 aD	100,0 aA	1,3 aD	17,2 dC	1,7 aD
3	10,0 cdC	1,9 cCD	1,0 aD	4,2 aCD	100,0 aA	1,1 aD	70,8 bB	4,2 acD
4	19,5 bA	2,0 cB	3,3 aB	1,7 aB	18,1 bA	0,3 aB	8,7 eA	1,7 aA
11	3,4 dA	1,8 cA	1,0 aA	2,1 aA	1,9 cA	0,5 aA	1,9 eAB	2,1 aAB
15	3,2 dD	28,8 bC	3,2 aD	3,2 aD	100,0 aA	1,6 aD	59,3 cB	3,2 aD
CV(%)	25,9							
DMS	8,8							

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo E- Percentual de inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* a fungicidas na concentração de 10 µg mL⁻¹. Médias de quatro repetições. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	Tiofanato metílico	Fungicidas						
		Triadimenol	Imibenconazole	Fluquinconazole (PM)	Azoxystrobin	Oxicloreto de cobre	Mancozeb	Procloraz
1	94,9 bB	29,9 bD	48,3 bC	6,2 aE	100,0 aA	1,6 bF	100,0 aA	0,5 dF
2	100,0 aA	20,7 cC	35,2 cB	2,7 bE	100,0 aA	4,6 aE	100,0 aA	8,4 aD
3	36,4 dB	3,0 dEF	11,1 dC	4,2 abD	100,0 aA	1,4 bF	100,0 aA	6,4 abD
4	69,0 cB	3,9 dE	1,4 eF	3,1 bEF	19,4 bC	1,5 bF	100,0 aA	6,5 abD
11	100,0 aA	4,3 dC	91,4 aB	4,2 abC	5,7 cC	1,1 bD	100,0 aA	4,8 bcC
15	100,0 aA	52,7 aB	32,9 eC	3,8 bD	100,0 aA	2,9 aD	100,0 aA	3,7 cD
CV(%)	3,3							
DMS	2,31							

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



Anexo F- Percentual de inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* a fungicidas na concentração de 100 µg mL⁻¹. Médias de quatro repetições. Ilha Solteira, 2002.

Isolado	Fungicidas							
	Tiofanato metílico	Triadimenol	Imibenconazole	Fluquinconazole (PM)	Azoxystrobin	Oxicloreto de cobre	Mancozeb	Procloraz
1	100,0 Aa*	20,9 cC	39,7 cB	16,7 cC	100,0 aA	4,7 cD	100,0 aA	3,8 dD
2	100,0 aA	9,6 dB	4,5 eC	5,8 eC	100,0 aA	8,0 bB	100,0 aA	7,7 cB
3	100,0 aA	6,5 eD	9,7 dB	9,8 dB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	8,3 cC
4	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	30,9 bB	7,9 bC	100,0 aA	100,0 aA
11	100,0 aA	4,3 fB	4,4 eB	3,6 fBC	3,5 cBC	1,0 dD	100,0 aA	2,9 dC
15	100,0 aA	98,2 bB	67,0 bD	76,9 bC	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	98,2 bB
CV(%)	2,1							
DMS	1,15							

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

Programa de Pós-graduação em Agronomia

Av. Brasil, 56 Centro

15385-000 Ilha Solteira - SP

www.feis.unesp.br

