

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE  
*Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A ANTRACNOSE EM  
MANGA, MAMÃO E GOIABA**

**Juliana Stracieri  
Engenheira Agrônoma**

**2015**

**T  
E  
S  
E**

**/**

**S  
T  
R  
A  
C  
T  
U  
R  
E**

**J.**

**2**

**0**

**1**

**5**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE  
*Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A ANTRACNOSE EM  
MANGA, MAMÃO E GOIABA**

**Juliana Stracieri**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes**

**Coorientadora: Profa. Dra. Héliida Mara Magalhães**

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

**2015**

Stracieri, Juliana  
S894c Caracterização morfofocultural e molecular de *Colletotrichum* spp.  
associados a antracnose em manga, mamão e goiaba / Juliana  
Stracieri. -- Jaboticabal, 2015  
ix,109 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientador: Antonio de Goes  
Coorientadora: Héliida Mara Magalhães  
Banca examinadora: Rita de Cassia Panizzi, Luciana Rossini  
Pinto, Viviani Vieira Marques, Rubens Pazza  
Bibliografia

1. *Mangifera indica*. 2. *Carica papaya*. 3. *Psidium guajava*. 4.  
*Colletotrichum gloeosporioides*. 5 marcadores ISSR. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:634.1

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

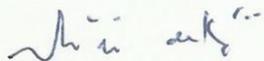
**TÍTULO:** CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp.  
ASSOCIADOS À ANTRACNOSE EM MANGA, MAMÃO E GOIABA

**AUTORA:** JULIANA STRACIERI

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. HÉLIDA MARA MAGALHÃES

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



Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. RITA DE CASSIA PANIZZI

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO

Instituto Agronômico de Campinas / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. VIVIANI VIEIRA MARQUES

Fundo de Defesa da Citricultura / Araraquara/SP



Prof. Dr. RUBENS PAZZA

Universidade Federal de Viçosa / Rio Paranaíba/MG

Data da realização: 31 de julho de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

JULIANA STRACIERI – nascida em 21 de fevereiro de 1986, em São Paulo - SP, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), em março de 2010. Em 2012 concluiu o mestrado em Fitotecnia na mesma Universidade. Em Agosto de 2012 iniciou o curso de doutorado em Agronomia, na área de Concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, câmpus de Jaboticabal. Durante o período de realização do curso de doutorado, foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Em julho de 2015 foi nomeada professora pela Universidade Estadual de Maringá.

“Enquanto eu tiver perguntas e não houver  
resposta continuarei a escrever.”

(Clarice Lispector)

**Dedico,**

Aos meus pais (Vicentina e Alcides) pelo amor, carinho e confiança a mim sempre dedicados.

Meu exemplo de caráter e esforço.

Ao meu esposo (Luís Carlos Cirilo Carvalho) pelo amor incondicional, apoio, paciência e motivação em todos os momentos.

Ao meu irmão Fabiano Stracieri, *in memoriam*, e ao meu sogro Alberto Carvalho Filho pelo incentivo, carinho, amizade e companheirismo.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao professor Dr. Antonio de Goes, pela orientação, amizade e confiança, exemplo de profissional pelo caráter, sabedoria e humildade.

A professora Héliida Mara Magalhães pela coorientação, atenção, amizade e confiança.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

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

Ao professor Dr. Antonio Sergio Ferraudo por me auxiliar na análise estatística.

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

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

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

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

Aos amigos de laboratório João, Eduardo, Bruno, Amanda, Fernanda, Laís, Marina e Ana Dulce pelos sorrisos, conversas e carinho. Aprendi muito com todos vocês.

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

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1. INTRODUÇÃO .....	1
1.2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
1.2.1. Antracnose .....	2
1.2.1.1. Etiologia e sintomatologia .....	4
1.2.1.2. Epidemiologia .....	7
1.2.2. Controle da doença .....	8
1.2.3. Caracterização molecular de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	10
1.3. REFERÊNCIAS .....	12
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE <i>Colletotrichum</i> spp. DO MAMOEIRO .....	21
2.1. INTRODUÇÃO .....	22
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados <i>Colletotrichum</i> spp. ....	25
2.2.2. Identificação molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	26
2.2.3. Caracterização morfo cultural de <i>Colletotrichum</i> sp. ....	28
2.2.4. Análise de dados.....	30
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
2.4. CONCLUSÕES .....	42
2.5. REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. ASSOCIADOS A ANTRACNOSE EM MANGA	47
RESUMO.....	47
3.1. INTRODUÇÃO .....	47
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
3.2.1. Obtenção e preservação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	50
3.2.2. Extração de DNA dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	52
3.2.3. Reações com primers específicos para <i>C. acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> .	54

3.2.4. Caracterização morfo cultural e patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	55
3.2.5. Sensibilidade micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. a fungicida .....	58
3.2.6. Análise dos dados .....	59
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
3.3.1. Obtenção de isolados .....	60
3.3.2. PCR com primers específicos para <i>Colletotrichum</i> spp. ....	60
3.3.3. Caracterização Morfo cultural e Patogênica .....	61
3.3.4. Avaliação de fungicidas .....	70
3.4. CONCLUSÕES .....	74
3.5. REFERÊNCIAS .....	75
CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO MORFO CULTURAL, MOLECULAR E PATO GÊNICA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. ASSOCIADOS A ANTRACNOSE EM GOIABA .....	78
RESUMO .....	78
4.1. INTRODUÇÃO .....	79
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	81
4.2.1. Origem, cultivo e preservação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	81
4.2.2. Extração de DNA dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	84
4.2.3. Reações com primers específicos para <i>C. acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> .	85
4.2.4. Reação PCR-ISSR .....	86
4.2.5. Caracterização morfo cultural e patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	87
4.2.6. Sensibilidade micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. a fungicida .....	89
4.2.7. Análise dos dados .....	90
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
4.3.1. Obtenção de isolados .....	92
4.3.2. PCR com primers específicos para <i>Colletotrichum</i> spp. ....	92
4.3.3. Caracterização morfo cultural .....	95
4.3.4. Avaliação de fungicidas .....	101
4.4. CONCLUSÕES .....	105
4.5. REFERÊNCIAS .....	105
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	109

## LISTA DE TABELA

		Página
Tabela 1	Relação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. quanto a origem das amostras de frutos de mamão, número de isolados e variedade .....	25
Tabela 2	Relação de <i>primers</i> utilizados, suas respectivas sequências, temperaturas de amplificação e número de fragmentos observados nos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. provenientes de frutos de mamoeiros.....	28
Tabela 3	Escala de notas referentes à coloração de colônias, do bordo e do reverso, e determinação quanto à possível presença de setores .....	29
Tabela 4	Relação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. quanto a origem das amostras de frutos de mamão, referência dos isolados, variedade e espécie analisada .....	32
Tabela 5	Médias do índice de velocidade de crescimento (IVCM), diâmetro das colônias (DC) e notas correspondentes à coloração das colônias (C_C), da borda (C_B) e do reverso (C_R), assim como quanto à ausência ou presença de setores (S) e a Patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio BDA, a 25 °C.....	37
Tabela 6	Designação, procedência, hospedeiros (variedades) e órgãos os quais os isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. foram obtidos Jaboticabal/SP, 2015.....	51
Tabela 7	Componentes de “mix”, suas respectivas concentrações estoque, volume e concentrações finais utilizadas nas reações PCR com primers específicos (CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4) e PCR-ISSR.....	55
Tabela 8	Escala de notas referentes à coloração de colônias, do bordo e do reverso, e determinação quanto à possível presença de pontos no reverso e setores.....	56
Tabela 9	Fungicidas utilizados no teste de sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , obtidos de mangueiras, de diferentes variedades. Jaboticabal/SP, 2015.....	58
Tabela 10	Respostas fenotípicas de 52 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de manga quanto a cor da colônia(C_C), cor do bordo(C_B), cor do reverso(C_R), presença ou ausência de pontuações pretas no reverso (P_R),	63

	presença ou ausência de setores (S) em meio BDA, a 25 °C, sob luz contínua, por sete dias, e patogenicidade média (P), resultante da inoculação de frutos destacados de manga da variedade Palmer. Jaboticabal/SP, 2015.....	
Tabela 11	Diâmetro médio das colônias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> após 7 dias de incubação, em meio BDA acrescido de três fungicidas, sob cinco concentrações de ingrediente ativo. Jaboticabal/SP, 2015.....	71
Tabela 12	Locais de coletas das amostras dos frutos, identificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., e variedades amostradas.....	82
Tabela 13	Relação de <i>primers</i> utilizados, suas respectivas <i>Primers</i> utilizados, suas respectivas sequências, temperaturas de amplificação e número de fragmentos observados nos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. provenientes de frutos de goiaba.....	87
Tabela 14	Escala de notas referentes à coloração de colônias, do bordo e do reverso, e determinação quanto à possível presença de pontos no reverso e setores.....	88
Tabela 15	Fungicidas avaliados no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp., e seus nomes comerciais, grupos químicos e concentração de ingrediente ativo.....	90
Tabela 16	Classificação dos 27 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtidos de frutos de goiaba com sintomas de antracnose, quanto à cor da colônia, cor do bordo, cor do reverso, presença ou ausência de setores e a patogenicidade média, em meio BDA, a 25 °C, sob luz contínua.....	97
Tabela 17	Diâmetro médio das colônias (em mm) de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> após 6 dias de incubação em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA acrescido de fungicidas em diferentes concentrações (mg/L).....	101

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ciclo geral das doenças causadas por <i>Colletotrichum</i> spp, em diversos hospedeiros. Adaptado de Agrios 2005.....	6
Figura 2	Representação pelo agrupamento UPGMA, similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard de diferentes <i>Colletotrichum</i> spp.....	34
Figura 3	Coeficiente de variação (%) obtido pela análise bootstrap (10.000x) utilizando software Dboot (COELHO 2001) dos fragmentos utilizando marcadores ISSR para 21 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> provenientes de mamão.....	35
Figura 4	Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores, índice de velocidade de crescimento, diâmetro de colônias após sete dias de cultivo.....	39
Figura 5	Biplote mostrando a projeção das variáveis: Cor da colônia (C_C), cor do reverso (C_R), cor do bordo (C_B), presença de setores (S), Diâmetro da colônia (DC), Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e patogenicidade (P) nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com distribuição dos 21 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	40
Figura 6	Representação das escalas de nota, A – representa nota 0 (frutos sem sintomas); B – representa nota 1 (lesão superficial, diâmetro inferior a 2 cm restrita ao ponto de inoculação); C – nota 2 (lesão em expansão, ainda superficial, início de amolecimento dos tecidos, sem trincas, ausência de esporulação abundante visível); D - 3 (lesões extensivas, maior que 2 cm de diâmetro, presença de trincas, tecidos deprimidos, visível presença de conídios, tecidos encharcados); E –nota 4 (lesão deprimida, escura a acinzentada, mais que 3 cm de diâmetro, deprimidas, esporulação presente, facilmente visível a olho nú).....	57
Figura 7	Padrão de bandas do produto de PCR com primer específico CgInt/ITS4. PM: 100 pb “DNA Ladder Plus” (Fermentas). Números de 1 a 13 correspondem a isolados identificados como <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e o número 14, referente a isolado padrão, classificado como <i>C. gloeosporioides</i> mediante sequenciamento da região ITS1-	61

	5.8S-ITS2. C: “mix” livre de DNA.....	
Figura 8	Vista parcial da diversidade dos isolados de manga quanto aos aspectos relativos a cor de colônias. Cor da colônia: A - branca, B - cinza, C - branca/cinza, D - branca/salmão e E cinza/preto. Cor do reverso: F - branco, G - Cinza, H - Preto, I - Branco/cinza, J - branco/preto, K - Cinza esverdeado, L - cinza/preto, M - branco/preto/castanho, N - branco/cinza/preto, O - reverso com pontuações escura.....	62
Figura 9	Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de pontuações escuras no reverso, presença ou ausência de setores e comportamento patogênico dos isolados.....	66
Figura 10	Biplot com representação da projeção das variáveis: Cor da colônia (C_C), cor do reverso (C_R), cor do bordo (C_B), presença de pontuações no reverso (P_R), presença de setores (S) e patogenicidade (P), nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com a discriminação dos 52 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , Jaboticabal/SP.....	69
Figura 11	Representação gráfica, ajuste das equações de regressão e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) da variável diâmetro da colônia, submetidas a cinco concentrações dos fungicidas <i>Bacillus subtilis</i> , Azoxystrobina e Tebuconazole.....	73
Figura 12	Microrregiões correspondentes aos municípios onde foram coletadas amostras de frutos de goiaba para isolamento de <i>Colletotrichum</i> spp.....	83
Figura 13	Vista parcial de fruto de goiaba da variedade Pedro Sato indicação do ponto de fermento e inoculação de <i>Colletotrichum</i> spp. (A). Notas atribuídas: A (nota zero, ausência de sintomas); B (nota 1) C (nota 2) e D (notas 3 e 4, respectivamente com lesões maiores que 3 cm de diâmetro e lesões encharcadas e escuras resultantes da elevada esporulação do patógeno).....	89
Figura 14	Dendrograma dos 27 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> obtido pelo agrupamento UPGMA, utilizando coeficiente de Jaccard.....	93
Figura 15	Coefficiente de variação (%) obtido pela análise bootstraps (10.000x) utilizando software Dboot (COELHO, 2001) dos fragmentos utilizando marcadores ISSR para 27 isolados de	95

	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> provenientes de vários municípios do estado de São Paulo.....	
Figura 16	Fotos evidenciando a diversidade dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de goiaba quanto a cor do reverso.....	96
Figura 17	Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores e patogenicidade.....	98
Figura 18	Biplote mostrando a projeção das variáveis (C_C), cor do reverso (C_R), cor do bordo (C_B) e patogenicidade nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com distribuição dos 27 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	99
Figura 19	Representação gráfica, ajuste das equações de regressão e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) da variável diâmetro da colônia, submetidas a cinco concentrações dos fungicidas <i>Bacillus subtilis</i> , azoxystrobina e tebuconazole.....	103

**CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE  
*COLLETOTRICHUM* spp. ASSOCIADOS A ANTRACNOSE EM MANGA, MAMÃO  
E GOIABA**

**RESUMO** – O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com mais de 40 milhões de toneladas anuais, e uma área plantada em torno de três milhões de hectares. Entretanto, esse setor resente-se de problemas complexos, de natureza diversa, como os de ordem fitossanitária, dentre eles, destaca-se a antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*. As perdas resultantes desta doença dão-se em pré e pós-colheita, podendo chegar a 90% de prejuízo dependendo das condições ambientais e do manejo adotado. Nas frutíferas tropicais o *Colletotrichum gloeosporioides* é descrito com maior frequência, como agente causal da antracnose, porém estudos recentes demonstram que nem sempre apenas essa espécie é a responsável pela doença. De um modo geral, os patógenos descritos em associação com o complexo de sintomas de antracnose em frutas são classificados *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*. Estudos recentes demonstram que nem sempre os critérios adotados para a classificação da espécie do patógeno associado aos sintomas são os adequados. Com isso, para maior precisão e clareza é fundamental o estudo completo desses patógenos, envolvendo análises simultâneas das características morfo-culturais e moleculares.

**Palavras-chave:** *Mangifera indica*, *Carica papaya*, *Psidium guajava*, *Colletotrichum gloeosporioides*, marcadores ISSR.

**MORPHOCULTURAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
*COLLETOTRICHUM* spp. ASSOCIATED WITH ANTHRACNOSE IN MANGO,  
PAPAYA AND GUAVA**

**ABSTRACT** – Brazil ranks third among the largest fruit producers in the world with more than 40 million tons per year and a planted area of about three million hectares. However, this sector has complex problems of different nature, such as plant diseases and among them, anthracnose. This disease is caused by fungi of the *Colletotrichum* genus. Losses resulting from this disease happen pre- and post-harvest, reaching 90% of damage depending on environmental conditions and management adopted. *Colletotrichum gloeosporioides* is described most often as the causal agent of anthracnose in tropical fruits; however, recent studies have shown that this is not always the case. In general, the pathogens described in connection with the complex symptoms of anthracnose in fruits are classified either as *Colletotrichum gloeosporioides* or *Colletotrichum acutatum*. But, recent studies have shown that the criteria adopted to classify the pathogen species associated with the symptoms are not always the most appropriate. Thus, simultaneous analysis of morphocultural and molecular characteristics are necessary to classify these pathogen species more accurately.

**Keywords:** *Mangifera indica*, *Carica papaya*, *Psidium guajava*, *Colletotrichum gloeosporioides*, ISSR markers.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas, superado apenas pela China e Índia, sendo responsável por mais de 40 milhões de toneladas produzidas. Porém, a quantidade de frutas exportadas ainda é pequena no contexto internacional. (ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2015), mas de importância na economia interna.

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO (2015) contabiliza os dados de manga (*Mangifera indica* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) em conjunto, considerando o Brasil o oitavo maior produtor dessas frutas. Entretanto, a manga tem uma importância maior no cenário econômico brasileiro, por ser a terceira fruta mais exportada do país. A goiaba ocupa o 16º lugar. O Brasil é o segundo maior produtor de mamão do mundo com mais de 1 milhão de toneladas produzidas por ano, atrás somente da China que produz mais de 5 milhões de toneladas. Dentre as frutas exportadas pelo país, o mamão está em 9º lugar.

A produtividade e a exportação pouco significativa é agravada pelos problemas de ordem fitossanitária que, dentre as doenças, destacam-se os fungos do gênero *Colletotrichum*, fitopatógenos esses importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esses fungos são os causadores de uma diversidade de doenças como antracnose, podridão de pedúnculo, varicela em manga, abacate e mamão (BAILEY; JEGER, 1992).

A antracnose é uma doença endêmica em diversas regiões de clima tropical úmido e subtropical das três Américas (FEICHTENBERGER et al., 2005). Os sintomas nos frutos variam de acordo com a espécie, mas, de maneira geral, iniciam-se por pequenas pontuações de coloração marrom a preta, com formato circular, evoluem para manchas necróticas de coloração escura, com bordos definidos e formato irregular, seguidas de podridão de frutos, com formação de massa alaranjada que contêm os esporos do fungo (FERRARI et al., 2011).

A antracnose é considerada uma das doenças mais frequentes e responsáveis pelos maiores prejuízos em áreas produtoras tanto de manga, quanto de mamão e goiaba. Frequentemente há a necessidade, em certas ocasiões, de tratamento pós-colheita. Alta severidade da antracnose ocorre em locais ou épocas onde há frequência de chuvas e predominância de alta umidade relativa (EMBRAPA 2010).

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

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

## **1.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.2.1. Antracnose**

A antracnose é causada principalmente pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. que tem como teleomorfo (fase sexuada) *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. et Schrenk. Essa doença ocorre com maior incidência em pomares fechados, com pouca entrada de luz e alta umidade, cujos sintomas

podem aparecer nas fases de florescimento, maturação e pós-colheita. É considerada a mais importante doença de pós-colheita das frutíferas tropicais, causando prejuízos que variam em função do grau de suscetibilidade da planta hospedeira e das condições ambientais, sendo temperaturas amenas e alta umidade, os fatores mais favoráveis ao patógeno (SERRA et al, 2011)

*Colletotrichum gloeosporioides* é um patógeno polífago, com um amplo círculo de hospedeiros, capaz de atacar diversas espécies das famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Leguminosae, Malvaceae, Solanaceae, Rosaceae, entre outras (BRASIL 2015). O sintoma típico da doença são manchas marrom-escuras, coalescentes, que formam lesões irregulares nas folhas e provocam a queda de flores e frutos jovens e a podridão de frutos maduros, comprometendo a qualidade dos frutos e assim depreciando o produto para o comércio.

Segundo o Ministerio da Agricultura (BRASIL, 2015), a antracnose é uma doença cosmopolita, ocorrendo em todas as áreas produtoras de manga, mamão e goiaba, sendo mais importante em regiões com alta umidade e regime chuvoso prolongado, comum em frutíferas em toda a América do Sul, América Central e sul dos Estados Unidos da América, Austrália, Filipinas e Índia. Há, também, registros da doença na África do Sul e Taiwan. No Brasil, está disseminada por todo o seu território.

A infecção dos frutos recém-formados conduz à queda prematura, enquanto que as maiores perdas ocorrem na pós-colheita nos frutos em amadurecimento. Os órgãos mais afetados são os frutos, podendo ser infectados em qualquer fase do desenvolvimento, mas os sintomas são mais severos nos frutos maduros ou em amadurecimento. As lesões aparecem como manchas deprimidas, arredondadas, tornando-se irregulares, marrom-escuras ou negras. Além do progresso externo da lesão sobre a casca, também progride para o interior da polpa. Com o avanço da doença, as áreas necróticas podem aparecer cobertas pelo micélio do fungo, seguido da formação de massas de esporos, cujas áreas tornam-se alaranjadas a rosáceas (FERRARI et al., 2011).

*Colletotrichum gloeosporioides* sobrevive de um período favorável para outro, em ramos secos, em lesões, antigas ou recentes, em frutos e em partes afetadas,

remanescentes no chão, sobre os quais esporula quando há calor e umidade. Nas plantas, a disseminação dos conídios ocorre pelos respingos da água da chuva, orvalho ou da irrigação, quando sobre as plantas. O patógeno é disseminado a longa distância de órgãos de propagação vegetativa ou reprodutiva infectados, frutos infectados, etc (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA 2014).

Alta umidade e temperaturas noturnas, de 20 a 24°C, adubações inadequadas, ataque de pragas, períodos chuvosos prolongados que propiciam a permanência de uma lâmina de água livre sobre os tecidos suscetíveis, e temperaturas amenas (26°C), são condições que favorecem o desenvolvimento da doença. Não há referências sobre cultivares ou variedades de goiaba e mamão resistentes a *C. gloeosporioides*. Algumas cultivares de manga possuem uma certa resistência à antracnose, porém não são exploradas comercialmente (BRASIL 2015).

Como método de controle recomenda-se pulverizações com fungicidas protetores antes do desenvolvimento dos frutos, para reduzir o potencial de inóculo dentro do pomar. O número de produtos registrados para culturas é restrito. O tratamento de pós-colheita compreende a aplicação de fungicidas protetores, com destaque para os fungicidas cúpricos, os de maior aceitabilidade (SOUZA, 2011), embora haja muita semelhança entre as formulações (JOHNSON; HOFMAN, 2009). Geralmente, os fungicidas cúpricos, por serem de contato e facilmente laváveis, não são muito eficazes, a menos que aplicados com outros fungicidas, como os ditiocarbamatos (RIBEIRO, 2005; PLOETZ, 2010). No entanto, o emprego do mancozeb, do grupo dos ditiocarbamatos, não é aceito em alguns países, como por exemplo, nos Estados Unidos (AKEM, 2006; PLOETZ, 2010).

#### **1.2.1.1. Etiologia e sintomatologia**

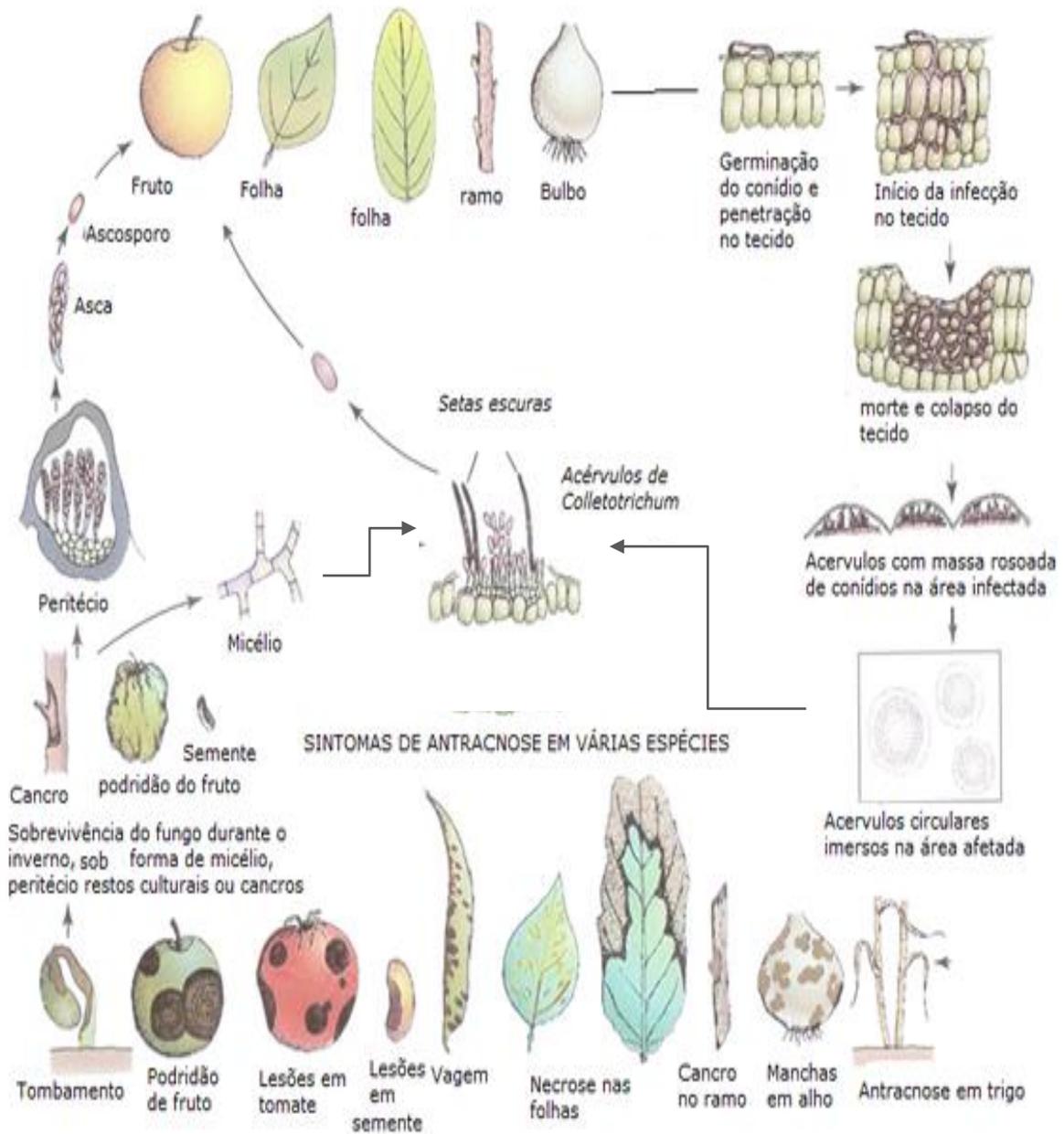
O agente causal da antracnose em goiaba e em manga foi descrito primeiramente como uma estirpe virulenta de *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc., a qual tem como teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. et Schrenk.

O fungo *C. gloeosporioides*, pertencente à ordem Melanconiales, produz acérvulos subepidérmicos, dispostos em círculos, dos quais são liberados os

conídios através de uma mucilagem de coloração alaranjada (ARAUZ, 2000; RIBEIRO, 2005) (Figura 1). Os conídios são hialinos e gutulados, uninucleados, com 12-19 µm de comprimento, por 1,0-6,0 µm de largura, arredondados nas extremidades e levemente curvos (RIBEIRO, 2005). Já o teleomorfo *G. cingulata*, possui peritécios rostrados, subesféricos e agrupados num estroma, ou bem separados. 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 (RIBEIRO, 2005).

A produção de ascósporos de *G. cingulata* foi detectada em restos culturais sobre o solo, em 1976 (GORDILLO; HERNÁNDEZ, 1980). Entretanto, o papel do estágio sexual no ciclo da doença mostra-se ainda desconhecido (FITZELL; PEAK, 1984; ARAUZ, 2000). Os conídios, por outro lado, constituem-se na fonte primária de inóculo, e são formados abundantemente na copa das plantas (FITZELL; PEAK, 1984) que, no caso da manga, são formados tanto em lesões existentes em folhas, ramos, panículas, como em frutos (RIBEIRO, 2005; ARAUZ, 2000)

As espécies mais comumente associadas à antracnose em frutíferas são *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, as quais encontram-se amplamente disseminadas em todo o mundo, e possuem extensa gama de hospedeiros. O fungo *C. gloeosporioides* já foi relatado em mais de 470 gêneros de hospedeiros (DODD et al., 1991; CANNON et al., 2008); por sua vez, *C. acutatum* foi relatado em mais de 34 gêneros de plantas (WALKER et al., 1991).



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

Os métodos convencionais para a identificação de espécies de *Colletotrichum* têm se baseado principalmente em diferenças morfológicas, como cor da colônia, tamanho e forma dos conídios, temperatura ótima e taxa de crescimento *in vitro* e presença ou ausência de setas nos acérvulos (SMITH; BLACK, 1990; GUNNELL; GUBLER, 1992; SUTTON, 1992). No entanto, devido às influências ambientais sobre a estabilidade das características morfológicas, e a existência de formas

intermediárias, tais critérios, na maioria das situações, mostram-se insuficientes para uma diferenciação confiável das espécies de *Colletotrichum* (FREEMAN et al., 1998). Em função disso, técnicas moleculares associadas às características morfológicas e biológicas vêm sendo empregadas com sucesso, possibilitando a caracterização adequada de grande número de espécies fúngicas (FREEMANN et al., 1998; LOPEZ, 2001; TOZZE JÚNIOR et al., 2007; ANDRADE, 2007).

De um modo geral, os sintomas de antracnose são caracterizados por manchas necróticas, queima e queda de flores, podridão e queda de frutos, cancro e secamento de ramos (BRASIL, 2014). As manchas são necróticas, de coloração escura, com bordos definidos e formato irregular nas folhas. Nos ramos, as manchas são escuras, às vezes deprimidas, podendo causar seca dos ramos e dos ponteiros. Nas flores ocorre seca ou abscisão e, quando infectadas através do botão floral, poderá afetar o desenvolvimento do fruto, causando a sua queda prematura e/ou o seu apodrecimento. Os sintomas nos frutos variam de acordo com a espécie, mas, de maneira geral, iniciam-se por pequenas pontuações de coloração marrom a preta, com formato circular, onde frequentemente são observados círculos concêntricos, com massas alaranjadas que contêm os esporos do fungo. As lesões evoluem e atingem parte do fruto ou necrosando-o completamente. As necroses ultrapassam a casca e alcançam a polpa do fruto. Uma vez dentro do fruto, o fungo causa escurecimento da polpa (FERRARI et al., 2011).

#### **1.2.1.2. Epidemiologia**

Os fungos da espécie *Colletotrichum* infectam os frutos em diferentes estádios fenológicos, podendo permanecer quiescentes, dessa forma assintomáticos até a maturação (SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

A sobrevivência de *Colletotrichum* spp. dá-se, via de regra, por meio de apressório, formado sobre o tecido maduro de folhas e ramos, ou mantendo-se na forma de infecção quiescente; endofiticamente, em tecidos vegetais (AGOSTINI et al., 1992; AGOSTINI; TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994); em hospedeiros alternativos (FREEMAN et al., 2000; HOROWITZ et al., 2002); e no ambiente (NORMAN; STRANDBERG, 1997; FREEMAN et al. 2002). Os conídios, por outro lado, constituem-se na fonte primária de inóculo, e são formados abundantemente

na copa das plantas (FITZELL; PEAK, 1984), tanto em lesões existentes em folhas, ramos, panículas, como em frutos (RIBEIRO, 2005; ARAUZ, 2000).

Sobre tecido das plantas, o apressório de *Colletotrichum* spp. germina emitindo uma hifa, da qual, posteriormente, são formados os conídios iniciais, sem a formação de acérvulos. Conforme vão surgindo novos tecidos, os conídios livres, na superfície das folhas, são dispersos por respingos de água. A penetração do fungo ocorre diretamente, sem a formação de apressório, porém com subsequente formação de acérvulos. Nessas estruturas são formados grande número de novos conídios, seguido, posteriormente, da sua dispersão por respingos de chuva e vento (TIMMER et al., 1994).

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

Quanto à temperatura, essa não se constitui em fator limitante à produção de infecções, porém, *in vitro*, a faixa ótima para o crescimento de *C. gloeosporioides* ocorre entre 25 e 30°C (SUTTON, 1992; MAIA et al., 2011) e para *C. acutatum* ocorre entre 23 e 27°C (AGOSTINI et al., 1992; GOES, 1995; PERES, 1998). Porém, mesmo em temperaturas inferiores a 15°C, o fungo apresenta bom desenvolvimento vegetativo. Em condições de campo, temperaturas baixas reduzem a incidência do fungo, porém, pode haver uma ampliação do período crítico de suscetibilidade, já que o desenvolvimento dos tecidos suscetíveis dá-se mais lentamente, estendendo o seu período de exposição (TIMMER; ZITKO, 1993; TIMMER et al., 1994).

### **1.2.2. Controle da doença**

O *Colletotrichum* spp. pode infectar frutos de manga, mamão e goiaba, fisiologicamente imaturos e permanecer no estado quiescente até o fruto atingir a fase climatérica (DICKMAN; ALVAREZ, 1983), quando então, em pomares comerciais, o fruto já foi colhido. Assim, a infecção que ocorreu no campo dificilmente é detectada até a colheita, pois os sintomas da antracnose normalmente

surgem durante ou após o transporte dos frutos para os mercados consumidores (TATAGIBA et al., 2002).

Os primeiros produtos químicos utilizados no controle da doença foram o captafol e os benzimidazóis (DENHAM; WALLER 1981). Dentre esses, o maior destaque foi para o ingrediente ativo Captan, suspenso por volta dos anos 80, e o benomyl, cuja fabricação e uso foram suspensos alguns anos depois, entre outros fungicidas foram proibidos pela U.S. Environmental Protection Agency (ROSWALKA et al., 2010), em função do relatório elaborado pela National Academy Sciences, em 1987, sobre o risco a saúde humana associados ao uso de fungicidas (WISNIEWSKI; WILSON, 1992). A União Europeia vem retirando do mercado grande parte dos ingredientes ativos dos produtos agroquímicos registrados para frutas mediante trabalho realizado desde a década de 1990 (BUAINAIN; BATALHA, 2007). A ANVISA e o IBAMA vêm demonstrando resultados positivos para carcinogenicidade desses produtos (ANVISA, 2002).

Atualmente, para controle da antracnose encontram-se registrados vários fungicidas específicos, incluindo os pertencentes aos grupos químicos benzimidazóis, ditiocarbamatos, imidazolilcarboxiamida e formulações comerciais contendo as misturas de estrobilurinas e triazóis (BRASIL, 2014).

Tão importante quanto a natureza e tipo dos fungicidas, o controle dos patógenos deve ser realizado mediante aplicações de fungicidas de forma preventiva, a partir do pré-florescimento (BRASIL, 2014).

No Brasil, o controle do patógeno baseia-se no uso de fungicidas de contato ou sistêmicos (FERRAZ, 2010; SOUZA, 2011). No Estado de São Paulo, em determinados anos, especialmente com primavera e verão muito chuvosos, foi relatado no cultivo de manga e goiaba mais de vinte pulverizações por ciclo. Considerando que nos últimos dez anos o controle do patógeno vinha sendo alcançado com sucesso, suspeita-se que, dada à pressão de seleção exercida pelo intenso uso de fungicidas, possa ter havido seleção de linhagens do patógeno resistentes aos principais ingredientes ativos (SOUZA, 2011). Além da dificuldade no controle do patógeno, os diferentes níveis de patogenicidade observados em condições controladas são fatores relevantes. Tal aspecto induz a se pressupor a

possível existência de grupos de especialização patogênica (LIMA FILHO et al., 2003).

### **1.2.3. Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum* spp.**

A pouco tempo atrás, a identificação das espécies de *Colletotrichum*, assim como vários outros gêneros de fungos baseava-se na ontogênese, morfologia, aspectos ecológicos e faixa de hospedeiros (SUTTON, 1992; TEBEEST et al., 1997; PHOTITA et al., 2005; THAUNG, 2008). Porém, tem-se verificado que a caracterização baseada exclusivamente nesses critérios, nem sempre oferece a confiabilidade necessária, devido às grandes diversidades morfológicas e fenotípicas resultantes de influências ambientais (HYDE et al., 2009), além dos aspectos filogenéticos de alguns patógenos (TAYLOR, 1995). Ao longo dos anos e pelas dificuldades apontadas, técnicas mais modernas e seguras têm sido utilizadas, com destaque às moleculares (PERES et al., 2002; DU et al., 2005; PHOTITA et al., 2005; ABANG et al., 2006; WHITELAW-WECKERT et al., 2007; THAN et al., 2008; KIM et al., 2009; NGUYEN et al., 2010).

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

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

Em vários estudos relacionados à sistemática molecular e filogenia de fungos, o cístron que codifica o DNA ribossomal (rDNA) tem sido utilizado com sucesso. A região ITS (“Internal Transcribed Spacer”) e os espaços intergênicos de unidades

repetidas do rDNA nuclear variam entre espécies do mesmo gênero, ou entre populações (WHITE et al., 1990).

A comparação de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero levaram ao desenvolvimento de primers táxon-específicos para a diferenciação entre espécies do gênero *Colletotrichum* por PCR (reação em cadeia da polimerase) (MILLS et al., 1992). Esses primers têm sido utilizados para a confirmação da identidade de isolados patogênicos a diversas espécies hospedeiras (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003; TOZZE JUNIOR, 2007; WACULICZ-ANDRADE, 2007; PILEGGI et al., 2009, SOUZA et al., 2013).

A “Inter Simple Sequence Repeat” (ISSR) é uma técnica que se baseia em microssatélites, sendo uma alternativa para o estudo de polimorfismos, por meio dos genomas. O marcador molecular ISSR tem se mostrado muito eficiente em análises da diversidade genética, na caracterização de acessos e de cultivares de diversas espécies de plantas (CHARTERS; WILKINSON, 2000; ISSHIKI et al., 2008) e nos estudos de diversidade genética de microrganismos, principalmente com *Colletotrichum* spp. (RAMPERSAD, 2013; SHARMA; KATOCH, 2014; MAHMODI et al., 2014). Esse marcador, por ser multiloco, não necessita de conhecimento prévio do DNA a ser avaliado (GUPTA et al., 1994). Além disso, é uma técnica de baixo custo, fácil uso e de grande reprodutibilidade (MATTHEWS et al., 1999).

Os marcadores ISSR são amplificados por meio de PCR e não requerem o sequenciamento da região, resultando ainda na obtenção de padrões altamente polimórficos (NAGAOKA; OGIHARA, 1997). São dominantes, e podem gerar um grande número de alelos reproduzíveis e altamente polimórficos. No trabalho realizado por Nghia et al. (2008), nos estudos de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de plantios de seringueira (*Hevea brasiliensis*), na Malásia, além de marcadores ISSR, foram também utilizados outros caracteres como morfologia de colônia e dos conídios. Nesse trabalho, os autores concluíram que apenas os caracteres morfológicos não foram suficientes para diferenciar os isolados. Entretanto, no estudo da variabilidade dos fungos, apenas mediante o emprego

desse marcador foi verificada a viabilidade nos estudos de caracterização necessários, o que, obviamente, tornou-se possível credenciá-lo como técnica alternativa, isoladamente ou em conjunto com outras ferramentas.

Para mensurar a acurácia das estimativas das similaridades genéticas obtidas a partir de marcadores é aplicado o procedimento de “bootstrap” (COELHO, 2001). O método bootstrap vem se destacando, pois, além de fornecer estimativas de parâmetros e seus desvios-padrão, permite obter intervalos de confiança para os parâmetros analisados, bem como a distribuição empírica de suas estimativas (EFRON; TIBISHIRANI, 1993; MANLY, 1997).

### 1.3. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2015. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2010. 129 p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Memória de Reunião – Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo CAPTAN e FOLPET Data da Reunião: 27 de agosto de 2002. Reavaliação estabelecida pela RDC ANVISA N° 135, de 17 de maio de 2002.

ARAUZ, L. F. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated and management. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.6, p.600-611, 2000.

AKEM, C. N. Mango anthracnose disease: present status and future research priorities. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v.5, n.3, p.266-273, 2006.

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

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Oxford: British Society for **Plant Pathology**, 1992. 388p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. AGROFIT. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 27 jun. 2015.

BUAINAIN, A. M. e BATALHA, M. O. *Cadeia produtiva de frutas*. Brasília: IICA: MAPA/SPA, v. 7, 2007. 105 p.

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

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

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

COELHO, A.S.G. dBood: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap: versão 3.01. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001.

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

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

DICKMAN, M.B. & ALVAREZ, A.M. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease** v.67:748-750. 1983.

DODD, J. C.; ESTRADA, A. B.; MATCHAM, J.; JEFFRIES, P.; JEGER, M. J. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. **Plant Pathology**, Oxford, v.40, p.568-575, 1991.

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

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R.J. An introduction to the bootstrap. New York: Chapman & Hall, 1993. 436p.

EMBRAPA - Cultivo da Mangueira Embrapa Semiárido Sistemas de Produção, 2 - 2ª edição Versão Eletrônica, 2010.

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

FAO. **Food and Agricultural Organization**. Review of recent world market situation for mangoes, mangosteens, guavas and tropical fruits. 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 17 maio. 2015.

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

FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R.J.; TÖFOLI, J.G.; NOGUEIRA, E.M.C. **Antracnose associada às fruteiras. 2011**. Artigo em Hypertexto. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2011\\_4/antracnose/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/antracnose/index.htm). Acesso em: 10/7/2015.

FERRAZ, D. M. M. Controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em pós-colheita da goiaba (*Psidium guajava*), produzida em sistema de cultivo convencional e orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotermia e cloreto de cálcio. 103 f. Mestrado (Dissertação). Universidade de Brasília, 2010.

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

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

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

FITZELL, R. D.; PEAK, C. M. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. **Annals of Applied Biology**, London, v.104, p.53-59, 1984.

GOES, A. **Queda prematura dos frutos cítricos: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. [Sensu Arx, 1957], e controle da doença.** 1995.143 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

GORDILLO, L. & HERNÁNDEZ, E. Forma sexual y medios de cultivo para *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno del mango en Cuba. **Ciencias de la Agricultura**, La Habana, v.7, p.11-17, 1980.

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

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

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

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

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

JOHNSON, G. I. & HOFMAN, P. J. Postharvest Technology and Quarantine Treatments. In: LITZ, R.E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. 2ed. Wallingford: CAB International, 2009. cap.15, p.529-605.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. **Principais doenças de Anonáceas no Brasil: descrição e controle.** Rev. Bras. Frutic. [online]. vol.36, n.spe1, pp. 55-64. 2014.

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

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

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.28, n.6, p.620-625, 2003.

LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 291-338, 2001.

MAHMUDI, F.; KADIR, J. B.; PUTEH, A.; POURDAD, S. S.; NASEHI, A.; SOLEIMANI, N. Genetic Diversity and Differentiation of *Colletotrichum* spp. Isolates Associated with Leguminosae Using Multigene Loci, RAPD and ISSR. **Plant Pathol J.** 30(1): 10-24, 2014. doi: 10.5423/PPJ.OA.05.2013.0054.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCAN W. L. A.; MAIA, J. B.; ABREU, M. S. Effect of temperature on mycelial growth, production and germination *colletotrichum* spp. isolated from mango with symptoms of anthracnose. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 27, n. 2, p. 205-210, Mar./Apr. 2011.

MANLY, B.F.J. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. 2. ed. New York: Chapman & Hall, 399p. 1997.

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

MILLS, K. J., BOCCINO, S. B., BURNS, D. J., LOOMIS, C. R.; SMART, R. C. Alterations in protein kinase C isozymes  $\alpha$  and  $\beta$ II in activated Haras containing papillomas in the absence of an increase in diacylglycerol. **Carcinogenesis** 13, 1113-1120, 1992.

MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. from Japan. **Mycoscience**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 47-53, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

PLOETZ, R. C. **Anthracnose of mango: Management of the most important pre-and post-harvest disease.** 2010. Disponível em: [http://www.mango.org/media/55703/anthracnose\\_of\\_mango.pdf](http://www.mango.org/media/55703/anthracnose_of_mango.pdf). Acesso em: 10 jul. 2015.

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

RAMBERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology** 103:182-189, 2013.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas.** 4ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap.52, p.457-465.

ROZWALKA, L.C., ALVES, E., AMARAL, D.C. Ultrastructural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. **Interciencia**, Caracas, v.35, p.912-915. 2010.

SERRA, I.M.R.S.; COELHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.; MONTARROYOS, A.V.V. & SILVA, D.S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, Botucatu SP. v.37, n.1, p.42-51, 2011.

SHARMA, P. N.; KATOCH, A. Population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* associated with capsicum anthracnose in North Western Himalayas and evaluation for disease resistance. **Journal of Mycology and Plant Pathology** Vol. 44 No. 4 pp. 412-416, 2014.

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

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

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, v.33, 265-272, 2008.

SOUZA, A. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em mangueiras. 91 f. 2011. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

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

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

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

TATAGIBA, J.S., LIBERATO, J.R., ZAMBOLIM, L., VENTURA, J.A. & COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 27:186-192. 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WISNIEWSKI, M.E.; WILSON, C.L. Biological control of post-harvest disease of fruits and vegetables: Recent Advances. **HortScience** 27:94-98. 1992.

## **CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. DO MAMOEIRO**

**RESUMO:** O cultivo de mamão (*Carica papaya* L.) tem grande importância econômica nos países tropicais e subtropicais. O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais, porém resente-se de sérios problemas de ordem fitossanitária, especialmente devido infecções causadas pelo fungo *Colletotrichum* spp., causador da antracnose. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade morfo cultural e genética de 21 isolados de *Colletotrichum* spp. de mamoeiros provenientes de diferentes estados brasileiros. Para a identificação das espécies foram utilizados os primers táxon-específicos para *C. gloeosporioides*, CgInt/ITS4, e o primer Calnt2/ITS4, específico para *C. acutatum*. Para o estudo de diversidade genética foram utilizados onze marcadores moleculares *Inter simple sequence repeat* (ISSR), enquanto para a caracterização morfo cultural foram feitas as avaliações do índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro da colônia e coloração das colônias e patogenicidade. Dos 21 isolados avaliados 19 foram identificados como *C. gloeosporioides* e outros dois como *C. acutatum*. Por meio de marcadores ISSR foi verificada grande diversidade genética entre os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, principalmente quando oriundos de diferentes localidades, porém, contrariamente, a similaridade entre os isolados de uma mesma região foi maior. Em termos morfo culturais foi verificado elevado polimorfismo, onde os isolados Linhares-1 e Linhares-2 se destacaram, por apresentarem características singulares quando comparados com os demais isolados. Concluiu-se quanto a uma elevada diversidade genética entre os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* oriundo de diferentes localidades, além de uma grande variabilidade morfo cultural entre esses isolados avaliados.

**Palavras-chave:** *Inter simple sequence repeat*, *Carica papaya*, *Colletotrichum acutatum*; *Colletotrichum gloeosporioides*

## 2.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, sendo o segundo na produção de mamão (*Carica papaya* L.), respondendo por aproximadamente 12,5% da produção mundial. No ano de 2012 foi produzido mais 1,5 milhão de toneladas (FAO 2015). Nos últimos anos, esse setor ressentiu-se de problemas complexos, de natureza diversa, com particular enfoque para os de ordem fitossanitária. Nesse contexto, destaca-se a antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, cujos prejuízos podem alcançar até 90% (TATAGIBA et al., 2002).

Os prejuízos resultantes da antracnose dão-se em pré e pós-colheita. De modo geral, os patógenos associados ao complexo de sintomas de antracnose em mamão são classificados como *Colletotrichum gloeosporioides*. Entretanto, estudos recentes demonstraram que nem sempre essa espécie é a única envolvida (PRIHASTUTI et al., 2009; PHOULIVONG et al., 2010). No gênero *Colletotrichum* existem muitas espécies responsáveis por inúmeras doenças, em vários hospedeiros, cujos sintomas nem sempre são visíveis até o início da maturação dos frutos (PRUSKY 1996). Incluem-se dentre hospedeiros mais de 470 gêneros de plantas, nos quais coabitam como patógenos ou endófitos (LU et al., 2004. CANNON et al., 2008). E como o comportamento epidemiológico das espécies de fungos, assim como os métodos de controle dos mesmos podem ser variáveis, a identificação das espécies prevalentes faz-se imprescindível (TORRES-CALZADA et al., 2013). Além disso, a determinação precisa das espécies de *Colletotrichum* é fundamental para os programas de quarentena, para o melhoramento genético das plantas, e mesmo para o controle desses respectivos patógenos (FREEMAN et al., 1998; CAI et al., 2009).

As espécies mais comumente associadas à antracnose em frutíferas são *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, as quais encontram-se amplamente disseminadas em todo o mundo, e infectam uma ampla gama de culturas tropicais e subtropicais, como mamão (*Carica papaya*), manga (*Mangifera indica*), abacate (*Persea americana*), maracujá (*Passiflora edulis*) e banana (*Musa paradisiaca*) (ALAHAKOON; BROWN 1994; ABDUL WAHID, 2001; JOHNSTON et al., 2008; HYDE et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009), dentre outras. Nos últimos anos,

porém, tem havido muita divergência quanto à definição dos táxons associados aos sintomas de antracnose em diversos patossistemas, incluindo a interação *Carica-Colletotrichum* (PHOULIVONGE et al., 2010).

Há muitas espécies de fungos consideradas crípticas, tidas como um complexo, incluindo-se, dentre outras, *C. gloeosporioides* e *C. dematium* (SHIVAS; CAI, 2012). De acordo com Crous e Groenewald (2005), esse complexo pode ser estendido para praticamente todas as espécies de fungos fitopatogênicos. A importância das espécies crípticas reside na diversidade de sintomas, faixa de hospedeiros e distribuição geográfica.

A determinação dos agentes fitopatogênicos associados aos seus respectivos hospedeiros é essencial para o entendimento da epidemiologia do patógeno, para os programas de quarentena, no melhoramento genético das plantas e no controle das doenças em geral (FREEMAN et al., 1998; CAI et al., 2009). No caso da interação *Colletotrichum-Carica papaya*, por ser um patógeno limitante à produção das plantas (TATAGIBA et al, 2002), o controle do patógeno é imprescindível, tanto nas fases de pré, como em pós-colheita.

Importantes publicações relativas ao patossistema *Colletotrichum-Carica papaya* têm sido publicadas nos últimos anos, incluindo aspectos epidemiológicos (Vásquez-López et al., 2012), diversidade genética, filogenia, estruturas populacionais (ANDRADE et al., 2007, PHOULIVONG et al., 2010, RAMPERSAD 2011) e controle (CIA et al., 2007; BARRERA-NECHA et al., 2008; AL-ERYANI-RAQEEB et al., 2009). Todavia, dada a relevância do problema, e não obstante a grande contribuição das informações geradas, denota-se ainda deficiência quanto à necessidade de complementos quanto a informações relativas ao refinamento nas análises taxonômicas, o que certamente será fundamental para definição de estratégias de controle, dentre vários outros objetivos.

Métodos moleculares, baseados nas sequências do DNA, são indispensáveis, especialmente para as espécies consideradas crípticas (SHIVAS; CAI 2012). Em geral, para *Colletotrichum* spp., estudos dessa natureza vêm se tornando populares, já que os métodos baseados em análises morfológicas e culturais nem sempre têm se mostrado satisfatórios (FREEMAN et al., 1998). A técnica conhecida como *inter simple sequence repeat* (ISSR), destaca-se, por exemplo, como uma alternativa

para a caracterização de genomas complexos, o que permite a detecção de polimorfismos em regiões flanqueadas por DNA microssatélite, sem a necessidade de isolar e sequenciar fragmentos específicos de DNA (CANÇADO et al., 2012).

O marcador ISSR, por ser multiloco, não necessita de conhecimento prévio do DNA a ser avaliado. É uma técnica de alta reprodutibilidade, baixo custo e de fácil uso (SSERUMAGA et al., 2013). Pelo seu elevado polimorfismo, os marcadores ISSR têm-se mostrado muito eficientes em estudos de diversidade genética e para compreender as relações filogenéticas de fungos (SCHWARZENBACH et al., 2007).

Um aspecto importante nos estudos nos diversos patossistemas trata-se em se determinar a existência de estruturas genética entre os isolados de um determinado patógeno, oriundo de diversas regiões produtoras, assim como entre aqueles provenientes de nichos particulares e específicos, e seus possíveis níveis de divergência genética. O estudo relativo ao complexo de espécies é importante porque vai contribuir à compreensão da dinâmica populacional das mesmas, e também quanto a vários aspectos fisiológicos e fenotípicos. Estrutura genética e fluxo de genes influenciam a geração e distribuição de novos genótipos, que afetam o potencial evolutivo e adaptativo do patógeno sob mudança de pressões de seleção, e contribuem para a viabilidade populacional e sua sobrevivência (MENG et al., 2001; RAMPERSAD 2013).

Pressupõe-se que isolados provenientes de mamoeiros que nunca receberam aplicação de fungicidas podem apresentar características distintas em relação àqueles provenientes de áreas de produção intensiva em que obviamente, os tratamentos culturais são massivos. Os dados genéticos podem contribuir na quantificação da diversidade genética e, além disso, levar a resultados que podem contribuir e orientar os programas de melhoramento genético. As informações moleculares podem complementar as informações quanto aos aspectos morfo-culturais dos isolados, além de aferir, validar e possibilitar comparações quanto às espécies já descritas (GAIERO et al, 2011).

Até o momento, a literatura é, de certa forma, genérica e escassa acerca da diversidade genética entre isolados de *Colletotrichum* provenientes de mamoeiros do Brasil. Estudos dessa natureza restringem-se àqueles publicados por Peres et al. (2002) e Andrade (2007). Além de escassos, há divergências quanto às informações

ora publicadas (PHOULIVONG et al., 2010; TAPIA-TUSSELL et al., 2008), de tal forma que estudos dessa natureza, com abordagem molecular que simultaneamente contemple o estabelecimento de relações quanto aos aspectos morfo culturais fazem-se muito importantes. A identificação da espécie de *Colletotrichum* eventualmente presente nos tecidos sintomáticos é, também, um objetivo de suma importância e, assim, contemplado nesse estudo.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

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

Um total de 21 isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos de mamão „Formosa” e „Solo” (Sunrise Solo, Improved Sunrise Solo cv. 72/12' ou Tainung 1 ou 2) foram coletados nos municípios de Itápolis e Jaboticabal, SP, Maringá e Umuarama, PR, Linhares, ES e Teixeira de Freitas, BA, no ano de 2014 (Tabela 1). Tais frutos foram armazenados em caixas térmicas e levados para o Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, para isolamento do patógeno.

A maioria dos frutos coletados proveio de áreas produtoras, com emprego de todas as práticas culturais indicadas para a cultura, incluindo o uso de defensivos agrícolas. Porém, para o caso de Jaboticabal, os frutos provieram de propriedades familiares, sem exploração comercial e agronômica, e, portanto, sem uso de defensivos agrícolas, dentre outras práticas culturais indicadas

**Tabela 1.** Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. quanto a origem das amostras de frutos de mamão, número de isolados e variedade.

Origem	Número de Isolados	Variedade
Itápolis SP	8	Formosa
Jaboticabal SP	2	Solo
	2	Formosa
Linhares ES	1	Solo
	2	Formosa
Umuarama PR	2	Solo
Maringá PR	2	Solo
Teixeira de Freitas BA	1	Solo
	1	Formosa

Previamente ao isolamento do patógeno, os frutos colhidos foram mantidos em salas de laboratório, à temperatura ambiente, com fotoperíodo 12/12 horas, na qual, quando do aparecimento dos sintomas, foi realizado o isolamento do patógeno. Para tal, foram retirados fragmentos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> de tecido sintomático, os quais, após desinfestação superficial, lavagem em água estéril e secagem em papel de filtro, foram depositados em meio batata dextrose ágar (BDA) contidos em placas de Petri. Posteriormente, as placas de Petri foram armazenadas em estufas para B.O.D., a 25°C, e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias, foram selecionadas as colônias típicas de *Colletotrichum* spp., seguido de repicagem e, posteriormente, da identificação, tomando como referência aspectos culturais e morfofisiológicos (SUTTON, 1992). A partir de colônias típicas e puras do patógeno foram obtidas culturas monospóricas, seguido do seu armazenamento em óleo mineral. Tais isolados de *Colletotrichum* spp. foram utilizados nos estudos subsequentes.

### **2.2.2. Identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.**

Para a extração de DNA, discos de colônias dos isolados foram transferidos para frascos de vidro de 110 mL, contendo meio de cultivo líquido BD (batata-dextrose), mantidos por dez dias. Após esse procedimento, o micélio foi separado do meio de cultivo com o auxílio de peneiras, dispensando-se o meio restante. Posteriormente, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e seco em placas de Petri, mantido em temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. Depois de seco o micélio foi macerado em nitrogênio líquido, formando um pó seco, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

As extrações de DNA foram baseadas no protocolo de Kuramae-Izioka (1997). Para a avaliação da quantidade e da qualidade do DNA extraído foi utilizado um espectrofotômetro NanoDrop 100 (Uniscience), medindo a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação de absorbância entre esses dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, sendo considerado um DNA de boa qualidade valores no intervalo de 1,8 a 2,0 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O DNA extraído dos isolados de *Colletotrichum* spp. foi submetido a reação de PCR com onze primers ISSR (Tabela 2) e com dois primers específicos desenhados e desenvolvidos por Mills et al. (1992), para amplificação de uma banda exclusiva de cerca de 500 pb para Calnt2, específico para *C. acutatum*, e de aproximadamente 450 pb para Cglnt, específico para *C. gloeosporioides*, os quais foram utilizados em conjunto com o primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificação da região ITS (White et al., 1990). Como padrões de amplificação foram utilizados um isolado de *C. acutatum* e um isolado de *C. gloeosporioides*, provenientes de tecidos contendo sintomas típicos de antracnose, previamente identificados mediante sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, utilizando-se o par de primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990). O sequenciamento das amostras padrão foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microrganismos, do Departamento de Tecnologia, da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); dNTP"s (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 2,0 U de Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, primer 5 pmol, 80 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL. Para a amplificação com os primers as reações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf), sendo utilizado um ciclo a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, temperatura específica do primer por 1 minuto para amplificação e 72 °C por 1 minuto, e para finalizar 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese em solução tampão TEB 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,5 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb "DNA Ladder Plus" (Fermentas).

Os primers utilizados foram da marca Invitrogen Life Technologies. A escolha dos primers foi baseada em trabalhos realizados com espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, ou que apresentaram alto polimorfismo (GUPTA et al., 1994; RATANACHERDCHAI et al., 2010; RAMPERSAD 2013).

**Tabela 2.** Relação de *primers* utilizados, suas respectivas sequências, temperaturas de amplificação e número de fragmentos observados nos isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes de frutos de mamoeiros.

Primer	Sequencias (5" 3")	Temperatura de amplificação	Número de Fragmentos
Calnt2	GGGGAAGCCTCTCGCGG	64 °C	1
CgInt	GCCTCCCGCCTCCGGGCGG	54 °C	1
ISSR - P7	ACAACAACAACAACA	48 °C	08
ISSR - P8	AACAACAACAACAAC	48 °C	09
ISSR - P10	AAGAAGAAGAAGAAG	48 °C	07
ISSR - P12	GACAGACAGACAGACA	48 °C	10
ISSR - P14	GACACGACACGACAC	53,8 °C	14
ISSR - P20	CTGAGAGAGAGAGAGA	48 °C	12
ISSR - P22	GAGCAACAACAACAA	53,8 °C	09
ISSR - AF80820	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48 °C	08
ISSR - AF80821	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48 °C	10
ISSR - AF80822	GAGAGAGAGAGAGAGAT	41,7°C	07
ISSR - AF80824	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	48 °C	08

### 2.2.3. Caracterização morfofocultural de *Colletotrichum* sp.

Todos os isolados utilizados na identificação molecular foram previamente agrupados, tomando-se como referência a procedência. Em seguida, foram avaliados quanto ao aspecto e coloração das colônias. Para tal, discos de colônias, de 5 mm de diâmetro, foram extraídos das margens de culturas de sete dias, cultivadas em meio BDA, e transferidos para novas placas contendo o mesmo meio de cultivo. A seguir, tais culturas foram incubadas a 25°C, sob luz fluorescente contínua. Após dez dias de incubação, período em que as colônias alcançaram uniformemente as bordas das placas e atingiu a estabilização da sua coloração, procederam-se avaliações das mesmas, borda e reverso, sendo também avaliada a possível presença de setores. Para cada isolado foram utilizadas três repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri contendo os respectivos isolados. A partir das avaliações quanto à coloração das colônias, e possível presença de setores desenvolveu-se uma escala qualitativa de notas (Tabela 3).

Para o teste de patogenicidade, frutos sadios de mamão cv. Formosa foram submetidos ao método de desinfestação de acordo com Sanchez (1990). Os frutos

foram feridos superficialmente com uma agulha hipodérmica esterilizada. A inoculação deu-se mediante deposição de uma gota contendo  $1,5 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> sobre os ferimentos, na superfície dos frutos. A seguir, os frutos foram depositados em bandejas de plástico contendo isopor no fundo, mantendo-se uma lâmina de água sob o mesmo, seladas com filme plástico e mantidas em câmara fria a 25°C, com fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram feitas aos 2, 4 e 6 dias após a inoculação, sendo empregada a escala de notas apresentada na Tabela 3; a nota final da patogenicidade foi deferida no último dia de avaliação. Usou-se delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de um fruto inoculado em dois pontos. Como controle, frutos foram inoculados com água estéril.

**Tabela 3.** Escala de notas referentes à coloração de colônias, do bordo e do reverso, e determinação quanto à possível presença de setores.

Escala	C_C	C_B	C_R	S	P
0	-	-	-	-	Frutos sem sintomas.
1	Cinza	Branco	Branco	+	Formação de lesão pequena.
2	Branco	Cinza	Salmão /branco		Lesão superficial, diâmetro <3 cm.
3	Branco/Salmão	Salmão	Salmão/ preto		Lesão com diâmetro >3 cm, com áreas encharcadas
4	Salmão	Salmão/ branco	Salmão/ preto/ branco		Lesão extensivas, deprimidas e escuras, com esporulação abundante e visível
5	Salmão/preto	Salmão/ preto	Salmão/ branco /esverdeado		-
6	Salmão/ preto/ branco	Salmão/ preto/ branco	preto/esverdeado/ branco		-

C\_C: Coloração das colônias; C\_B: Coloração do bordo; C\_R: Coloração do reverso; S: Presença (+) ou ausência de setores (-); P: Patogenicidade.

Para a tomada do diâmetro das colônias, as avaliações foram realizadas diariamente, medindo-se o seu tamanho, em sentidos perpendiculares entre si, até que para algum isolado, a colônia tenha atingido o bordo da placa. A partir de tais dados foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), conforme Nechet (1999), empregando-se a fórmula usada por Oliveira (1991).

Em que:

$$IVCM = \sum(D - D_a) / N$$

IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia).

D: Diâmetro médio da colônia (cm);

D<sub>a</sub>: Diâmetro médio da colônia do dia anterior (cm);

N: Número de dias após a inoculação.

#### 2.2.4. Análise de dados

Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada primer, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética: presente (1) ou ausente (0). A matriz binária foi usada para a obtenção das estimativas de similaridades genéticas, com auxílio do programa XLSTAT (Addinsoft®, versão 2014), empregando-se o coeficiente de Jaccard. Para o agrupamento dos genótipos foi utilizado o método de médias não ponderadas das similaridades UPGMA (Umweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average). O coeficiente de variação (CV%) associado às estimativas da similaridade genética foi calculado utilizando o programa DBOOD (COELHO, 2001), com 10.000 reamostragens (Bootstraps).

Para a análise dos dados quanto aos valores do IVCM, diâmetro das colônias, empregou-se, primeiramente, o tratamento estatístico das características individuais. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com 21 isolados e três repetições por isolado. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri, nas quais deu-se o cultivo dos respectivos isolados de *Colletotrichum*. As médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

De forma complementar, foram também realizadas análises exploratórias multivariadas, a análise de agrupamento por método hierárquico e a análise de componentes principais, que permitiram a avaliação em conjunto de todas as variáveis analisadas.

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (MOITA NETO; MOITA 1998). Para medir a semelhança entre os centróides de cada isolado, utilizou-se a distância

euclidiana (medida de dissimilaridade) para o conjunto das sete variáveis, enquanto para a estratégia de agrupamento adotou-se o método de Ward. O resultado da análise foi apresentado em forma gráfica (dendrograma), auxiliando na caracterização dos grupos.

A análise de componentes principais permite condensar a maior quantidade da informação original, contida em  $p$  variáveis (coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores, diâmetro das colônias e índice de velocidade de crescimento), em variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais criadas com os autovalores da matriz de covariância dos dados (HAIR, 2005). O critério de Kaiser é utilizado para eleger os componentes principais. Um autovalor preserva informação relevante quando é superior à unidade.

### **2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Observaram-se que dentre os 21 isolados submetidos à identificação molecular apenas dois deles, Tde F BA1 e Linhares ES1, apresentaram amplificação de uma banda específica, de cerca de 450 pb para *C. acutatum*, quando submetidos à PCR com o par de primers CaInt2/ITS4. Os demais isolados apresentaram amplificação de uma banda específica de 500 pb, correspondente a *C. gloeosporioides*, conforme dados resultantes do emprego do primer CgInt/ITS4 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. quanto a origem das amostras de frutos de mamão, referência dos isolados, variedade e espécie analisada.

Origem	Referência	Variedade	Espécies
Itápolis SP	1	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	2	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	3	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	4	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	5	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	6	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	7	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	8	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
Jaboticabal SP	1	Solo	<i>C. gloeosporioides</i>
	2	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	3	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	4	Solo	<i>C. gloeosporioides</i>
Linhares ES	1	Solo	<i>C. acutatum</i>
	2	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
	3	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>
Umuarama PR	1	Solo	<i>C. gloeosporioides</i>
	2	Solo	<i>C. gloeosporioides</i>
Maringá PR	1	Solo	<i>C. gloeosporioides</i>
	2	Solo	<i>C. gloeosporioides</i>
Teixeira de Freitas BA	1	Solo	<i>C. acutatum</i>
	2	Formosa	<i>C. gloeosporioides</i>

Nos últimos anos, devido as vantagens inerentes ao emprego de primers ISSR, grande reprodutibilidade, quando comparado a outros marcadores com base em PCR não específica como RAPD, esse vem se constituindo em importante ferramenta molecular nas pesquisas relacionadas ao estudo da diversidade genética de *Colletotrichum* (MC KAY 2009; RATANACHERDCHAI 2010; RAMPERSAD 2013;) e de outros gêneros de fungos.

Estudos relacionados à taxonomia das espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* associadas a frutos de mamoeiros foram conduzidos em diferentes partes do mundo. *Colletotrichum gloeosporioides* é a espécie prevalente e de distribuição geográfica praticamente universal (PRIHASTUTI et al. 2009), *C. acutatum*, descrito primeiramente em mamão por Simmonds (1965), na Austrália, *C. truncatum* (syn. *C. capsici*) (DAMM et al., 2010), descrito no México, Estados Unidos da América, Japão, Tailândia e Trinidad e Tobago (TAPIA-TUSSEL et al., 2008;

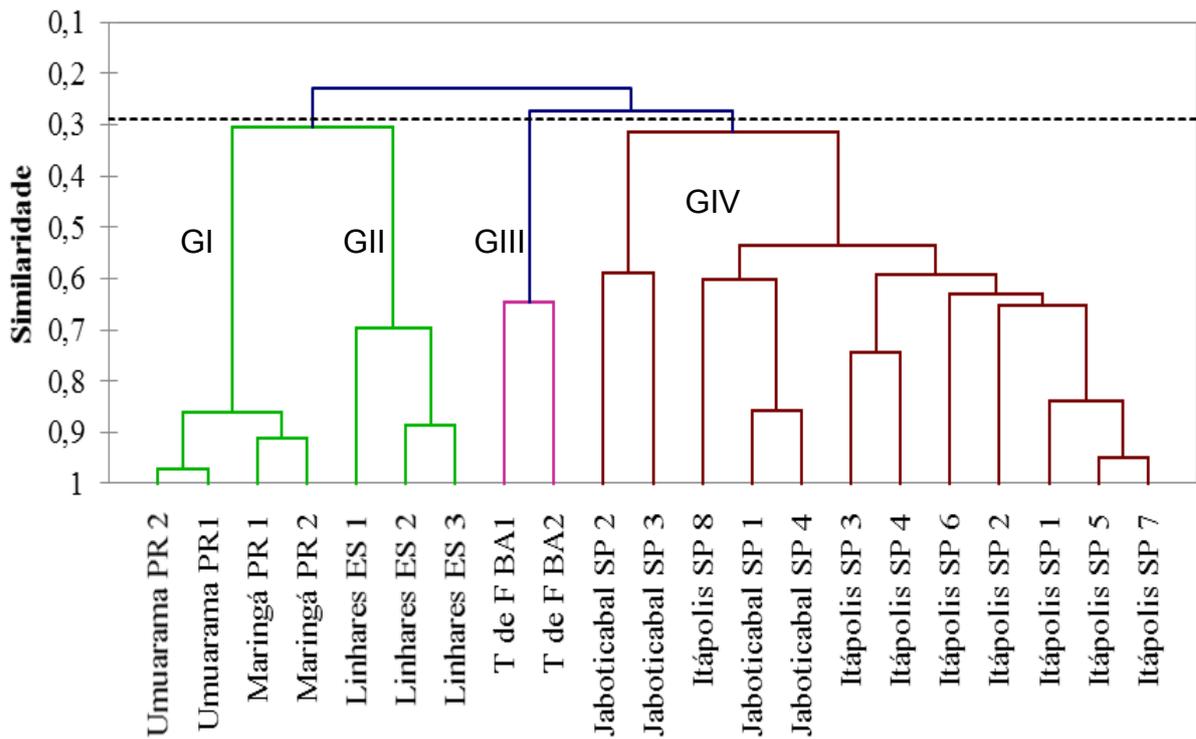
TARNOWSKI et al., 2010; YAGUCHI et al., 1995; SEPIAH et al., 1994; RAMPERSAD et al., 2011), *C. brevisporum* (Vieira et al., 2013), *C. karstii* (SHARMA; SHENOY 2013) e *C. magna*, no Brasil (NASCIMENTO et al., 2010).

No presente estudo foram encontradas duas espécies de *Colletotrichum* associadas a sintomas de antracnose nos frutos analisados: *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* sendo essas, portanto, convergentes àquelas citadas na literatura internacional. Tais resultados demonstram a viabilidade do emprego dos marcadores moleculares ISSR na taxonomia de espécies de *Colletotrichum* spp. associadas a frutos de mamoeiro. Admite-se, todavia, que em estudos complementares, envolvendo um conjunto de isolados de *Colletotrichum*, com maior representatividade em termos numéricos e de localização geográfica, seja possível a detecção de espécies adicionais, certamente ainda não detectadas segundo os estudos conduzidos nas condições brasileiras.

De um modo geral, em diversas partes do mundo os sintomas de antracnose em frutos de mamoeiros têm sido admitidos como resultantes de infecções de *C. gloeosporioides* (*strictu sensu*). Entretanto, com os recentes estudos relacionados à taxonomia dos agentes causais associados aos sintomas do tipo antracnose, em diversas espécies de plantas, incluindo as integrantes às frutíferas tropicais, esse cenário deverá ser profundamente modificado. Incluem-se dentre esses estudos, análises relacionadas à diversidade das espécies de fungos (PHOULIVONG et al., 2010; TORRES-CALZADA et al., 2013), o que, obviamente, contribuirá significativamente ao melhor entendimento das relações patógeno-hospedeiro, incluindo o desenvolvimento e validação de novas e eficientes estratégias de controle dos respectivos agentes causais. De acordo com Andrade et al., (2007), para o desenvolvimento de estratégias de controle mais apropriadas faz-se imprescindível um profundo entendimento das diferentes relações epidemiológicas, independentes dos ecossistemas.

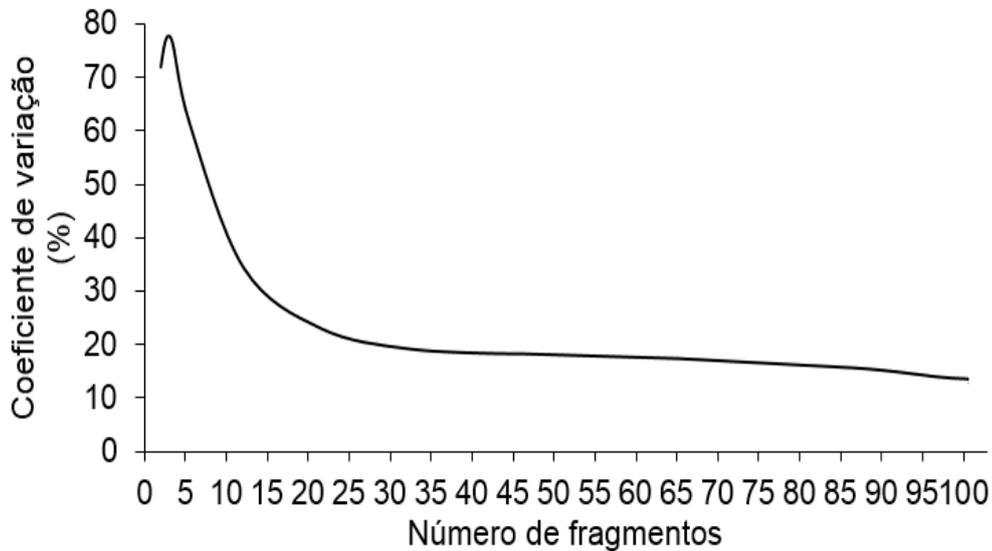
Os 11 primers ISSR usados permitiram a codificação de 103 locos, variando de 7 (P10 e AF80822) a 14 (P14). No dendrograma obtido, observa-se a existência de 4 grupos distintos, porém de características em comum, dentro dos grupos, a procedência dos isolados. No Grupo I encontram-se os isolados provenientes do estado do Paraná (Maringá PR1, Maringá PR2, Umuarama PR1 e Umuarama PR2),

no Grupo II os isolados provenientes do estado do Espírito Santo (Linhares ES1, Linhares ES2 e Linhares ES3), enquanto no Grupo III incluem os isolados do estado da Bahia (Teixeira de Freitas BA1 e Teixeira de Freitas BA2). Os isolados oriundos de frutos de mamão coletados no estado de São Paulo enquadraram-se no Grupo IV (Figura 2).



**Figura 2.** Representação pelo agrupamento UPGMA, similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard de diferentes *Colletotrichum* spp.

As estimativas de similaridade genética apresentaram boa acurácia, visto que o coeficiente de variação obtido com base em 10.000 reamostragem (bootstraps) em função do número de marcas avaliadas foi de 13,64% (Figura 3).



**Figura 3.** Coeficiente de variação (%) obtido pela análise bootstrap (10.000x) utilizando software Dboot (COELHO 2001) dos fragmentos utilizando marcadores ISSR para 21 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de mamão.

Esse estudo apresentou uma similaridade genética média de 0,289, o que demonstra uma grande diversidade entre os isolados avaliados. A maior similaridade genética desse estudo (0,971) encontra-se no grupo I, entre os isolados Umuarama PR1 e Umuarama PR2. Neste grupo a similaridade genética entre os isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de frutos procedentes do estado do Paraná foram maiores que 0,9. As menores similaridade (0,135 a 0,2) genéticas foram encontrada entre todos os isolados de Linhares ES e os de Jaboticabal SP.

Agronomicamente, as formas de cultivos entre as áreas de Jaboticabal/SP e Linhares/ES são muito distintas. A área correspondente ao cultivo de mamão no estado do Espírito Santo, onde foram obtidos os isolados de Linhares ES, corresponde àquela onde as práticas culturais são intensivas, envolvendo, inclusive, várias aplicações de defensivos agrícolas visando o controle de insetos, ácaros e fungos. No caso dos isolados de Jaboticabal, contrariamente, corresponde a plantas localizadas em quintais, onde a exploração dava-se de forma extrativista, sem nenhuma preocupação técnica e agro-econômica. Possivelmente, devido a essas elevadas discrepâncias culturais e de manejo, o emprego de marcadores ISSR tenha também sido eficiente na detecção das nuances biológicas resultantes dos efeitos associados às respostas oriundas dos dois ecossistemas. O uso intensivo de

defensivos sistêmicos são fatores que aumentam a pressão da seleção exercida sobre as populações de patógenos, favorecendo novos genes de virulência e o polimorfismo na estrutura da população desse patógeno (ARAYA, 2003).

Os acessos Linhares ES1 e TdeF BA1 pertencem à espécie *C. acutatum* e essa característica particular pode ter influenciado na baixa similaridade (menos que 0,29) genética, quando esses são comparados com os demais isolados de outras localidades. Rampersad (2013), em seus estudos, usou apenas 5 primers ISSR para avaliação da estrutura genética de *C. gloeosporioides* oriundos de frutos de mamão, sendo obtidos dois grupos distintos, um constituído por acessos provenientes da região Sul, e o outro da região Norte de Trinidad e Tobago. No presente estudo, o agrupamento dos isolados de *Colletotrichum* tornou evidente uma relação com a distribuição geográfica. A separação dos genótipos por localização geográfica não é incomum em trabalhos com ISSR, sendo já registrados casos no México (TORRES-CALZADA et al., 2013), Trinidad e Tobago (RAMPERSAD 2013) e Malásia (MAHMODI et al., 2014).

Pesquisas com um número limitado de isolados, ou envolvendo isolados de uma mesma localidade, normalmente mostram-se inadequadas para a detecção da possível diversidade genética presente num conjunto de isolados, numericamente e melhor representados geograficamente. Conclusões generalizadas a partir de um grupo de isolados de uma mesma localização, e sem o respaldo de um estudo molecular, devem ser evitados.

As colônias de *Colletotrichum* apresentaram coloração variando de cinza a salmão/branca/acinzentada (Tabela 5). A coloração da borda variou de branca a cinza, enquanto que o reverso de branca a salmão/branca. Para alguns isolados foi observada a presença de setores. Por meio da análise de variância dos dados de IVCM e diâmetro das colônias após sete dias de cultivo, foi verificado que houve diferença significativa quanto ao comportamento dos isolados avaliados (Tukey  $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 5.** Médias do índice de velocidade de crescimento (IVCM), diâmetro das colônias (DC) e notas correspondentes à coloração das colônias (C\_C), da borda (C\_B) e do reverso (C\_R), assim como quanto à ausência ou presença de setores (S) e a Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em meio BDA, a 25 °C.

Isolates	IVCM	DC	C_C	C_E	C_R	S	P
Itápolis SP 1	1,615 cde	8,021 de	2	1	3	-	3
Itápolis SP 2	1,596 cde	7,885 de	2	1	2	-	2
Itápolis SP 3	1,811 efg	8,447 de	2	1	1	-	4
Itápolis SP 4	1,504 cd	7,473 cde	1	2	3	-	4
Itápolis SP 5	1,613 cde	7,875 de	1	1	1	-	3
Itápolis SP 6	1,619 cde	8,062 de	2	1	2	+	4
Itápolis SP 7	1,895 fg	8,518 de	2	1	1	-	3
Itápolis SP 8	1,934 g	8,837 e	2	1	1	-	4
T de F BA1	1,650 def	5,248 de	2	1	2	-	4
T de F BA2	1,105 a	5,835 abc	2	1	2	-	4
Umuarama PR1	1,363 bc	7,011 bcd	2	1	4	-	4
Umuarama PR 2	1,095 a	6,872 a	2	1	1	+	4
Maringá PR 1	1,329 bc	5,965 ab	2	1	1	-	4
Maringá PR 2	1,194 ab	5,832 abc	2	1	1	-	4
Jaboticabal SP 1	1,713 defg	8,203 de	2	1	1	-	2
Jaboticabal SP 2	1,613 cde	7,904 de	2	1	1	-	3
Jaboticabal SP 4	1,813 efg	8,749 e	2	1	1	-	2
Jaboticabal SP 3	1,848 efg	8,326 de	2	1	1	-	3
Linhares ES 1	1,157 ab	5,309 ab	3	2	5	-	4
Linhares ES 2	1,543 cd	8,064 de	1	1	6	+	4
Linhares ES 3	1,635 def	7,996 de	2	1	5	-	2

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si. IVCM: CV= 5,45 e DMS= 0,264 e DC: CV= 7,10 e DMS= 1,66.

Os isolados TdeF BA2, Umuarama PR2, Maringá PR2 e Linhares ES1 foram os que apresentaram menor valor de IVCM e diferiram estatisticamente dos isolados provenientes de Jaboticabal e Itápolis, Linhares ES2, Linhares ES3 e TdeF BA1 (Tabela 4). Contrariamente, os isolados Itápolis SP8, Itápolis SP7, Itápolis SP3, Jaboticabal SP1, Jaboticabal SP3 e Jaboticabal SP4 foram os que apresentaram maiores valores de IVCM.

Quanto ao diâmetro da colônia, os isolados Umuarama PR2, Maringá PR1, Maringá PR2, TdeF BA2, Linhares ES1 foram os que apresentaram menor valor, ao contrário de Umuarama PR1, o qual apresentou o maior diâmetro médios de colônia.

Por meio da análise de agrupamento pelo método hierárquico aplicada às variáveis, coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores, índice de velocidade de crescimento e diâmetro de colônias aos sete dias de cultivo, verificou-se grande variabilidade entre os isolados, resultando numa arquitetura com três grupos de isolados, caracterizados como grupo I (GI), grupo II (GII) e grupo III (GIII) (Figura 4).

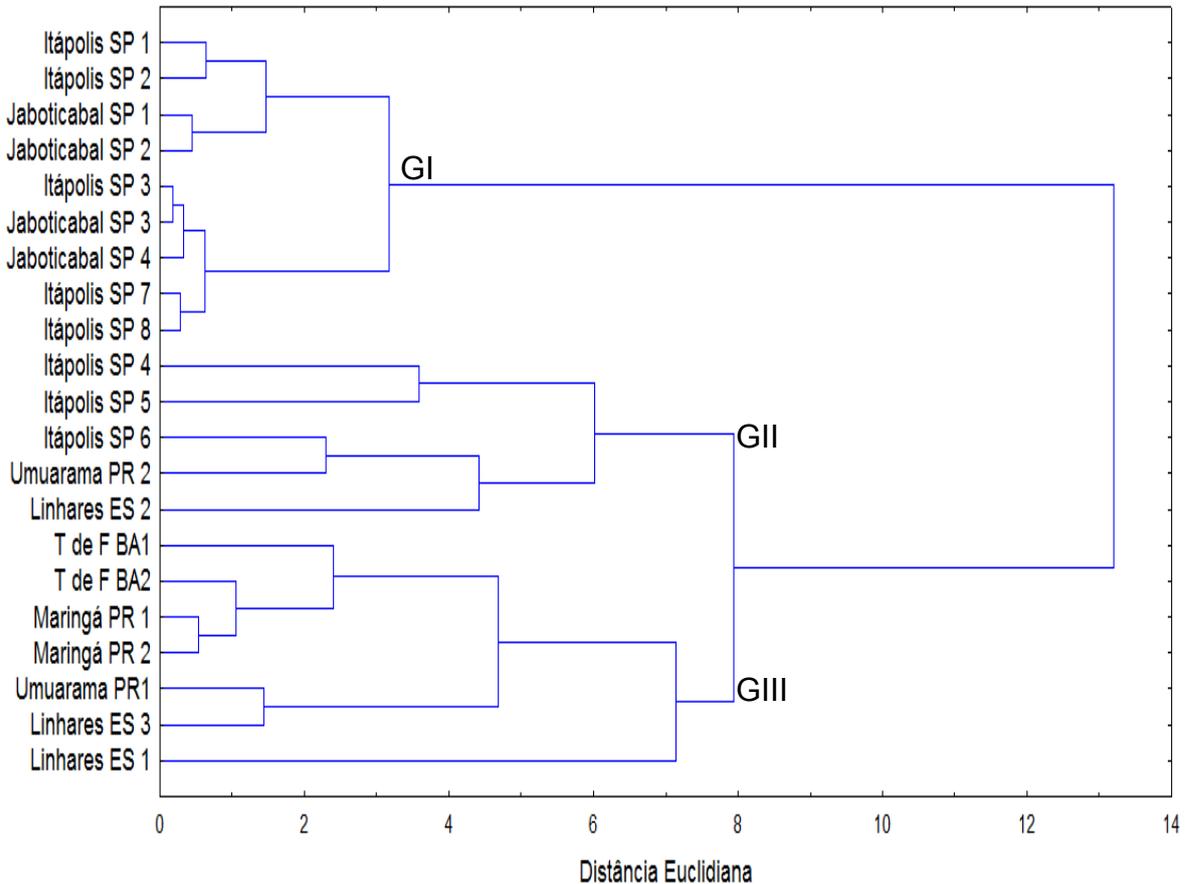
O grupo GI, formado pelos isolados Itápolis (SP1, SP2, SP3, SP7, SP8) e Jaboticabal (SP2, SP3 e SP4), foi constituído por alto grau de similaridade entre si, dada a existência das características em comum, principalmente com os isolados Jaboticabal SP3 e Itápolis SP3, cujas distâncias euclidianas foram próximas de zero. O grupo destaca-se pela coloração branca das colônias e dos bordos dos isolados, e ausência de setores, além de apresentarem os maiores IVCM e diâmetro da colônia. Na análise molecular, esses mesmos genótipos também compartilharam de um mesmo agrupamento.

No grupo GII encontram-se os isolados Itápolis SP6, Umuarama PR2 e Linhares ES2, que caracterizaram-se pela presença de setores. Além desses, esse grupo foi formado pelos isolados Itápolis SP4 e Itápolis SP5, os quais apresentaram também colônias de cor cinza. Observou-se uma baixa similaridade nesse grupo, com elevadas distâncias euclidianas, conforme destacado na Figura 4.

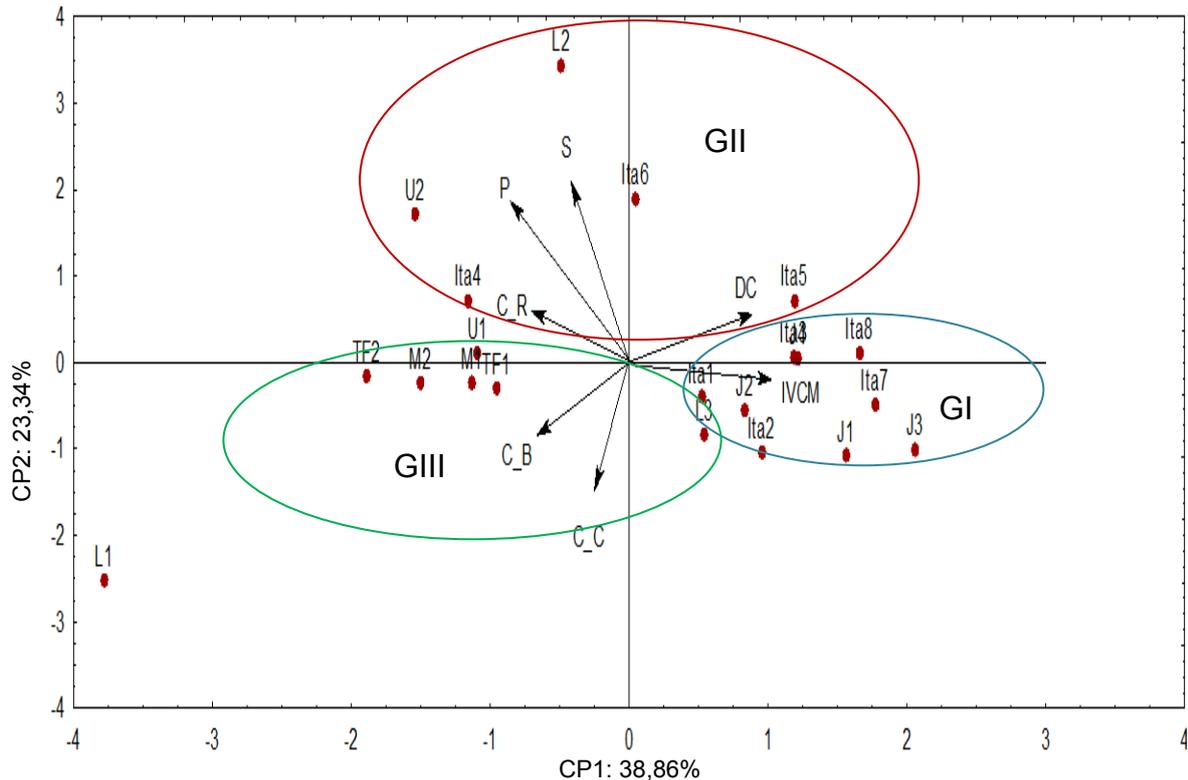
Os isolados que se enquadraram no grupo GIII, destacaram-se pela presença de colônias predominantemente brancas, de borda branca e ausência de setores. Apenas o isolado Linhares ES1 apresentou colônia com coloração salmão/branco, e borda com coloração cinza. Os isolados TdeF BA1 e TdeF BA2 apresentaram o reverso das colônias com coloração cinza, enquanto que, Maringá PR1 e Maringá PR2, apresentaram coloração branca. Os isolados Linhares ES1 e Linhares ES3 apresentaram a coloração salmão/branca/verde do reverso, enquanto o isolado Umuarama PR1 a coloração salmão/branca. Apenas dois isolados dos 21 estudados foram identificados como *C. acutatum*, e ambos encontram-se incluídos nesse grupo (Linhares ES1 e TdeF BA1).

Dois autovalores foram superiores a unidade, o que gerou dois componentes principais, sendo preservado 62,20% da variabilidade original (38,86% em CP1 e 23,34% em CP2). Assim, o conjunto inicial de seis variáveis dependentes passou a

ser caracterizado por duas novas variáveis latentes independentes, o que possibilitou sua localização em figuras bidimensionais (Figura 5) (ordenação dos isolados por componentes principais).



**Figura 4.** Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores, índice de velocidade de crescimento, diâmetro de colônias após sete dias de cultivo.



**Figure 5.** Biplot mostrando a projeção das variáveis: Cor da colônia (C\_C), cor do reverso (C\_R), cor do bordo (C\_B), presença de setores (S), Diâmetro da colônia (DC), Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e patogenicidade (P) nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com distribuição dos 21 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Pode-se observar que as correlações positivas são responsáveis pela discriminação dos isolados localizados à direita de CP1 e a correlação negativa pela discriminação dos isolados, à esquerda de CP1. As variáveis com correlação positiva são as responsáveis pela discriminação dos isolados localizados na parte superior de CP2 e as variáveis com correlação negativa são as responsáveis pela discriminação dos isolados localizados na parte inferior de CP2. É possível observar que as variáveis associadas com o crescimento do fungo (IVCM e DC) estão voltadas para direita de CP1 e todas as variáveis associadas as características morfo-culturais a esquerda de CP1.

A representação gráfica nos componentes principais permitiu caracterizar as variáveis que mais discriminaram na formação dos grupos I, II e III. As variáveis índice de velocidade de crescimento (IVCM), diâmetro de colônias aos sete dias de cultivo (DC) foram responsáveis pela discriminação do grupo I, com maiores IVCM e DC, e grupo III, menores IVCM e DC. A presença de setores de forma exclusiva nos

isolados do grupo II, possibilitou a sua distinção dos demais, não obstante esse não tenha apenas essa característica em particular, contando, ainda, com presença de cor Salmão/negra/verde/branca no reverso (C\_R), associado ao mais elevado nível de patogenicidade. A característica cor da colônia (C\_C) e cor do bordo (C\_B) auxiliou na discriminação do grupo III, que predominou a cor cinza para a colônia e a cor branca para o bordo. Apenas o acesso de Linhares ES 1 apresentou características particulares, cor salmão/branco e borda cinza, e por isso se encontra afastado do centro de massa; é de conhecimento que esse isolado pertence a espécie *C. acutatum* o que pode ter levado a apresentar características tão particulares quando comparados aos demais isolados de *C. gloeosporioides* analisados.

A classificação da patogenicidade não apresentou nenhuma correlação com as características das colônias. Os Isolados mais patogênicos se encontram nas mais diversas regiões geográficas, nos estados do Paraná e da Bahia, apresentando os mais elevados níveis de patogenicidade, com sintomas apresentados lesões deprimidas e esporulação abundante. Dentre os isolados de Jaboticabal, nenhum deles apresentou elevado nível de patogenicidade, ou nota 4.

Em termos de aspectos morfoculturais, de um modo geral há um elevado polimorfismo entre as espécies de fungos, notadamente entre as pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Esse comportamento deve-se, normalmente, às influências do meio ambiente, notadamente aos aspectos relacionados aos tipos de meios de cultivo, temperatura ambiente e luminosidade (NECHET; ABREU 2002; MAIA et al., 2011). Algumas espécies de fungos, mesmo mediante emprego de sub-colônias, oriundas de uma colônia em comum, é normal a constatação de culturas com características muito diversas das originais. Por outro lado, para o caso de *Colletotrichum*, há muita similaridade entre as características morfológicas, implicando em profundas revisões no táxon (WEIR et al., 2012).

As características morfológicas dos isolados não são suficientes para classificá-los como *C. gloeosporioides* ou *C. acutatum*, divergindo de outros investigadores (ANDRADE et al., 2007; MEHTA, MEHTA 2010) os quais tomaram tais características para a caracterização ou agrupamento de espécies de fungo, como por exemplo isolados do gênero *Colletotrichum*.

## 2.4. CONCLUSÕES

- Isolados oriundos de frutos de mamoeiros 'Formosa' e 'Solo', de quatro estados brasileiros, analisados mediante marcadores específicos CgInt/ITS4 e CaInt/ITS4, pertencem às espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*;
- Para o caso de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* a localização geográfica contribui para uma elevada diversidade genética entre os isolados;
- O polimorfismo é uma marca presente entre isolados de *Colletotrichum* de mamão.

## 2.5. REFERÊNCIAS

- ABDUL WAHID, O. A. Occurrence of *Colletotrichum anthracnose* disease of guava fruit in Egypt. **Int J Pest Manage** 47:147–152, 2001.
- AL-ERYANI-RAQEEB, A.; MAHMUD, T. M. M.; SYED OMAR, S. R.; MOHAMED ZAKI. A. R.; AL-ERYANI, A. R. Effects of calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). **International Journal of Agricultural Research** 4(2):53-68, 2009.
- ALAHAKOON, P. W.; BROWN, A. E. Host-range of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruit crops in Sri-lanka. **Int J Pest Manage** 40:23–26, 1994.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 32(1):21-31, 2007.
- ARAYA, C. M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 28: 221-228, 2003.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, 39: 183-204, 2009.
- CANÇADO, G.; SANT'ANA, G.; VAL, A.; FERREIRA, J. Marcadores moleculares de DNA e suas aplicações na caracterização, identificação e melhoramento genético da oliveira. Capítulo 8:225-249, 2012.
- CANNON, P. F.; BUDDIE, A. G.; BRIDGE, P. D. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon**, Ithaca, 104:189-204, 2008.

COELHO, A.S.G. dBood: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap: versão 3.01. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001.

DAMM, U.; BARONCELLI, R.; CAI, L.; KUBO, Y.; O'CONNELL, R.; WEIR, B.; YOSHINO, K.; CANNON, P. F. *Colletotrichum: Species, ecology and interactions*. *IMA Fungus*, 1:161-165, 2010.

FAO/Food and Agriculture Organization of the United Organizations (2015). Productio. Crops Primary. Disponível em <http://faostat.fao.org/>.

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

GAIERO, P.; MAZZELLA, C.; MOURELLE, D.; ROSSATO, M. Genética, sistemática y conservación: estado actual del conocimiento de las palmas nativas de Uruguay. In: III Simpósio Latinoamericano de citogenética y evolución, Corrientes. Anales/Proceedings: **Journal of Basic and Applied Genetics**, 2011.

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

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

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

JOHNSTON, P.; DODD, S.; PARK, D.; MASSEY, B.; CHARUCHINDA, B. Are stable, consistant, reliable, and useful species names possible within *Colletotrichum*? *Colletotrichum Diseases of Fruit Crops*. Pre-Congress workshop, ICPP, Torino, Italy: 1-7, 2008.

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

LU, G. Z.; CANNON, P. F.; REID, A.; SIMMONS, C. M. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycological Research**, 108(1):53-63, 2004.

MAHMUDI, F.; KADIR, J.; PUTEH, A. Genetic diversity and pathogenic variability of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of pepper in Malaysia. **Journal of Phytopathology**. 162:456-465, 2014.

- MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCA, W. L. A.; MAIA, J. B.; ABREU, M. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Biosci. J.**, Uberlândia, 27:(2):205-210, 2011.
- MCKAY, S. F.; FREEMAN, S.; MINZ, D.; MAYMON, M.; SEDGLEY, M.; COLLINS, G. C.; SCOTT, E. Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond. **Australia. Phytopathology** 99: 985-995, 2009.
- MENG, X.; CHEN, W. Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gregata*. **Mycol. Res.** 105:936-940, 2001.
- MEHTA, Y.R.; MEHTA, A. Genetic variability among the isolates of *Colletotrichum gossypii* of cotton. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.40- 44, 2010
- MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruit. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, Wallingford: CAB International, p.269-288, 1992.
- MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; CÂMARA, M. P.S.; FERREIRA, M. F.; MAYMON, M.; FREEMAN, S.; MICHEREFF, S. J. First report of papaya fruit rot caused by *Colletotrichum magna* in Brazil. **Plant Disease**. Volume 94, Number 12. Page 1506, 2010.
- NECHET, K. L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 1999).
- NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 26 (6):1135-1142, 2002.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 1991.
- PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, N. L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology** 150:128-134, 2002.
- PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity** 44:33–43, 2010.

- PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Divers** 39:89–109, 2009.
- PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 34:413-434, 1996.
- RAMPERSAD, S. N. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. **Plant Dis.** 95:1244-1254, 2011.
- RAMPERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology** 103:182-189, 2013.
- RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H.; LIN, F.; SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross- inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chili anthracnose. **Microbiology Research** 4(1), 76–83, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.;. Molecular cloning: a laboratory manual. 3ed. Londres: CSHL Press. p.1448, 2001.
- SCHWARZENBACH, K.; WIDMER, F.; ENKERLI, F. Cultivation-independent analysis of fungal genotypes in soil by using simple sequence repeat markers. **Appl. Environ. Microbiol.** 73(20): 6519-6525, 2007.
- SEPIAH, M. Efficacy of propiconazole against fungi causing postharvest disease on Eksotika papaya. International Conference, Chaing Mai (Thailand). Australian Center for International Agricultural Research. *Canberra: A.C.T. Australia*, 1994.
- SHARMA, G.; SHENOY, B. D. Multigene sequence-based identification of *Colletotrichum cymbidiicola*, *C. karstii* and *C. phyllanthi* from India. **Czech Mycol.** 65: 79-88, 2013.
- SHIVAS, R. G.; CAI, L. Cryptic fungal species unmasked. ASM Affairs. **Microbiology Australia.** p.36-37, 2012.
- SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fiorinae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Diversity** 39: 111-122, 2009.
- SIMMONDS, J. H. A study of the species *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences.** 22:437-459, 1965.
- SSERUMAGA, J. P.; BIRUMA, M.; AKWERO, A.; OKORI, P.; EDEMA, R. Genetic characterisation of Ugandan strains of *Colletotrichum sublineolum* using ISSR makers. **Uganda Journal of Agricultural Sciences**, 14 (1): 111 – 123, 2013.

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

TAPIA-TUSSELL, R.; QUIJANO-RAMAYO, A.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; LAPPE, P.; LARQUE-SAAVEDRA, A.; PEREZ-BRITO, D. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. **Mol Biotechnol**, 40:293-298, 2008.

TARNOWSKI, T. B. L.; PLOETZ, R. C. First report of *Colletotrichum capsici* causing postharvest anthracnose on papaya in South Florida. **Plant Dis**, 94:1065, 2010.

TATAGIBA, J. S.; LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. 27:186-192, 2002.

TORRES-CALZADA, C.; TAPIA-TUSSELL, R.; HIGUERA-CIAPARA, I.; PEREZ-BRITO, D. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). **Eur J Plant Pathol**, 3:23-28, 2013

VÁSQUEZ-LÓPEZ, A.; HERNÁNDEZ-CASTRO, E.; MORA-AGRILERA, A.; NAVADÍAS, C.; SANCHEZ-GARCIA, F. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. **Agrociencia**, 46(8):757-767, 2012.

VIEIRA, W. A. S.; NASCIMENTO, R. J.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D.; CAMARA, M. P. S. First Report of Papaya Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. **Pl. Dis**. 97: 1659. (2013)

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

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

YAGUCHI, Y.; NAKANISHI, Y.; SAITO, T.; NAKAMURA, S. Anthracnose of *Carica papaya* L. caused by *Colletotrichum capsici*. **Ann Phytopathol Soc Japan**, 61:222, 1995.

## CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A ANTRACNOSE EM MANGA

**RESUMO** – O cultivo da mangueira (*Mangifera indica* L) tem grande importância dentre as frutíferas tropicais no cenário mundial. No Brasil, a mangueira é a terceira frutífera exportada em maior quantidade e responsável pela geração de milhares de empregos. Sua cadeia produtiva contabiliza muitas perdas, principalmente devido a problemas fitossanitários, com destaque para a antracnose, causada pelo patógeno *Colletotrichum* spp.. O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfofocultural, molecular e patogênica de 52 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de mangueiras, provenientes de cinco municípios do estado de São Paulo, e avaliar a eficiência de fungicidas químicos e biológico no controle do patógeno. Para a identificação das espécies foram utilizados os primers táxon-específicos para *C. gloeosporioides*, CgInt/ITS4, e o primer Calnt2/ITS4, específico para *C. acutatum*. Para a caracterização morfofocultural foram realizadas avaliações quanto à cor da colônia, do bordo e do reverso, presença e ausência de setores e de pontuações escuras no reverso, enquanto a patogênica foi avaliada por meio de notas quanto ao nível de sintomas. Teste para avaliar os 2 fungicidas químicos e um biológico foram realizados em quatro concentrações (0,1 mg.L<sup>-1</sup>; 1 mg.L<sup>-1</sup>; 10 mg.L<sup>-1</sup>; 100 mg.L<sup>-1</sup>). Dos 52 isolados avaliados, todos foram classificados como *C. gloeosporioides*, cuja patogênica foi confirmada em frutos de mangueira „Palmer“. Foi verificado alto polimorfismo, tornando as características morfofoculturais importantes apenas quanto à classificação do fungo, porém não em termos de taxonomia. Dentro das concentrações dos fungicidas testados, o tebuconazole foi o que apresentou melhores resultados em todas as concentrações, porém todos os fungicidas testados foram considerados de baixa eficiência por apresentar um IC<sub>50</sub> (concentração efetiva capaz de inibir em 50% o crescimento micelial) entre 10 mg.L<sup>-1</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** *Mangifera indica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, patogênica.

### 3.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, atrás apenas da China e da Índia. Destaca-se como um dos 10 maiores produtores de manga (*Mangifera indica* L) e goiaba (*Psidium guajava* L.), (FAO, 2009). A mangueira é uma frutífera tropical pertencente à família Anacardiaceae, originária da Índia. No ano de 2013, o Brasil ficou na 7ª posição de maior produtor mundial de manga, e exportou mais de 86 mil toneladas da fruta, gerando uma receita de US\$ 147,5 milhões

(ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2010). As regiões Nordeste e Sudeste são responsáveis por mais de 95% da produção nacional de manga, com destaque para as variedades a Tommy Atkins, Palmer e Haden, as mais produzidas e exportadas. Em consequência disso, a manga tem importância econômica e social, por gerar divisas e empregos diretos e indiretos (IBGE 2009).

Nos últimos anos, esse setor resente-se de problemas complexos, de natureza diversa, com particular enfoque para os de ordem fitossanitária, tornando o comércio das frutas e sua exportação menos atrativa e de alto custo de produção. Nesse contexto, destaca-se a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc e *C. acutatum*. A antracnose infecta folhas, provoca queda de flores e frutos, e perda da qualidade dos frutos. O fungo ataca ramos novos, folhas, inflorescências e frutos, que perdem valor comercial por apresentarem lesões necróticas, que aumentam de tamanho progredindo para a polpa, tornando o fruto inadequado para a comercialização, principalmente para exportação.

Nas diferentes relações patógeno-hospedeiro, incluindo *Mangifera-Colletotrichum* spp. onde os sintomas se manifestam na forma de antracnose, têm se verificado divergência quanto à definição dos táxons responsáveis (PHOULIVONGE et al., 2010). De forma prática, tais aspectos têm grande relevância, já que a epidemiologia nos patossistemas podem ser diferentes, implicando em respostas diferenciadas quanto aos métodos de controle empregados (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Além disso, tomando-se como referência os aspectos fenotípicos, as influências ambientais também pode ser significativas, implicando em comportamentos igualmente diferentes (LÓPEZ, 2001)

As ferramentas moleculares, baseados em análises nas sequências do DNA, têm sido empregadas com sucesso na definição de táxons, contribuindo para a identificação de espécies e, por conseguinte, constituindo-se em elementos adicionais que contribuem ao melhor entendimento das diferentes interações (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; ANDRADE et al., 2007; CAI et al., 2009). Souza et al. (2011) comprovaram que o *C. gloeosporioides* não é o único patógeno causador da antracnose em manga no Brasil, a qual é também complementada por *C. acutatum*.

A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* no mesmo hospedeiro pode dificultar o controle da antracnose, tornando-a uma doença ainda mais importante. Muitos são os fungicidas recomendados em aplicações preventivas, para o controle químico desse patógeno, entre eles os mais usados no Brasil são os cúpricos, que por serem de contato e facilmente laváveis, não são eficazes, a menos que aplicados com outros fungicidas, como os ditiocarbamatos (RIBEIRO, 2005; PLOETZ, 2010, SOUZA 2011). Porém fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos, não são aceitos em alguns países, como por exemplo, nos Estados Unidos e também na União Europeia (FAY et al.,2007; PLOETZ, 2010; SOUZA 2011), o que torna o uso inadequado para frutos com o objetivo de exportação. Os Fungicidas sistêmicos são mais eficientes quando comparados aos fungicidas de contato, entretanto, ao longo dos anos, em diversos países tem-se verificado baixa eficiência dada à seleção de estirpes de *C. gloeosporioides* (TAVARES; SOUZA 2005).

Dada a elevada importância da antracnose no cultivo de manga no Brasil e a dificuldade de controle da doença, o presente trabalho teve como objetivo identificar mediante ferramentas moleculares, primers taxon-específicos CgInt/ITS4 e Calnt2/ITS4, as possíveis espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela antracnose em diversas variedades de manga, classificar os isolados quanto às características morfo-culturais e patogenicidade, e, também, avaliar a sensibilidade de isolados do patógeno sob três fungicidas, sendo dois deles químicos, e um biológico.

### **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

No estudo foram utilizados 52 isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos (M) e folhas (L) de mangueiras, coletadas em quatro municípios do estado de São Paulo, sendo: Itápolis, Vista Alegre do Alto, Valinhos e distrito de São Lourenço do Turvo, pertencente ao município de Matão (Tabela 6). Tais frutos foram armazenados em caixas térmicas e levados para o Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, para isolamento do patógeno.

O cultivo dos isolados foi realizado no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitossanidade, Jaboticabal/SP. A etapa de caracterização

molecular dos isolados foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal.

### **3.2.1. Obtenção e preservação dos isolados de *Colletotrichum* spp.**

Frutos e folhas de manga foram coletados de plantas de diversas variedades, nos municípios de Pindorama, Votuporanga, Mogi Mirim, Taquaritinga e Monte Alto, todos do estado de São Paulo. Após a coleta, as folhas e frutos foram armazenadas em caixas térmicas e levadas para o Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, para os procedimentos visando ao isolamento do patógeno.

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

No total foram obtidos 52 isolados de *Colletotrichum* spp. de cinco municípios do estado de São Paulo (Tabela 6), os quais foram utilizados nos estudos subsequentes.

**Tabela 6.** Designação, procedência, hospedeiros (variedades) e órgãos os quais os isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos Jaboticabal/SP, 2015.

Isolado	Origem (município)	Hospedeiro (Variedade)	Tecido
1M	Pindorama SP	Winter	Fruto
7M	Pindorama SP	Petacon	Fruto
7L	Pindorama SP	Petacon	Folha
8M	Pindorama SP	Adams	Fruto
8L	Pindorama SP	Adams	Folha
10L	Pindorama SP	Alda	Folha
10M	Pindorama SP	Alda	Fruto
11L	Pindorama SP	Pele Moça	Folha
11M	Pindorama SP	Pele Moça	Fruto
13M	Pindorama SP	Carrier	Fruto
13L	Pindorama SP	Carrier	Folha
15M	Pindorama SP	Haden TR	Fruto
16L	Pindorama SP	Rosa	Folha
16M	Pindorama SP	Rosa	Fruto
17L	Pindorama SP	Torbet	Folha
17M	Pindorama SP	Torbet	Fruto
18M	Pindorama SP	Palmer	Fruto
18L	Pindorama SP	Palmer	Folha
19M	Pindorama SP	Julima	Fruto
19L	Pindorama SP	Julima	Folha
20M	Pindorama SP	Rocha	Fruto
20L	Pindorama SP	Rocha	Folha
21M	Pindorama SP	Lima Peru	Fruto
22M	Pindorama SP	Foice	Fruto
22L	Pindorama SP	Foice	Folha
24M	Pindorama SP	Surpresa	Fruto
25M	Pindorama SP	Carabao	Fruto
25L	Pindorama SP	Carabao	Folha
26L	Pindorama SP	Dasherari	Folha
26M	Pindorama SP	Dasherari	Fruto
28M	Pindorama SP	Haden 2H	Fruto
29M	Pindorama SP	Haden 2H	Fruto

40L	Pindorama SP	Espada Stahl	Folha
40M	Pindorama SP	Espada Stahl	Fruto
41M	Pindorama SP	Rubi	Fruto
43M	Pindorama SP	Florigon	Fruto
44M	Pindorama SP	Espada Ouro	Fruto
50M	Pindorama SP	Alfa	Fruto
53L	Votuporanga SP	Espada Stahl	Folha
56L	Votuporanga SP	Chok Anan	Folha
59L	Votuporanga SP	Van Dyke	Folha
60L	Votuporanga SP	Palmer	Folha
62L	Votuporanga SP	Bourbon Vermelha	Folha
63L	Votuporanga SP	Ubá	Folha
65L	Votuporanga SP	Haden 2H	Folha
67L	Votuporanga SP	Coração de Boi	Folha
69L	Votuporanga SP	Rent	Folha
70M	Mogi Mirim SP	Tommy Atkins	Fruto
71M	Monte Alto SP	Palmer	Fruto
72M	Monte Alto SP	Tommy Atkins	Fruto
73M	Taquaritinga SP	Palmer	Fruto
74M	Mogi Mirim SP	Rosa	Fruto

### 3.2.2. Extração de DNA dos isolados de *Colletotrichum spp.*

Para a extração de DNA, os isolados foram repicados para frascos de vidro de 110 mL, contendo meio de cultivo líquido BD (batata-dextrose), mantidos por dez dias, onde os mesmos formaram uma massa micelial. Após esse procedimento, o micélio foi separado do meio de cultivo com o auxílio de peneiras, dispensando-se o meio restante. Em seguida, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e seco em placas de Petri, mantido em temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. Depois de seco o micélio foi macerado em nitrogênio líquido, formando um pó seco, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

As extrações de DNA foram baseadas no protocolo de Kuramae-Izioka (1997). Em cada tubo eppendorf contendo 0,1 g de micélio macerado de cada isolado, foi adicionado 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA

100 mM pH 8,0 e SDS 0,5% (p/v)]. Os tubos com as soluções foram agitados em vórtex e em seguida levados a banho-maria a 65 °C por uma hora, sendo agitados delicadamente a cada 10 minutos. Após serem retirados do banho-maria, foram acrescentados 400 µL de acetato de potássio 5 M. A solução foi misturada por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Após a incubação em gelo, as amostras foram centrifugadas a 15.294 g por 10 minutos a 10 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos tubos com o auxílio de uma pipeta e em seguida acrescentado a este volume 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sob as mesmas condições. Novamente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Posteriormente foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado à solução, sendo então misturada cuidadosamente e acondicionada em freezer -20 °C.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos com as soluções foram centrifugados a 15.294 g por 20 minutos a 10 °C, descartando o sobrenadante, sendo o “pellet” lavado com 700 µL de etanol 70% (v/v). Mais uma vez os tubos foram submetidos à centrifugação a 15.294 g por 7 minutos, a 10 °C, e a fase líquida foi novamente descartada e o “pellet” foi colocado para secar. O “pellet” foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 100 mM pH 8,0) por 24 horas a 4 °C.

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

### 3.2.3. Reações com primers específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

As amostras de DNA extraídas de *Colletotrichum* spp. foram submetidas a reação de PCR com primers desenhados e desenvolvidos por Mills et al. (1992), para amplificação de uma banda exclusiva de cerca de 500 pb para Calnt2 (5"GGGGAAGCCTCTCGCGG3"), específico para *C. acutatum*, e de aproximadamente 450 pb para CgInt (5"GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3"), específico para *C. gloeosporioides*, os quais foram utilizados em conjunto com o iniciador ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificação da região ITS (WHITE et al., 1990). Como padrões de amplificação foram utilizados um isolado de *C. acutatum* e um isolado de *C. gloeosporioides*, previamente identificados, mediante sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, utilizando-se o par de iniciadores ITS1/ITS4. O sequenciamento das amostras padrão foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microorganismos, do Departamento de Tecnologia, da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP.

As reações de PCR foram realizadas conforme Tabela 7. Foram utilizados tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); dNTP"s (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 2,0 U de Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, iniciador 5 pmol, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20µL. Para a amplificação com os pares de iniciadores Calnt2/ITS4 e CgInt/ITS4 as reações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf), sendo utilizado um ciclo a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 64°C por 1 minuto para amplificação com o iniciador Calnt2/ITS4 ou a 54°C para o CgInt/ITS4 e 72°C por 1 minuto, e para finalizar 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,0 %, contendo brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb "DNA Ladder Plus" (Fermentas).

**Tabela 7.** Componentes de “mix”, suas respectivas concentrações estoque, volume e concentrações finais utilizadas nas reações PCR com primers específicos (CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4).

Componentes	Estoque	Volume reação (µL)	Concentração final
Água Milli Q	-	14,65	q.s.p
Tampão	10x	2	1x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,8	2,0 mM
Primers	5 pmol	1	5 pmol
dNTP's	10 mM	0,4	0,2 mM
Taq polimerase	5 U/µL	0,4	2 unidades
DNA	80 ng/µL	0,75	60 ng
Total		20	

### 3.2.4. Caracterização morfocultural e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp.

Todos os isolados utilizados na identificação molecular foram previamente agrupados, tomando-se como referência a procedência. Em seguida, foram avaliados quanto ao aspecto e coloração das colônias. Para tal, discos de colônias, de 5 mm de diâmetro, foram extraídos das margens de culturas de sete dias, cultivadas em meio BDA, e transferidos para novas placas contendo o mesmo meio de cultivo. A seguir, tais culturas foram incubadas a 25°C, sob luz contínua. Após dez dias de incubação, período em que as colônias alcançaram uniformemente as bordas das placas e atingiu a estabilização da sua coloração, procederam-se avaliações das mesmas, borda e reverso, sendo também avaliada a possível presença de setores. No período de avaliação foi observado a presença de pequenas pontuações escuras no reverso de alguns isolados, como essa característica não está relatada na literatura, também foi avaliada quanto a presença e ausência. Para cada isolado foram utilizadas três repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri contendo os respectivos isolados.

A partir das avaliações quanto à coloração das colônias, e possível presença de pontuações escuras no reverso e setores utilizou-se uma escala qualitativa das notas (Tabela 8), conforme ANDRADE et al., 2007, com modificação.

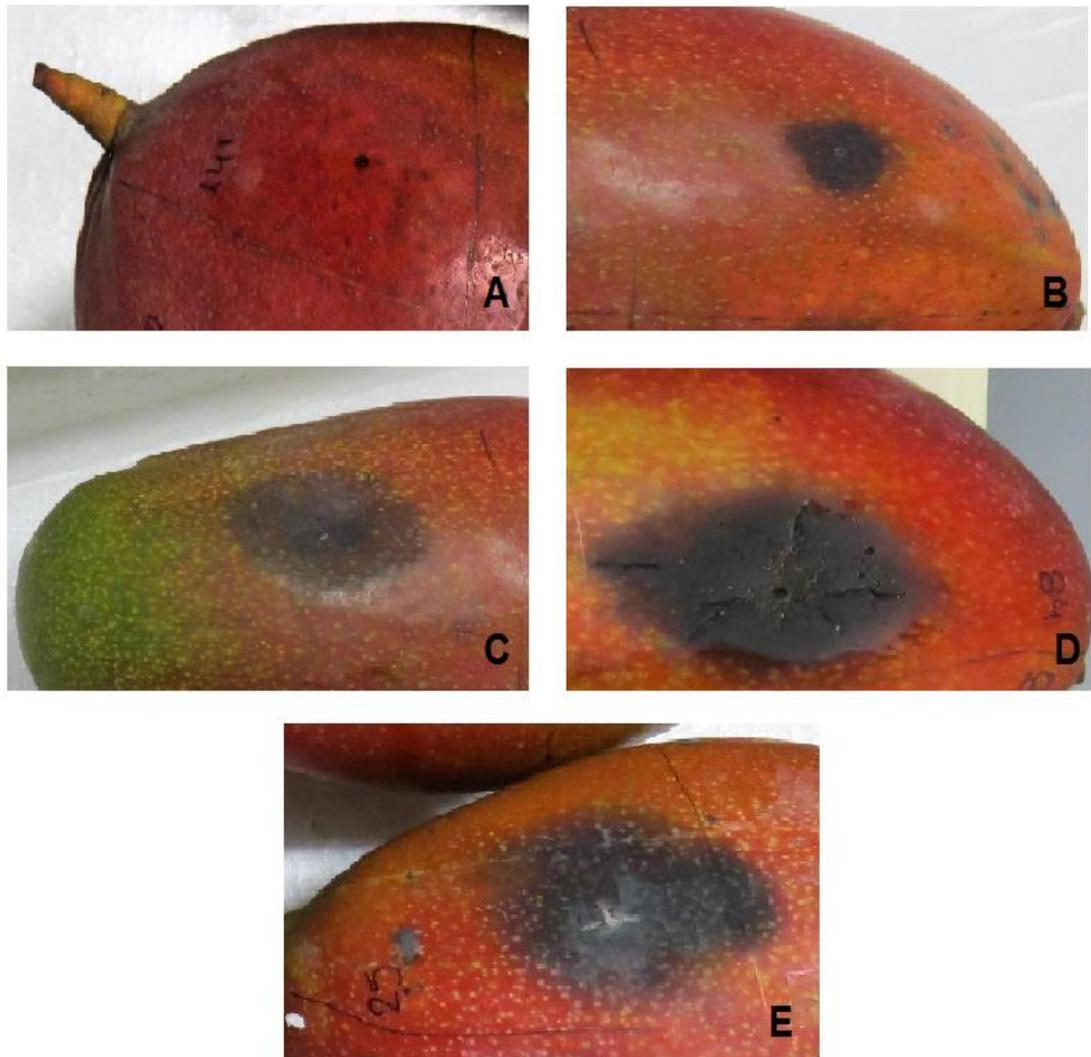
**Tabela 8.** Escala de notas referentes à coloração de colônias, do bordo e do reverso, e determinação quanto à possível presença de pontuações no reverso e setores.

Escalas	C_C	C_B	C_R	P_R	S
1	Branco	Branca	Branca	+	+
2	Cinza	Cinza	Cinza	-	-
3	Branco/Cinza	Branco/Cinza	Preto		
4	Branco/Salmão	Branco/Salmão	Branco/Cinza		
5	Cinza/Preto Esverdeado	Cinza/Preto	Branco/Preto		
6	Cinza/Verde	Cinza/Verde	Cinza Esverdeado		
7	Cinza/Preto	Cinza/Preto/Castanho	Cinza/Preto		
8	Cinza/Preto/Castanho	Branco/Preto/ Castanho	Branco/Preto/ Castanho		
9	Branco/Cinza/Preto	Branco/Cinza/Preto	Branco/Cinza/Preto		

C\_C: Coloração das colônias; C\_B: Coloração do bordo; C\_R: Coloração do reverso; P\_R: Presença (+) ou ausência de pontos no reverso (-); S: Presença (+) ou ausência de setores (-).

Para o teste de patogenicidade, frutos sadios de Manga „Palmer“, destacados, foram colhidos diretamente no campo, e submetidos ao método de desinfestação de acordo com Sanchez (1990). Posteriormente, os frutos foram feridos superficialmente com um agulha hipodérmica esterilizada. A seguir, uma gota contendo 20 µL de suspensão previamente calibrada para  $1,5 \cdot 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de cada um dos isolados (culturas de 7 dias em BDA), foi colocada sobre o ferimento. Os frutos, uma vez inoculados, foram colocados em bandejas de plástico contendo lâmina de isopor ao fundo e lâmina d'água, que, posteriormente, foram seladas com filme plástico, e mantidas em câmara fria a 25°C, com fotoperíodo de 24h (MORAES; TANAKA; MASSOLA JÚNIOR 2013). As avaliações foram feitas aos 3, 5 e 7 dias após a inoculação, de acordo com a seguinte escala de notas: 0 – frutos sem sintomas; 1 – lesão superficial restrita ao ponto de inoculação, diâmetro inferior a 2 cm ; 2 – lesão em expansão, ainda superficial, início de amolecimento dos tecidos, sem trincas, ausência de esporulação abundante visível; 3 – lesões extensivas, maior que 2 cm de diâmetro, presença de trincas, tecidos deprimidos, visível presença de conídios e tecidos encharcados; 4 –lesão deprimida, escura a acinzentada, maior que 3 cm de diâmetro, esporulação presente, facilmente visível a olho nú (ANDRADE et al., 2007) (Figura 6), as notas foram deferidas no ultimo dia de avaliação. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de um fruto

inoculado em um ponto. Como controle, frutos foram inoculados com água estéril. Foram avaliados os 52 isolados, cujas médias de severidade dos sintomas foram comparadas por meio do teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). O isolamento dos patógenos dos frutos doentes foi feito no final do experimento para completar o postulado de Koch;



**Figura 6.** Representação das escalas de nota, A – representa nota 0 (frutos sem sintomas); B – representa nota 1 (lesão superficial, diâmetro inferior a 2 cm restrita ao ponto de inoculação); C – nota 2 (lesão em expansão, ainda superficial, início de amolecimento dos tecidos, sem trincas, ausência de esporulação abundante visível); D - 3 (lesões extensivas, maior que 2 cm de diâmetro, presença de trincas, tecidos deprimidos, visível presença de conídios, tecidos encharcados); E –nota 4 (lesão deprimida, escura a acinzentada, mais que 3 cm de diâmetro, deprimidas, esporulação presente, facilmente visível a olho nú)

### 3.2.5. Sensibilidade micelial de *Colletotrichum* spp. a fungicida

Os três fungicidas avaliados encontram-se apresentados na Tabela 9, os quais foram diluídos em série e ajustados para as concentrações de 0,1; 1;10 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de ingrediente ativo, adicionados ao meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) fundente (45°C) contido em Erlenmeyer, e posteriormente em placas de Petri. As placas de Petri contendo BDA sem fungicidas foram utilizadas como testemunhas. Após 24 horas do preparo dos meios com fungicidas, discos de colônias de 5 mm de diâmetro, obtidos da periferia das placas, com sete dias de repicagem, foram transferidos para o centro da placa, seguido de incubação em estufas para B.O.D. 25°C ± 1°C e fotoperíodo de 12 h, por um período de sete dias. O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri. O experimento foi realizado em duplicata. Foram avaliados 52 isolados, cujas médias de inibição do crescimento das colônias foram comparadas por meio do teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Os isolados submetidos ao teste de sensibilidade foram aqueles que apresentaram parogenicidade entre 3,5 a 4.

**Tabela 9.** Fungicidas utilizados no teste de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de mangueiras, de diferentes variedades. Jaboticabal/SP, 2015.

Ingrediente Ativo	Nome Comercial	Grupo químico	CIA*
Tebuconazole	Folicur 200 EC	Triazol	200 g/L
Azoxystrobrina	Amistar 500 WG	Estrobilurina	500 g/L
<i>Bacillus subtilis</i> linhagem QST 713	Serenade	Agente Biológico	13,68 g/L

\*Concentração de ingrediente ativo

As avaliações foram realizadas mediante medições do tamanho das colônias, em sentidos perpendiculares entre si, realizadas após sete dias de incubação, quando, as colônias alcançaram a borda das placas de Petri. A partir de tais dados foi determinada o IC<sub>50</sub> (Concentração efetiva capaz de inibir 50% do crescimento micelial) que corresponde à concentração efetiva necessária para inibir o crescimento micelial em 50%.

Após o cálculo do IC<sub>50</sub>, os fungicidas foram classificados em quatro categorias de eficiência, de acordo com a escala de Edgington et al. (1971) citada por Tavares (2005) em que: IC<sub>50</sub> < 1 mg.L<sup>-1</sup>: alta eficiência; IC<sub>50</sub> 1 - 10 mg.L<sup>-1</sup> moderada eficiência; IC<sub>50</sub> 10 - 50 mg.L<sup>-1</sup> baixa eficiência; IC<sub>50</sub> > 50 mg.L<sup>-1</sup> insensibilidade.

### 3.2.6. Análise dos dados

Para a identificação da espécie de *Colletotrichum* foi observado apenas se havia a banda correspondente a identificação de *Colletotrichum acutatum* ou *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para a análise dos dados quanto aos valores de patogenicidade e a eficiência de fungicidas, empregou-se, primeiramente, o tratamento estatístico da característica individual. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com 52 isolados e quatro repetições por isolado, inoculados em frutos diferentes. As médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

As médias dos tratamentos qualitativos (fungicidas) foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. As médias dos tratamentos quantitativos (concentrações) foram submetidas à análise de regressão.

De forma complementar, foram também realizadas análises exploratórias multivariadas, a análise de agrupamento por método hierárquico e a análise de componentes principais, que permitiram a avaliação em conjunto de todas as variáveis analisadas.

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (MOITA NETO; MOITA 1998). Para medir a semelhança entre os centróides de cada isolado utilizou-se a distância euclidiana (medida de dissimilaridade) para o conjunto das sete variáveis, enquanto para a estratégia de agrupamento adotou-se o método de Ward. O resultado da análise foi apresentado em forma gráfica (dendrograma), auxiliando na caracterização dos grupos.

A caracterização dos isolados foi feita utilizando-se a análise de componentes principais, que é uma técnica multivariada exploratória que permite condensar a

maior quantidade da informação original, contida em  $p$  variáveis (coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de pontuações escuras no reverso e setores), em variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais (HAIR, 2005). A correlação entre cada variável ( $X_j$ ) e um componente principal ( $CP_h$ ) é medida por:

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

Em que:  $s_j$  é o desvio padrão da variável  $j$ ;  $a_{jh}$  é o coeficiente da variável  $j$  no  $h$ -ésimo componente principal e  $\lambda_h$  é o  $h$ -ésimo autovalor da matriz de covariância.

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

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Obtenção de isolados

Todos os 52 isolados obtidos e selecionados para análises apresentavam padrões culturais, assim como aspectos morfológicos que se enquadravam dentre aquelas descritas para o gênero *Colletotrichum* (SUTTON, 1992).

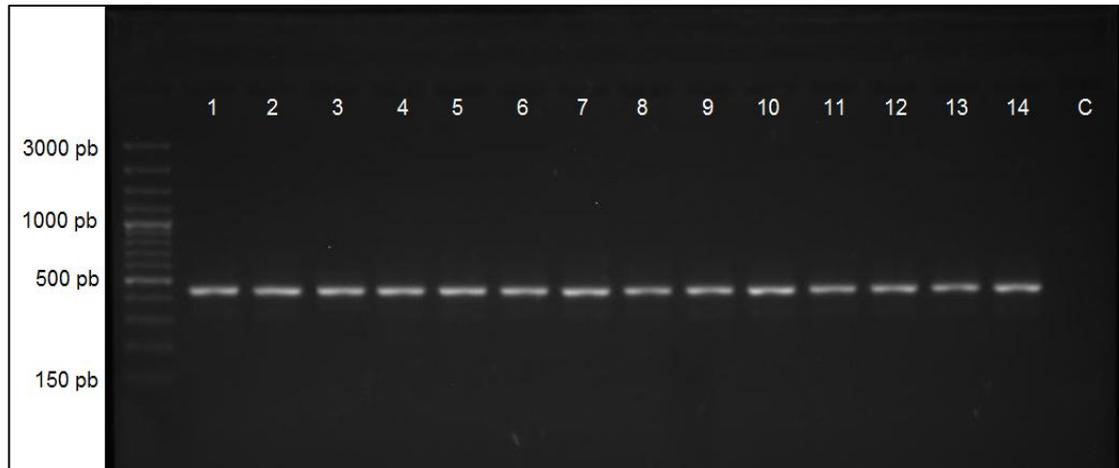
#### 3.3.2. PCR com primers específicos para *Colletotrichum* spp.

No presente estudo, foi verificado que dos 52 isolados de *Colletotrichum* spp. submetidos à identificação molecular, todos eles apresentaram amplificação de uma banda específica, de cerca de 450 pb, apenas para *C. gloeosporioides*, quando submetidos à PCR com o par de iniciadores CgInt/ITS4. Os estudos de PCR realizados com os iniciadores específicos CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4 confirmaram a identidade dos isolados como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*.

Os resultados desse trabalho corroboram com os de Martínez et al. (2009) que, dentre os 121 isolados de *Colletotrichum* de manga avaliados, de dois locais diferentes, todos foram classificados por meio de análise molecular como *Colletotrichum gloeosporioides*. Porém, a existência de *Colletotrichum acutatum*

como agente causador da antracnose em manga no Brasil foi detectada por Souza et al. (2013), cuja presença, única, foi verificada entre 184 isolados estudados.

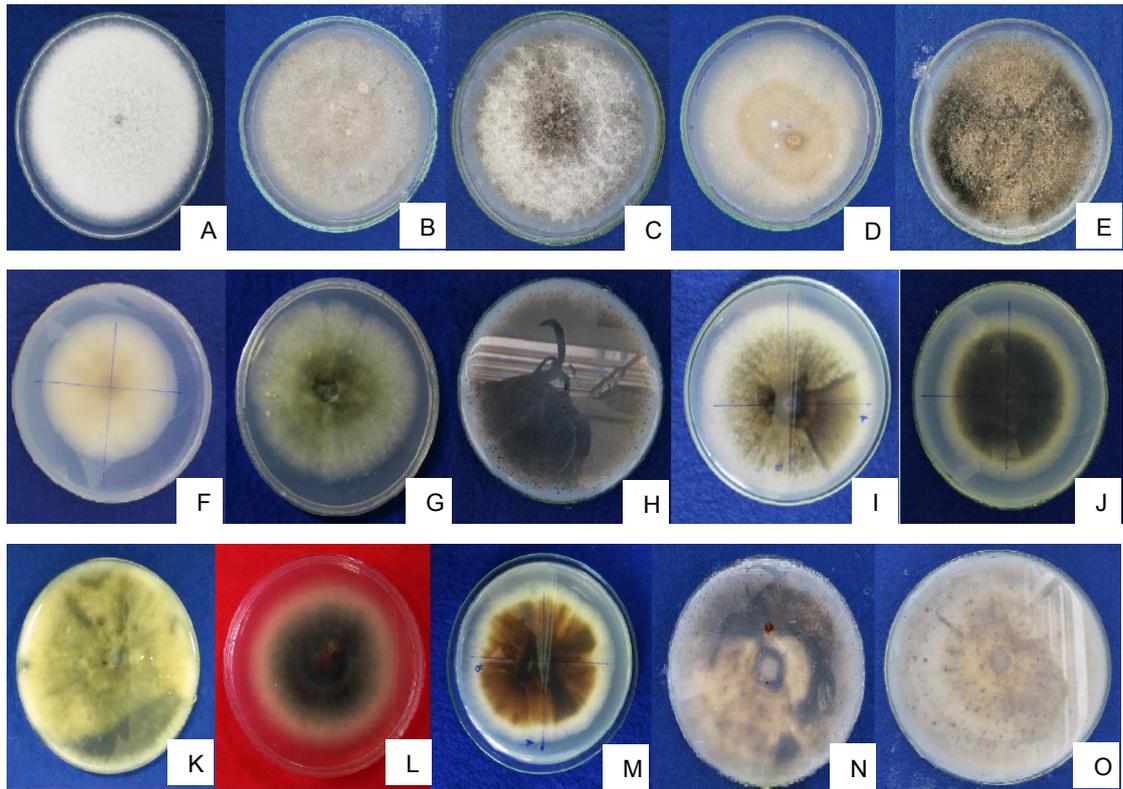
O gel de eletroforese ilustrando o produto da amplificação de 14 isolados da espécie *C. gloeosporioides* encontra-se apresentado na (Figura 7).



**Figura 7.** Padrão de bandas do produto de PCR com primer específico CgInt/ITS4. PM: 100 pb “DNA Ladder Plus” (Fermentas). Números de 1 a 13 correspondem a isolados identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* e o número 14, referente a isolado padrão, classificado como *C. gloeosporioides* mediante sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2. C: “mix” livre de DNA.

### 3.3.3. Caracterização Morfocultural e Patogênica

A coloração das colônias fúngicas (Figura 8) foi bastante heterogênea, variando de branca, cinza, castanha a preta, com predominância das cores branca e cinza. Entretanto, nos primeiros dias de cultivo todas as colônias mostravam-se totalmente brancas, variando para as outras colorações ao longo do seu crescimento. As características apresentadas pelos isolados de *Colletotrichum* são semelhantes às descrições citadas por Sutton (1992).



**Figura 8.** Vista parcial da diversidade dos isolados de manga quanto aos aspectos relativos a cor de colônias. Cor da colônia: A - branca, B – cinza, C - branca/cinza, D - branca/salmão e E cinza/preto. Cor do reverso: F – branco, G – Cinza, H – Preto, I - Branco/cinza, J - branco/preto, K – Cinza esverdeado, L – cinza/preto, M – branco/preto/castanho, N – branco/cinza/preto, O – reverso com pontuações escura.

As variações apresentadas pelas colônias do patógeno podem ser atribuídas ao genótipo de cada isolado, cuja expressão fenotípica está associada ao ambiente de cultivo, assim como a biosíntese de metabólitos secundários, que tem sido caracterizada em *Colletotrichum*, permitindo o surgimento de variações morfoculturais (BAILEY; JERGER 1992; BONETT et al., 2010).

A coloração da borda das colônias variou de branca a cinza, com exceção de um isolado de *C. gloeosporioides* oriundo de folha da variedade Van Dyke, a qual apresentou duas cores: Branco e cinza. No reverso, verificou-se grande variação de cores das colônias, desde branca intensa, até combinações de três cores Branco/Cinza/Preto. Para alguns isolados foi observada a presença de setores e também a presença de pontos pretos no reverso da colônia.

Os resultados do estudo de patogenicidade foi positivo para todos os 52 isolados avaliados, porém com respostas de níveis de patogenicidade diferenciados. Por meio da análise de variância dos dados de patogenicidade foi verificado que houve diferença significativa (Tukey,  $P \leq 0,05$ ) quanto ao comportamento dos isolados avaliados (Tabela 10).

**Tabela 10.** Respostas fenotípicas de 52 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de manga quanto a cor da colônia(C\_C), cor do bordo(C\_B), cor do reverso(C\_R), presença ou ausência de pontuações pretas no reverso (P\_R), presença ou ausência de setores (S) em meio BDA, a 25 °C, sob luz contínua, por sete dias, e patogenicidade média (P), resultante da inoculação de frutos destacados de manga da variedade Palmer. Jaboticabal/SP, 2015.

Isolado	C_C	C_B	C_R	P_R	S	P média	
1M	2	2	7	0	0	1,67	ab
7M	2	2	3	0	0	1,67	ab
7L	2	2	3	0	0	1,67	ab
8M	5	2	3	0	1	1,67	ab
8L	1	1	1	1	0	1,67	ab
10L	3	2	3	1	0	1,33	ab
10M	2	2	8	0	1	2,33	bc
11L	3	2	9	1	0	2,67	bc
11M	2	2	3	0	0	2,00	bc
13M	2	1	5	1	0	2,00	bc
13L	2	2	5	0	0	2,00	bc
15M	2	2	3	0	0	4,00	c
16L	1	1	1	0	0	2,00	bc
16M	1	1	1	0	0	2,33	bc
17L	1	2	2	0	0	2,00	bc
17M	1	1	1	0	0	1,33	ab
18M	3	2	5	1	0	1,33	ab
18L	1	1	1	0	0	1,00	ab
19M	1	1	9	0	0	2,33	bc
19L	1	1	9	0	0	2,00	bc
20M	1	1	9	0	0	1,33	ab
20L	1	1	4	0	0	1,00	ab

21M	3	1	4	0	0	1,67	ab
22M	1	1	4	0	0	2,00	bc
22L	3	2	9	0	0	1,33	ab
24M	2	2	3	0	0	1,00	ab
25M	1	1	1	0	0	1,00	ab
25L	1	1	5	1	0	1,67	ab
26L	1	1	8	0	1	4,00	c
26M	1	1	2	0	0	2,33	bc
28M	1	1	1	0	0	2,33	bc
29M	2	2	9	1	1	3,66	c
40L	2	2	3	0	0	3,66	c
40M	2	2	3	0	0	4,00	c
41M	1	1	4	0	0	4,00	c
43M	3	1	1	0	0	4,00	c
44M	2	2	3	0	0	2,33	bc
50M	2	2	3	0	0	2,33	bc
53L	1	1	5	0	0	2,33	bc
56L	2	2	3	0	0	1,67	ab
59L	2	3	5	1	0	2,67	bc
60L	1	1	1	0	0	1,67	ab
62L	2	2	3	0	0	1,67	ab
63L	2	2	9	0	0	1,67	ab
65L	3	1	3	0	0	1,67	ab
67L	1	1	9	0	0	2,33	bc
69L	3	1	5	0	1	4,00	c
70M	3	1	4	0	0	1,67	ab
71M	1	1	4	0	0	2,00	bc
72M	2	2	3	0	0	2,33	bc
73M	2	2	3	0	0	1,67	ab
74M	1	1	9	0	0	2,00	bc
Testemunha	-	-	-	-	-	0	a

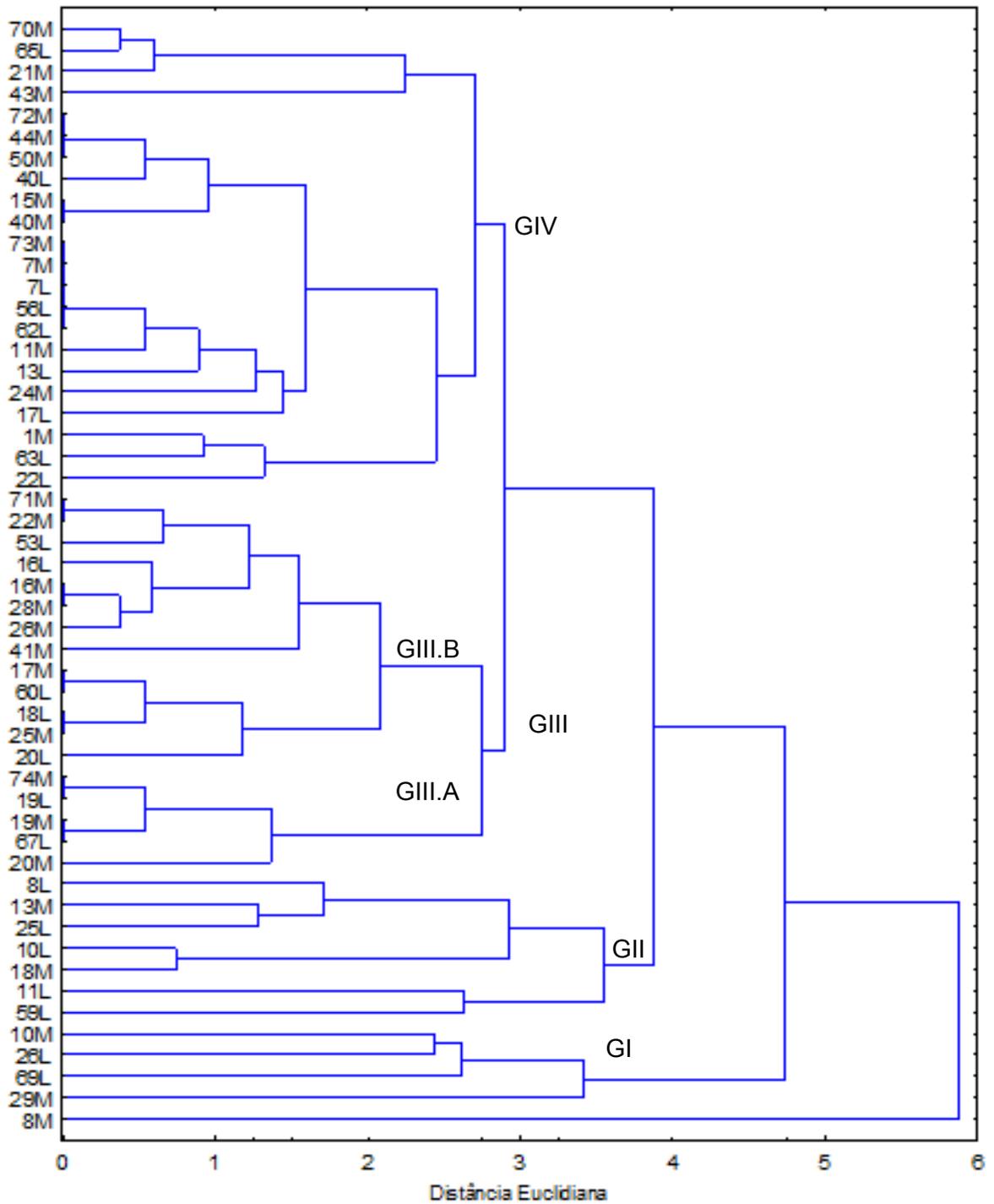
\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. CV: 31,29%; DMS: 1,96.

L – Folhas

M - Frutos

Todos os isolados avaliados mostraram-se patogênicos, em níveis diferenciados. Não foi constatada relação entre o comportamento patogênico e áreas de procedências dos isolados. Também não foi constatada relação entre características morfoculturais e níveis de patogenicidade apresentados pelos isolados avaliados.

Por meio da análise de agrupamento pelo método hierárquico aplicada às variáveis, coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores e pontos no reverso, e patogenicidade, verificou-se grande variabilidade entre os isolados, resultando numa arquitetura envolvendo quatro grupos de isolados caracterizados como grupos I (GI), II (GII), III (GIII) e IV (GIV) (Figura 9).



**Figura 9.** Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de pontuações escuras no reverso, presença ou ausência de setores e comportamento patogênico dos isolados.

O grupo GI, formado pelos isolados 10M (Alda), 26L (Dashirari), 29M (Haden 2H) e 69L (Rent), possui alta dissimilaridade entre os isolados provavelmente por todos apresentarem características morfológicas distintas, porém apresentaram uma característica única em comum: somente esses isolados exibiam a presença de setores.

O grupo GII é formado pelos isolados 8L (Adams), 10L (Alda), 11L (Pele Moça), 13M (Carrier), 18M (Palmer), 25L (Carabao) e 59L (Van Dyke), que caracterizaram-se pela presença de pontuações escuras no reverso. O isolado 8L é o único desse grupo que possui coloração branca para todos os fatores analisados e por conta disso apresenta uma dissimilaridade alta quando comparado com os outros que compõem o grupo.

Os isolados 17M (Torbet), 16L, 16M (Rosa), 18L (Palmer), 19M, 19L (Julima), 20M, 20L (Rocha), 22M (Foice), 25M (Carabao), 26M (Dashirari), 28M (Haden 2H), 41M (Rubi), 53L (Espada Staha), 60L (Palmer), 67L (Coração de boi), 71M (Palmer) e 74M (Rosa) formam o grupo GIII, todos esses isolados apresentam cor branca para a colônia e para o bordo. Esse grupo apresenta dois subgrupos o GIII-A formado por isolados que apresentam o reverso de cor branco/cinza/preto e o subgrupo GIII-B formado por isolados que apresentam o reverso de coloração branco ou branco/cinza.

O grupo GIV foi formado pelos isolados 1M (Winter), 7L, 7M (Petacon), 11M (Pele Moça), 13L (Carrier), 15M (Haden TR), 17L (Torbet), 21M (Lima Peru), 22L (Foice), 24M (Suprema), 40L, 40M (Espada Stahl), 43M (Florigon), 44M (Espada Ouro), 50M (Alfa), 56L (Chok Anan), 62L (Bourbon Vermelha), 63L (Ubá), 65L (Haden 2H), 70M, 72M (Tommy Atkins) e 73M (Palmer). A maioria desses isolados possui características de cor da colônia (cinza), cor do bordo (cinza) e cor do reverso (preto) semelhantes. A dissimilaridade desse grupo é a menor quando comparada com os demais. No dendrograma, tais isolados encontram-se mais próximos ao eixo, com dissimilaridade igual ou próxima a zero.

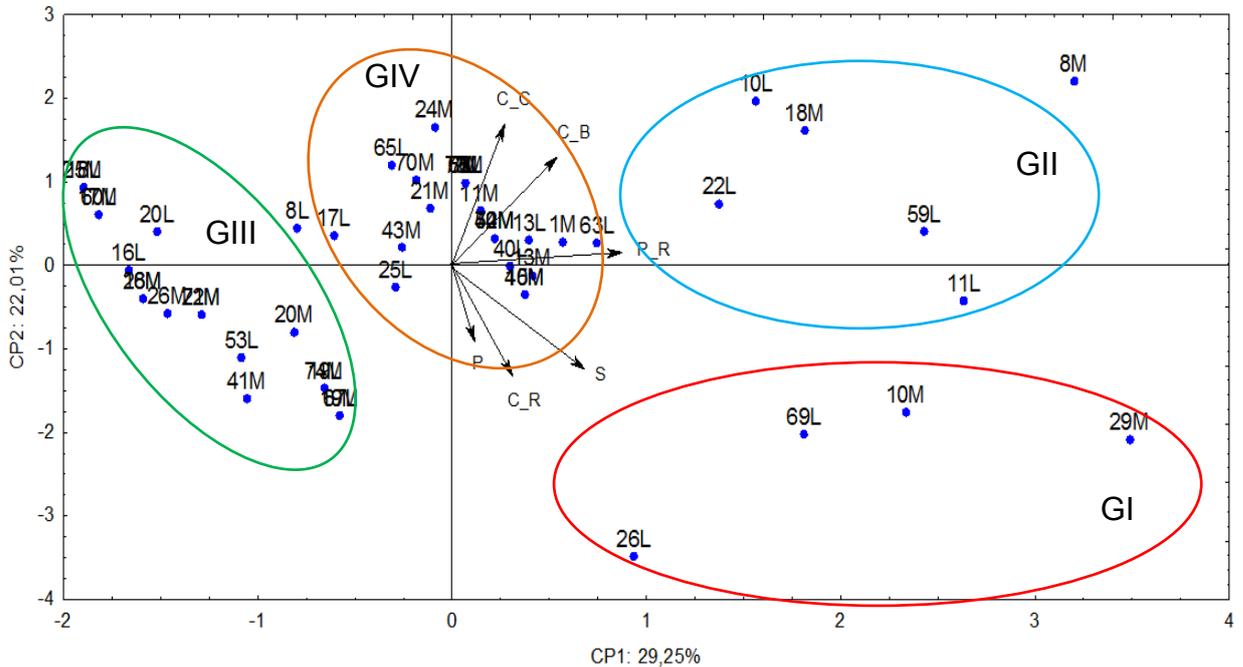
O isolado 8M (Adams) é o único que não se encontra inserido em um grupo, certamente pela característica específica desse isolado. Esse foi o único isolado com a colônia da cor Cinza/Preto/Esverdeado, nem mesmo o isolado proveniente da

folha (8L) da mesma planta apresentou semelhança nas características morfo culturais com este isolado.

Nesse presente estudo houve uma grande variabilidade cultural dos isolados de *C. gloeosporioide* isolados de manga, cujas cores das colônias variaram de branco, cinza e preto. Resultados semelhantes foram também obtidos por Couto e Menezes (2004), quando mediante avaliação de isolados de *C.gloeosporioides* obtidos de quatro variedades de banana, de diversos municípios de Pernambuco, concluíram que os isolados de *Colletotrichum* pertencentes da mesma espécie apresentaram entre si grande variabilidade morfo cultural, no mesmo substrato, admitindo estar este fato relacionado com a possível presença de raças fisiológicas.

A maioria dos isolados avaliados no presente estudo provieram de mangueiras localizadas nos municípios de Pindorama e Votuporanga, de diferentes variedades, sem contudo ser verificado agrupamentos específicos.

As análises mostraram que os dois primeiros componentes principais permitiram explicar 51,26 % da variância contida nas variáveis originais. O componente principal 1 (CP1) e o componente principal 2 (CP2) contribuíram com 29,25% e 22,01% respectivamente da variância remanescente. Assim, o conjunto inicial de seis variáveis dependentes passou a ser caracterizado por duas novas variáveis latentes independentes, o que possibilitou sua localização em figuras bidimensionais (Figura 10) (ordenação dos isolados por componentes principais).



**Figura 10.** Biplot com representação da projeção das variáveis: Cor da colônia (C\_C), cor do reverso (C\_R), cor do bordo (C\_B), presença de pontuações no reverso (P\_R), presença de setores (S) e patogenicidade (P), nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com a discriminação dos 52 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, Jaboticabal/SP.

Pode-se observar que as correlações positivas são responsáveis pela discriminação dos genótipos localizados à direita de CP1 e a correlação negativa pela discriminação dos genótipos, à esquerda de CP1. As variáveis com correlação positiva são as responsáveis pela discriminação dos isolados localizados na parte superior de CP2 e as variáveis com correlação negativa são as responsáveis pela discriminação dos isolados localizados na parte inferior de CP2, observa-se a formação dos mesmos grupos GI, GII, GIII e GIV (Figura 10).

É possível identificar isolados que possuem características particulares, pela distribuição na análise de coordenadas principais, aqueles com característica única se encontram distantes do centro da figura (fluxo de massa).

Os Isolados 8M (Adams) e 29M (Haden 2H) são os mais distantes do fluxo de massa, por possuírem características particulares quando comparado com os demais, o Isolado 8M é o único que possui coloração da colônia

Cinza/Preto/Esverdeado, e o isolado 29M é o único que apresenta tanto a presença de setor quanto a presença de pontuações escuras no revertido.

Nesse estudo foi constatado alto polimorfismo de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de manga, sendo inclusive superior a isolados oriundos de de tomate, manga e lima ácida „Tahiti“ (MARTÍNEZ et al., 2009). Dentre tais fatores responsáveis por tais comportamentos incluem-se as características intrínsecas de cada isolado, ou próprios de cada gênero, ou decorrente de aspectos relacionados aos tipos de meios de cultivo, temperatura ambiente e luminosidade (MAIA et al., 2011; NECHET & ABREU 2002). Dessa forma, tais resultados confirmam informações contidas na literatura de que apenas caracteres morfológicos não são suficientes para o estabelecimento de táxons em *Colletotrichum* (ANDRADE et al., 2007; MEHTA, MEHTA 2010). Entretanto, o conhecimento das características fenotípicas dos isolados são importantes em trabalhos de rotina, e para conhecimento geral e acadêmico dos respectivos gêneros de fungos, incluindo *Colletotrichum*.

#### **3.3.4. Avaliação de fungicidas**

Os isolados 15M (Haden), 26L (Dashirari), 29M (Haden), 40L, 40M(Espada), 41M (Rubi), 43M (Florigon) e 69L (Rent) foram submetidos ao teste de sensibilidade; esses foram selecionados por apresentarem uma nota de patogenicidade entre 3,5 a 4.

Os dados referentes ao diâmetro médias das colônias de *C. gloeosporioides* submetidos a 4 concentrações de fungicidas (0; 0,1; 1; 10; 100) de três fungicidas (Azoxystrobina, Tebuconazole e *Bacillus subtilis*), incluindo a testemunha, foram significativos para o teste F, assim como à interação Doses X Fungicida. Todos os fungicidas diferiram entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 11), havendo relação negativa direta entre concentração e tamanho das colônias, para os três fungicidas avaliados.

**Tabela 11.** Diâmetro médio das colônias de *Colletotrichum gloeosporioides* após 7 dias de incubação, em meio BDA acrescido de três fungicidas, sob cinco concentrações de ingrediente ativo. Jaboticabal/SP, 2015.

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	<i>Bacillus subtilis</i>	Tebuconazole	Azoxystrobina
0	77,36 a	77,34 a	78,22 a
0,1	71,32 b	37,98 a	71,15 b
1	66,71 b	20,99 a	61,79 b
10	46,56 b	10,76 a	53,06 b
100	0 a	0 a	7,94 a

\*Medias seguidas da mesma letra na linha não difere entre si a nível de  $p(<0,05)$  de significância pelo teste de Tukey. DMS=11,94.

Nas doses 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, 1 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> o fungicida químico Tebuconazole apresentou o menor diâmetro médio das colônias de *C. gloeosporioides in vitro* quando comparados com o fungicida químico Azoxystrobina e o agente biológico *Bacillus subtilis*.

Na dose 100 mg.L<sup>-1</sup> o único fungicida que apresentou crescimento foi o fungicida Azoxystrobina, uma estrobilurina das mais sistêmicas, com atividade predominantemente preventiva, mas também com ação curativa e anti-esporulante, que fica aderida acumulam-se na cutina durante a pulverização e após a ação de intempéries (TOFOLI et al., 2002).

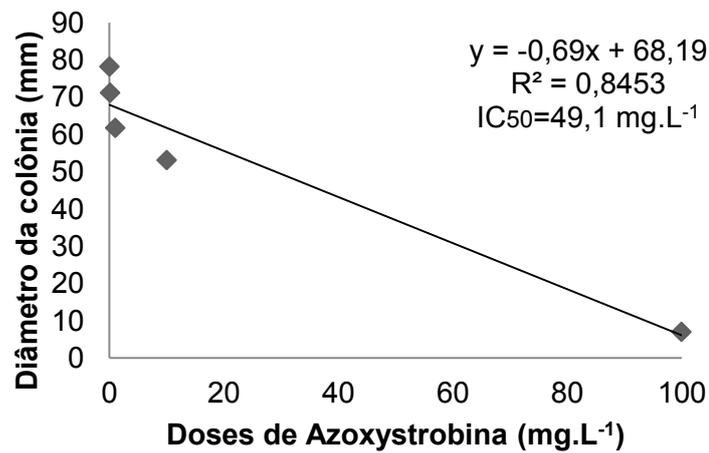
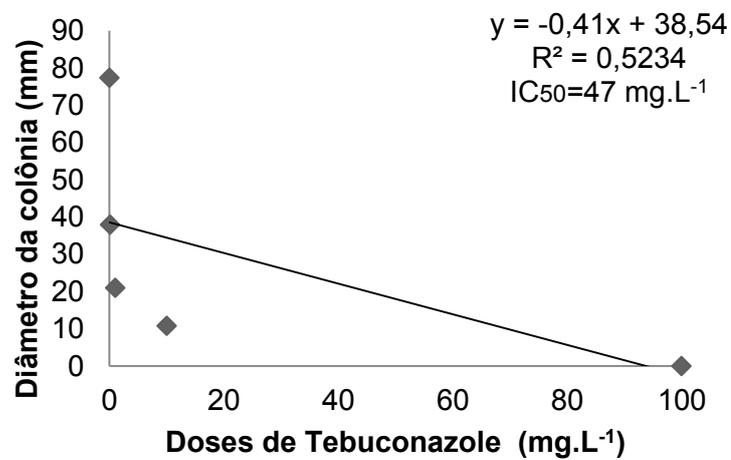
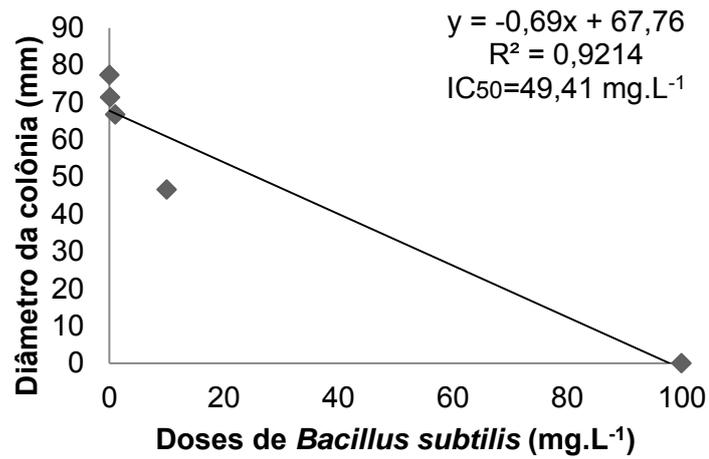
Lopes et al. (2015) testou diversos fungicidas e a combinação de dois ingredientes ativos em oito isolados de *Colletotrichum* spp., os melhores resultados de inibição foram a combinação Trifloxistrobina + Tebuconazole independente da dose aplicada, porém nenhum fungicida testado foi eficiente na inibição total da germinação de conídios.

A concentração 100 mg.L<sup>-1</sup> não apresentou crescimento micelial até o sétimo dia de avaliação sob os tratamentos *Bacillus subtilis* e o fungicida Tebuconazole, porém o fungicida Azoxystrobina ainda apresentou crescimento micelial *in vitro*. Tavares e Souza (2005) também não alcançaram 100% da inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* mesmo usando concentrações de azoxystrobina de até 1000 mg.L<sup>-1</sup>. A insensibilidade do isolado ao fungicida confirma a presença de resistência cruzada para esse grupo de fungicidas, confirmando observações de Spalding (1982) e Tavares e Souza (2005).

O fungicida Tebuconazole pertence ao grupo químico dos triazóis que atuam na formação do ergosterol, um importante lipídio fúngico para a formação da membrana das células. A ausência desta camada leva ao colapso da célula fúngica

e à interrupção do crescimento micelial (BRASIL, 2015). Tavares e Souza (2005) alcançaram um resultado de 100% de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* apenas com  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de Tebuconazole.

As concentrações influenciaram no crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, ajustando-se à equação do modelo linear. O crescimento dos isolados mostrou-se inversamente proporcional à concentração dos fungicidas avaliados (Figura 11).



**Figura 11.** Representação gráfica, ajuste das equações de regressão e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) da variável diâmetro da colônia, submetidas a cinco concentrações dos fungicidas *Bacillus subtilis*, Azoxystrobina e Tebuconazole.

O fungicida tebuconazole proporcionou menor diâmetro do micélio em todas as concentrações, quando comparado com azoxystrobina e *Bacillus subtilis*. O fungicida Folicur 200 EC é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis com ação preventiva e curativa, atua no bloqueio da biossíntese de ergosterol, que é um importante lipídio fúngico para a formação da membrana das células. A ausência desta camada leva ao colapso da célula fúngica e à interrupção do crescimento.

Os fungicidas químicos tebuconazole e azoxystrobina apresentaram IC<sub>50</sub> igual a 47,0 e 49,1 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente, e o agente biológico *Bacillus subtilis* IC<sub>50</sub> igual a 49,41 mg.L<sup>-1</sup>, assim esses três fungicidas ficam classificados pela escala de Edgington et al. (1971) como de baixa eficiência (IC<sub>50</sub> entre 10 - 50 mg.L<sup>-1</sup>).

O serenade é um fungicida bactericida microbiológico que possui múltiplos modos de ação. Os lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* QST713 presentes na formulação atuam na membrana celular das estruturas reprodutivas do fungo, provocando sua deformação e produzindo rupturas. É usado em pulverização preventiva no controle de doenças

### 3.4. CONCLUSÕES

- Todos os isolados desse estudo são da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*;
- Há uma grande variabilidade morfocultural entre os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de folhas e frutos de manga.
- Todos os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* estudados são patogênicos quando inoculados em manga „Palmer“.
- As características morfoculturais são polimórficas o que impossibilita a classificação do fungo por meio desses parâmetros;
- Todos os fungicidas testados são considerados de baixa eficiência no controle *in vitro* do *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de folhas e frutos de manga.
- São necessários dados sobre um conjunto maior de isolados para uma mais precisa avaliação da prevalência das espécies envolvidas na antracnose no Brasil.

### 3.5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 32(1):21-31, 2007.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2010. 07 p.
- BAILEY, J.A.; JEGER, J. M. **Colletotrichum: biology, pathology control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, 388 p. 1992
- BONETT, L. P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R. G. A.; AQUINO, T. F.; WENZEL, J.B. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência**, Guarapuava - PR. v.6 n.3 p. 451 – 463, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. AGROFIT. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 28 jun. 2015.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, 39: 183-204, 2009.
- CASTELLANI, A (1939). Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42, 225-226.
- COUTO, E.F. & MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, 29:406-412. 2004
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds, *Phytopathology*, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- FAO. **Food and Agricultural Organization**. Review of recent world market situation for mangoes, mangosteens, guavas and tropical fruits. 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 17 maio. 2015.
- FAY, E. F.; LUIZ, A. J.; ABAKERLI, R. B.; RODRIGUES, N. R.; TOLEDO, H. H. B. de; GALVÃO, T. D. L.; MEDINA, V. M.; MARTINS, D. dos S.; TAMANISHI, O. K.; SOUZA, D. R. C. de; ROSA, M. A.; BONIFACIO, A. Pós-colheita do mamão (*Carica papaya* L.): limite máximo de resíduos de etilenobisditiocarbamatos (EBDCs). 2007.
- FREEMAN S, KATAN T. SHABI E (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease** 82:596-605.

GUNAWARDHANA, P. L. T.; SENEVIRATHNA, A. M. W. K.; ADIKARAM, N. K. B.; YAKANDAWALA, D. M. D. A phenetic analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from selected host plants. **Ceylon Journal of Science** (Biological Sciences), Sri Lanka, v. 38, n. 2, p. 57-66, 2009.

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

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (2009). Lavoura permanente e temporária. Disponível em: Acessado em: 17 de maio de 2015.

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

LOPES, L. N. S.; SILVA, A. S.; PEREIRA, C. C. O.; MENEZES, I. P. P.; MALAFAIA, G.; LIMA, M. L. P. Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Multi-Science Journal**. 1(1):106-114, 2015.

LÓPEZ, A. M. Q. 2001. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. In: LUZ, W.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas - RAPP**, Passo Fundo, Brasil. v. 9, p. 291-318, 2001.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCA, W. L. A.; MAIA, J. B.; ABREU, M. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Biosci. J.**, Uberlândia, 27:(2):205-210, 2011.

MARTÍNEZ, E.P.; HÍO, J. C.; OSORIO J. A.; TORRES, A. T. Characterization of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. **Agronomía Colombiana**, 27(2), 211-218, 2009

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

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

MIRANDA, E. F. O. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003

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

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

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

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

PLOETZ, R. C. **Anthracoze of mango: Management of the most important pre- and post-harvest disease**. 2010. Disponível em: [http://www.mango.org/media/55703/anthracnose\\_of\\_mango.pdf](http://www.mango.org/media/55703/anthracnose_of_mango.pdf). Acesso em: 22 jun. 2015.

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

SOUZA, A. **Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em mangueiras**. 91 f. 2011. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

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

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

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciênc. agrotec.**[online]. vol.29, n.1, pp. 52-59, 2005.

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

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

## **CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A ANTRACNOSE EM GOIABA**

**RESUMO** – O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de goiaba (*Psidium guajava* L.), porém sua participação no mercado internacional da fruta “*in natura*” é discreta, principalmente pela mesma ser altamente perecível e exigir maiores cuidados no transporte e no acondicionamento. O estado de São Paulo é o maior produtor de goiaba do Brasil, no entanto problemas da ordem fitossanitária afetam a produtividade e a qualidade dos frutos, provocando prejuízos. A antracnose é a principal doença pós-colheita da goiaba, porém muitos frutos já apresentam sintomas na lavoura quando o controle não é adequado e as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença. Os objetivos desse trabalho foram caracterizar a diversidade genética e morfo cultural de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de goiabeiras das regiões produtoras do estado de São Paulo, determinar a sensibilidade micelial “*in vitro*”, estimando o IC<sub>50</sub> (Concentração efetiva capaz de inibir em 50% do crescimento micelial), de isolados submetidos a três fungicidas. Os 27 isolados de *Colletotrichum* spp. foram submetidos a identificação molecular através dos primers específicos, Calnt e Cglnt juntamente com o ITS4, e posteriormente aos 11 primers ISSR selecionados para o estudo de diversidade. O teste de sensibilidade foi realizado com 3 fungicidas (tebuconazole, azoxystrobina e *Bacillus subtilis* linhagem QST 713) e 4 concentrações (0,1; 1;10 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de ingrediente ativo), em placas de Petri contendo BDA, comparado com a testemunha, sem fungicidas. Todos os isolados foram classificados como *Colletotrichum gloeosporioides*, a diversidade genética e morfo cultural entre os isolados foi alta, sendo os isolados de mesma região geográfica os de maior similaridade genética, mesmo quando esses foram coletados de variedades diferentes de goiaba. O teste de sensibilidades mostrou que os produtos azoxystrobina e tebuconazole são de baixa eficiência (IC<sub>50</sub> 10-50mg.L<sup>-1</sup>) e o *Bacillus subtilis*, ineficiente.

**Palavras-chave:** *Psidium guajava*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Fungicidas.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de goiaba (*Psidium guajava* L.), com uma produção de aproximadamente 300 mil toneladas. Os estados de São Paulo e Pernambuco correspondem, em conjunto, por mais de 80% da produção nacional de goiaba. O estado de São Paulo, principal estado produtor, produz aproximadamente 112 mil toneladas de goiabas por ano (IBGE, 2014), das quais mais de 50% são destinadas para o consumo *in natura* (TOKAIRIN; CAPPELLO; SPOSITO, 2014).

Um entrave na cadeia produtiva da goiaba são as perdas provocadas por pragas e doenças. A goiabeira, durante as diferentes fases de seu desenvolvimento, pode sofrer ataques de um número de doenças relativamente grande sendo as mais comuns a ferrugem, verrugose, antracnose e bacteriose. As doenças pós-colheita representam sérios prejuízos à cultura, uma vez que compromete, além da qualidade, a quantidade de frutos colhidos, sendo responsável por até 90% do total de perdas causadas por fitopatógenos, principalmente para os frutos que serão destinados a comercialização *in natura* (DANTAS et al., 2003).

A antracnose ou mancha chocolate é uma doença fungica, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc (BRASIL, 2015), cuja forma sexuada corresponde a *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrek. Os sintomas da antracnose caracterizam-se, inicialmente, por manchas necróticas pequenas, deprimidas e de coloração marrom na superfície dos frutos. Com a evolução da doença, as lesões aumentam, ficam deprimidas e coalescem. Sob condições de alta umidade, uma massa de esporos alaranjada se forma sobre as lesões (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

No Brasil, o Ministério da Agricultura reconhece apenas o *Colletotrichum gloeosporioides* como patógeno causador da antracnose em goiaba, e existe recomendação de controle apenas para essa espécie. Assim, informações quanto ao espectro de espécies de possíveis outras espécies associadas, além de rever as suas medidas de controle, é também importante no contexto aos programas de quarentena e no melhoramento genético das plantas visando resistência (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; ANDRADE et al., 2007; CAI et al., 2009).

No Brasil, o controle da antracnose da goiaba baseia-se no uso de fungicidas de contato ou sistêmicos (FERRAZ, 2010; SOUZA, 2011). Porém, considerando-se que nos últimos anos o controle do patógeno vinha sendo alcançado com sucesso, suspeita-se que em virtude do uso continuado de fungicidas específicos, possa ter havido seleção e incremento da frequência de linhagens do patógeno, resistentes aos principais ingredientes ativos (SOUZA, 2011), também não se descarta que as próprias práticas culturais possam ter contribuído à formação de grupos de especialização patogênica (LIMA FILHO et al., 2003).

Técnicas moleculares associadas às características morfoculturais e alguns aspectos biológicos têm sido empregadas para diferenciar e caracterizar espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em goiaba (TOZZE JÚNIOR; BUENO; MASSOLA JÚNIOR, 2004; TAVARES, SOUZA 2004; PEREIRA 2009). Nesse sentido, a caracterização molecular, morfocultural e a patogenicidade poderiam contribuir à identificação de espécies de *Colletotrichum* patogênicas a goiaba, que, além de demonstrar sua variabilidade, esses resultados poderiam criar subsídios com vistas ao controle da doença.

Por muitos anos, a identificação das espécies de *Colletotrichum* e vários outros gêneros de fungos baseava-se na ontogênese, morfologia, aspectos ecológicos e faixa de hospedeiros (SUTTON, 1992; TEBEEST et al., 1997; PHOTITA et al., 2005; THAUNG, 2008). Porém, tem-se verificado que a caracterização baseada exclusivamente nesses critérios, nem sempre oferecem a confiança necessária, devido às grandes diversidades morfológicas e fenotípicas resultantes de influências ambientais (HYDE et al., 2009), além de aspectos filogenéticos de alguns patógenos (TAYLOR, 1995). Ao longo dos anos e pelas dificuldades apontadas, técnicas mais modernas e seguras têm sido utilizadas, com destaque às moleculares (PERES et al., 2002; DU et al., 2005; PHOTITA et al., 2005; ABANG et al., 2006; WHITELAW-WECKERT et al., 2007; THAN et al., 2008; KIM et al., 2009; NGUYEN et al., 2010).

Os marcadores moleculares ISSR permitem estudar a diversidade genética em *Colletotrichum gloeosporioides*. Técnicas baseadas em PCR ISSR, como utilizado nesse estudo, são rápidas quanto à sua aplicação, reprodutíveis, e produzem um grande número de bandas polimórficas.

Considerando a importância da identificação, frequência e distribuição das possíveis espécies de *Colletotrichum* associadas à goiabeira, no estado de São Paulo, os objetivos desse trabalho foram: (i) realizar a caracterização morfo-cultural e molecular, e de diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de goiabeiras de diversos municípios produtores do estado de São Paulo, (ii) caracterizar os isolados quanto à patogenicidade, (iii) avaliar a eficiência dos fungicidas químicos azoxystrobina, tebuconazole e Serenade<sup>®</sup>, um fungicida biológico originário de *Bacillus subtilis* linhagem QST 713.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

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

No estudo foram utilizados 27 isolados de *Colletotrichum* oriundos de frutos sintomáticos de três variedades de goiaba, Tailandesa, Paluma e Pedro Sato. Essas foram coletadas em quatro municípios do estado de São Paulo, sendo: Itápolis, Vista Alegre do Alto, Valinhos e distrito de São Lourenço do Turvo, pertencente ao município de Matão (Tabela 12; Figura 12). Tais frutos foram armazenados em caixas térmicas e levados para o Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, para isolamento do patógeno.

Todos os frutos coletados procederam de áreas comerciais, com emprego de todas as práticas culturais indicadas para a cultura, incluindo o uso de defensivos agrícolas.

**Tabela 12.** Locais de coletas das amostras dos frutos, identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp., e variedades amostradas.

Origem	Identificação	Variedade
Itápolis SP	1	Paluma
Itápolis SP	2	Paluma
Itápolis SP	3	Paluma
Itápolis SP	4	Paluma
Itápolis SP	7	Paluma
Itápolis SP	8	Paluma
Itápolis SP	9	Paluma
Itápolis SP	10	Pedro Sato
Itápolis SP	11	Pedro Sato
Itápolis SP	12	Pedro Sato
Itápolis SP	21	Paluma
Itápolis SP	22	Paluma
São Lourenço do Turvo SP*	Pr	Paluma
São Lourenço do Turvo SP	1	Paluma
São Lourenço do Turvo SP	2	Paluma
São Lourenço do Turvo SP	3	Paluma
São Lourenço do Turvo SP	4	Paluma
São Lourenço do Turvo SP	5	Paluma
Valinhos SP	1	Tailandesa
Valinhos SP	2	Tailandesa
Valinhos SP	3	Tailandesa
Vista Alegre do Alto SP	LD	Paluma
Vista Alegre do Alto SP	LV	Paluma
Vista Alegre do Alto SP	1	Pedro Sato
Vista Alegre do Alto SP	2	Pedro Sato
Vista Alegre do Alto SP	3	Tailandesa
Vista Alegre do Alto SP	4	Tailandesa

São Lourenço do Turvo SP\* - Distrito pertencente ao município de Matão.

Pr - Área de produção da Predileta

LD - Lesão dura

LV - Lesão Vermelha

Para melhor entendimento da localização geográfica dos locais de coleta, na Figura 12 estão destacados as microrregiões do estado de São Paulo.



**Figura 12.** Microrregiões correspondentes aos municípios onde foram coletadas amostras de frutos de goiaba para isolamento de *Colletotrichum* spp.

Previamente ao isolamento do patógeno, os frutos colhidos foram mantidos em salas de laboratório, a temperatura ambiente, de 25 a 30 °C, com fotoperíodo 12/12 horas, sendo o isolamento do patógeno realizado subsequentemente ao aparecimento e definição dos sintomas. Para isso, foram retirados fragmentos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> de tecido sintomáticos, os quais, após desinfestação superficial, lavagem em água estéril e secagem em papel de filtro, foram depositados em meio batata dextrose ágar (BDA) contidos em placas de Petri. Posteriormente, as placas de Petri foram armazenadas em estufas para B.O.D., a 25°C constante, e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias, foram selecionadas as colônias típicas de *Colletotrichum* spp., seguido de repicagem e, posteriormente, da identificação, tomando como referência aspectos culturais e morfofisiológicos, (SUTTON, 1992). A partir de colônias típicas e puras do patógeno foram obtidas culturas monospóricas, seguido do seu armazenamento em óleo mineral. Tais isolados de *Colletotrichum* spp. foram utilizados nos estudos subsequentes.

#### 4.2.2. Extração de DNA dos isolados de *Colletotrichum* spp.

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

As extrações de DNA foram baseadas no protocolo de Kuramae-Izioka (1997). Em cada tubo eppendorf contendo 0,1 g de micélio macerado de cada isolado, foi adicionado 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 100 mM pH 8,0 e SDS 0,5% (p/v)]. Os tubos com as soluções foram agitados em vórtex e em seguida levados a banho-maria a 65 °C por uma hora, sendo agitados delicadamente a cada 10 minutos. Após serem retirados do banho-maria, foram acrescentados 400 µL de acetato de potássio (5 M). A solução foi misturada por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Após a incubação em gelo, as amostras foram centrifugadas a 15.294 g por 10 minutos a 10 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos tubos com o auxílio de uma pipeta e em seguida acrescentado a esse volume 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sob as mesmas condições. Novamente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Posteriormente foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado à solução, sendo então misturada cuidadosamente e acondicionada em freezer -20 °C.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos com as soluções foram centrifugados a 15.294 g por 20 minutos a 10 °C, descartando o sobrenadante, sendo o “pellet” lavado com 700 µL de etanol 70% (v/v). Mais uma vez os tubos foram submetidos à centrifugação a 15.294 g por 7 minutos, a 10 °C, e a fase líquida foi novamente descartada e o “pellet” foi colocado para secar. O “pellet” foi

ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 100 mM pH 8,0) por 24 horas a 4 °C.

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

#### **4.2.3. Reações com primers específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides***

As amostras de DNA extraídas de *Colletotrichum* spp. foram submetidas a reação de PCR com primers desenhados e desenvolvidos por Mills et al. (1992a), para amplificação de uma banda exclusiva de cerca de 500 pb para Calnt2 (5"GGGGAAGCCTCTCGCGG3"), específico para *C. acutatum*, e de aproximadamente 450 pb para CgInt (5"GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3"), específico para *C. gloeosporioides*, os quais foram utilizados em conjunto com o primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificação da região ITS (WHITE et al., 1990). Como padrões de amplificação foram utilizados um isolado de *C. acutatum* e um isolado de *C. gloeosporioides*, previamente identificados, mediante sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, utilizando-se o par de primers ITS1/ITS4. O sequenciamento das amostras padrão foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microorganismos, do Departamento de Tecnologia, da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP.

Para as reações de PCR foram utilizados o tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); dNTP"s (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 2,0 U de Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, primer 5 pmol, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL. Para a amplificação com os pares de primers Calnt2/ITS4 e CgInt/ITS4 as reações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf),

sendo utilizado um ciclo a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 64 °C por 1 minuto para amplificação com o primer Calnt2/ITS4 ou a 54 °C para o Cglnt/ITS4 e 72 °C por 1 minuto, e para finalizar 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,0 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb “DNA Ladder Plus” (Fermentas).

#### 4.2.4. Reação PCR-ISSR

Nas reações de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); dNTP’s (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 2,0 U de Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, primer 5 pmol, 80 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL.

Na amplificação com os 11 primers ISSR (Tabela 13), as reações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf), sendo utilizado um ciclo a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, temperatura variável de acordo com o primer por 1 minuto, e para finalizar 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>) e visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad). Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb “DNA Ladder Plus” (Fermentas).

Os primers utilizados foram da marca Invitrogen Life Technologies. A escolha desses foi baseada em resultados de pesquisas relativas às espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, ou antecedentes quanto ao alto grau de polimorfismo obtido (GUPTA et al., 1994; RATANACHERDCHAI et al., 2010; RAMPERSAD 2013).

**Tabela 13.** *Primers* utilizados, suas respectivas sequências, temperaturas de amplificação e número de fragmentos observados nos isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes de frutos de goiaba.

Primer	Sequência (5' 3')	Temperatura de Amplificação	Número de fragmentos
P7	ACAACAACAACAACA	48 °C	08
P8	AACAACAACAACAAC	48 °C	09
P10	AAGAAGAAGAAGAAG	48 °C	07
P12	GACAGACAGACAGACA	48 °C	10
P14	GACACGACACGACAC	53,8 °C	14
P20	CTGAGAGAGAGAGAGAGA	48 °C	12
P22	GAGCAACAACAACAACA	53,8 °C	10
AF80820	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48 °C	08
AF80821	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48 °C	10
AF80822	GAGAGAGAGAGAGAGAT	41,7°C	08
AF80824	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	48 °C	08

#### **4.2.5. Caracterização morfo cultural e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp.**

Todos os isolados utilizados na identificação molecular foram previamente agrupados, tomando-se como referência a procedência. Em seguida, foram avaliados quanto ao aspecto e coloração das colônias. Para tal, discos de colônias, de 5 mm de diâmetro foram extraídos das margens de culturas de sete dias, cultivadas em meio BDA, e transferidos para novas placas contendo o mesmo meio de cultivo. A seguir, tais culturas foram incubadas a temperatura de 25°C, sob luz contínua. Após dez dias de incubação, período em que as colônias alcançaram uniformemente as bordas das placas e atingiu a estabilização da sua coloração, procederam-se avaliações das mesmas, borda e reverso, sendo também avaliada a possível presença de setores. Para cada isolado foram utilizadas três repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri contendo os respectivos isolados

A partir das avaliações quanto à coloração das colônias, bordo, reverso e possível presença de setores desenvolveu-se uma escala qualitativa das notas (Andrade et al., 2007, modificado) para a classificação dos isolados (Tabela 14).

**Tabela 14.** Escala de notas referentes à coloração de colônias, do bordo e do reverso, e determinação quanto à possível presença de pontos no reverso e de setores.

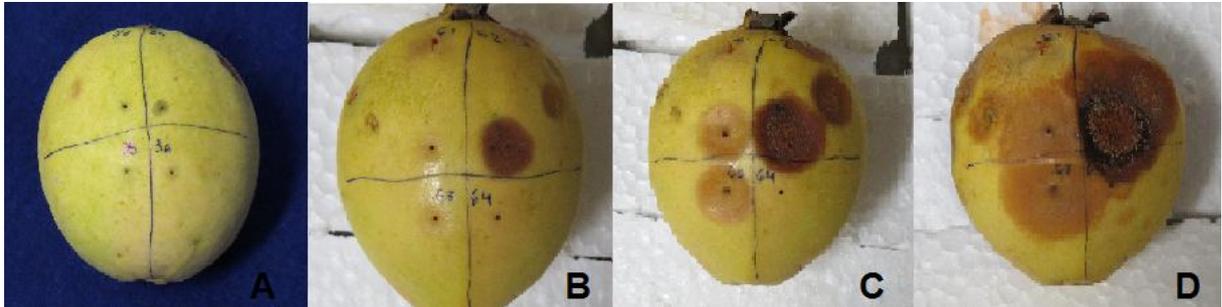
Escalas	C_C	C_B	C_R	S
1	Branco	Branca	Branca	+
2	Cinza	Cinza	Cinza	-
3	Branco/Cinza	Branco/Cinza	Preto	
4	Branco/Salmão	Branco/Salmão	Branco/Cinza	
5	Cinza/Preto	Cinza/Preto	Branco/Salmão	
6	Branco/Preto	Branco/Preto	Branco/Marrom	

C\_C: Coloração das colônias; C\_B: Coloração do bordo; C\_R: Coloração do reverso; S: Presença (+) ou ausência de setores (-).

Para o teste de patogenicidade, frutos sadios de goiaba „Pedro Sato“ foram submetidos a desinfestação de acordo com Sanchez (1990). Posteriormente, os frutos foram feridos superficialmente com um agulha esterilizada. Com auxílio de uma pipeta, sobre os ferimentos foi depositada uma gota de 20 µL de suspensão contendo  $1,5 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, de cada um dos isolados (culturas de 7 dias em BDA), sobre o ferimento. A seguir, os frutos foram justapostos e mantidos em bandejas de plástico contendo espuma embebida com água, sendo selados com filme plástico, e mantidas em câmara fria a de 25°C, com fotoperíodo de 48h (MORAES; TANAKA; MASSOLA JÚNIOR 2013). As avaliações foram feitas aos 2, 4 e 6 dias após a inoculação, sendo adotada a seguinte escala de notas: 0 – frutos sem sintomas; 1 – início de formação de pequenas lesões no local do ferimento; 2 – lesões superficiais, com diâmetro inferior a 3,0 cm; 3 – lesões com diâmetro superior a 3,0 cm, com áreas encharcadas; 4 – lesões extensivas, deprimidas e escuras, com esporulação abundante e visível (ANDRADE et al., 2007) (Figura 13), a nota final da patogenicidade foi deferida no último dia de avaliação.

O experimento, conduzido em duplicata, foi realizado mediante delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de um fruto inoculado em um ponto na região mediana dos frutos. Como

controle, frutos foram inoculados com água estéril. O isolamento dos patógenos dos frutos doentes foi feito no final do experimento para completar o postulado de Koch.



**Figura 13.** Vista parcial de fruto de goiaba da variedade Pedro Sato indicação do ponto de ferimento e inoculação de *Colletotrichum* spp. (A). Notas atribuídas: A (nota zero, ausência de sintomas); B (nota 1) C (nota 2) e D (notas 3 e 4, respectivamente com lesões maiores que 3 cm de diâmetro e lesões encharcadas e escuras resultantes da elevada esporulação do patógeno).

#### 4.2.6. Sensibilidade micelial de *Colletotrichum* spp. a fungicida

Para tal, os fungicidas foram diluídos em série e ajustados para às concentrações 0,1; 1;10 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (Tabela 15), os quais foram adicionados ao meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) fundente (45°C). As Placas de Petri contendo BDA sem fungicidas foram utilizadas como testemunhas. Após 24 horas do preparo do meio de cultivo, discos de colônias dos respectivos isolados foram transferidos para o centro de placa de Petri contendo meio + fungicidas. Os discos de colônias, de 5 mm de diâmetro, com aproximadamente sete dias de repicagem, foram obtidos da periferia das colônias. As placas permaneceram a uma temperatura aproximada de 25°C±2 °C e fotoperíodo de 12 h, por um período de sete dias. O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri. Os isolados submetidos ao teste de sensibilidade foram aqueles que apresentaram parogenicidade entre 3,5 a 4.

As medições foram realizadas no sexto dia, no tratamento testemunha, as colônias alcançaram a periferia das placas. A partir do tamanho das colônias foi determinada a porcentagem de inibição que, a partir de tais dados foi determinado o

valor IC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração efetiva necessária para inibir o crescimento micelial em 50%.

Após o cálculo do IC<sub>50</sub>, os fungicidas foram classificados em 4 categorias de eficiência, de acordo com a escala de Edgington et al. (1971), citada por Tavares(2005), sendo: alta eficiência quando IC<sub>50</sub> < 1 mg.L<sup>-1</sup>; moderada eficiência, quando IC<sub>50</sub> 1 ≤ 10 mg.L<sup>-1</sup>; e baixa eficiência, quando IC<sub>50</sub> ≤ 10-50 mg.L<sup>-1</sup> e; insensível, quando IC<sub>50</sub> > 50 mg.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 15.** Fungicidas avaliados no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp., e seus nomes comerciais, grupos químicos e concentração de ingrediente ativo.

Ingrediente Ativo	Nome Comercial	Grupo químico	CIA*
Tebuconazole	Folicur 200 EC <sup>®</sup>	Triazol	200 g/L
Azoxystrobina	Amistar 500 WG <sup>®</sup>	Estrobilurina	500 g/L
<i>Bacillus subtilis</i> linhagem QST 713	Serenade <sup>®</sup>	Agente Biológico	13,68 g/L

\*Concentração de ingrediente ativo

#### 4.2.7. Análise dos dados

Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada primer ISSR foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética: presente (1) ou ausente (0). As matrizes binárias foram usadas para a obtenção das estimativas de similaridades genéticas, com auxílio do programa XLSTAT (Addinsoft®, versão 2014), empregando-se o coeficiente de Jaccard. Para o agrupamento dos genótipos foi utilizado o método de médias não ponderadas das similaridades UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average). O coeficiente de variação (CV%) associado às estimativas da similaridade genética foi calculado utilizando o programa DBOOD (COELHO, 2001), com 10.000 reamostragens (Bootstraps).

Para a análise dos dados quanto aos valores de patogenicidade e a sensibilidade micelial empregou-se, primeiramente, o tratamento estatístico da característica individual. Quando o teste F foi significativo, as médias foram submetidas ao teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) ou regressão.

As médias dos tratamentos qualitativos (fungicidas) foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. As médias dos tratamentos quantitativos (doses) foram submetidos à análise de regressão. De forma complementar, foi também realizada análise exploratória multivariada, de agrupamento por método hierárquico e a análise de componentes principais, que permitiram a avaliação em conjunto de todas as variáveis morfológicas analisadas.

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (MOITA NETO E MOITA 1998). Para medir a semelhança entre os centróides de cada isolado utilizou-se a distância euclidiana (medida de dissimilaridade) para o conjunto das sete variáveis morfológicas, enquanto para a estratégia de agrupamento adotou-se o método de Ward. O resultado da análise foi apresentado em forma gráfica (dendrograma), auxiliando na caracterização dos grupos.

A análise de componentes principais permite condensar a maior quantidade da informação original, contida em  $p$  variáveis (coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença e ausência de setores), em variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais criadas com os autovalores da matriz de covariância dos dados (HAIR, 2005). A correlação entre cada variável ( $X_j$ ) e um componente principal ( $CP_h$ ) é medida por:

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

Onde:  $s_j$  é o desvio padrão da variável  $j$ ;  $a_{jh}$  é o coeficiente da variável  $j$  no  $h$ -ésimo componente principal e  $\lambda_h$  é o  $h$ -ésimo autovalor da matriz de covariância.

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

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Obtenção de isolados

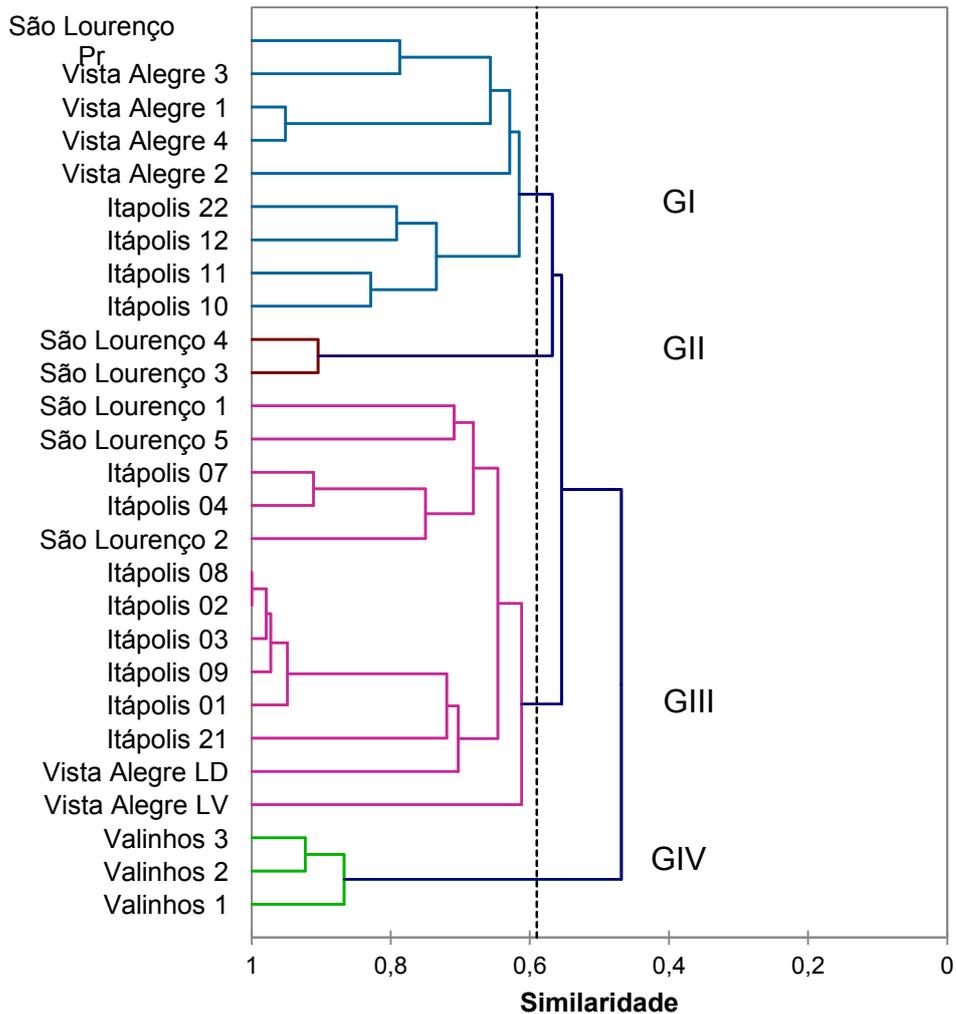
Todos os 27 isolados obtidos e selecionados para análises apresentavam padrões culturais, assim como aspectos morfológicos que se enquadravam dentre aqueles descritos para o gênero *Colletotrichum* (SUTTON, 1992).

#### 4.3.2. PCR com primers específicos para *Colletotrichum* spp.

No presente estudo foi verificado que dos 27 isolados de *Colletotrichum* spp. submetidos à identificação molecular, todos eles apresentaram amplificação de uma banda específica, de cerca de 450 pb, apenas para *C. gloeosporioides*, quando submetidos à PCR com o par de primers CgInt/ITS4. Os estudos de PCR realizados com os primers específicos Calnt2/ITS4 e CgInt/ITS4, confirmaram a identidade dos isolados como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*.

Os resultados desse trabalho corroboram com os de Anuar; Vijaya; Zakaria (2014), os quais verificaram que dentre 20 isolados obtidos de goiaba com sintomas de antracnose enquadraram-se em *C. gloeosporioides*. Resultados semelhantes foram também obtidos por Soares-Colletti (2012), o qual verificou em seus estudos que isolados obtidos de goiaba, de várias regiões produtoras do estado de São Paulo, quando submetidos a PCR com os primers específicos Calnt e CgInt, 86,34% deles apresentaram banda específica de *C. gloeosporioides*, e nenhum deles apresentou amplificação para o primer Calnt/ITS4.

Após a identificação da espécie, os isolados foram submetidos aos 11 primers ISSR que permitiram a codificação de 103 locos, variando de 7 (P10) a 14 (P14). A diversidade genética de *C. gloeosporioides*, baseado em marcadores moleculares ISSR, mostraram relação entre distribuição genética e geográfica, conforme grupos apresentados na Figura 14.



**Figura 14.** Dendrograma dos 27 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos pelo agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard.

A similaridade média observada nesse estudo foi de 0,589, sendo as maiores detectadas entre os isolados de Itápolis SP, e entre os isolados 1 e 4 de Vista Alegre do Alto SP. As menores similaridades foram encontradas entre os isolados originados de Valinhos/SP e os originados de Itápolis/SP (aproximadamente 0,4), municípios esses que se encontram nas duas microrregiões mais distantes entre si.

O isolado São Lourenço do Turvo Pr e Vista Alegre 3 se encontram no grupo GI, de forma deslocada dos demais indivíduos que compõem o grupo, com uma similaridade genética de 0,78. No geral, os agrupamentos apresentaram tendência à distribuição geográfica, porém nesse caso os isolados de dois municípios distintos agruparam-se entre si, possivelmente por tratar-se de população clonal, dada à

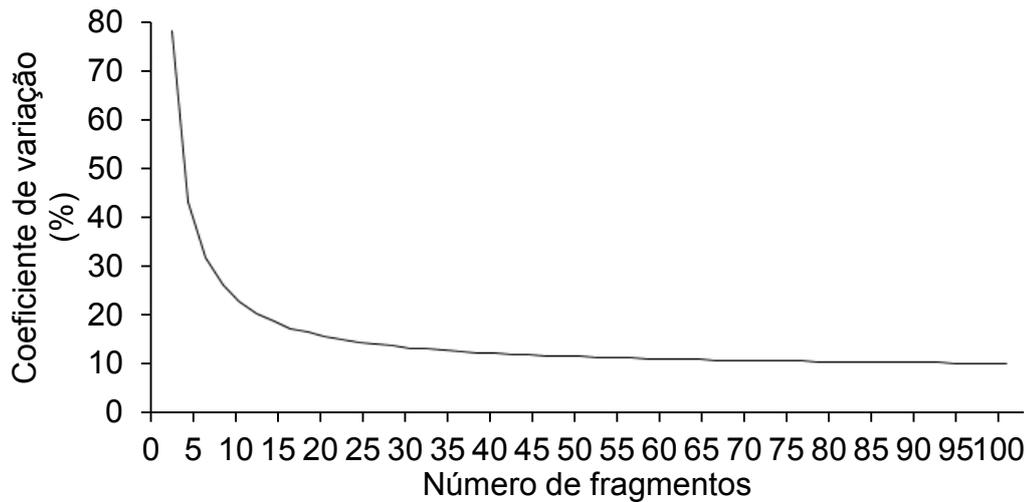
pequena distância geográfica entre esses dois municípios, de apenas 60 km, ou pelo material de origem, já que os ambos os isolados provieram da variedade Paluma.

O grupo GII é formado por isolados provenientes de goiabas obtidas em São Lourenço do Turvo e em Itápolis, áreas essas as mais próximas entre si, nesse estudo, com apenas 40 km de distância, pertencente à macrorregião Araraquara. Além da proximidade, também predomina em ambas as áreas o cultivo da variedade Paluma, o que poderá ter contribuído à alta similaridade genética entre os isolados, segundo o agrupamento pelo método UPGMA.

As maiores similaridades entre os isolados avaliados nesse estudo encontram-se no grupo G III, com valor 0,9 e pertencente aos isolados de Itápolis, município esse que tem a maior produção de goiaba do estado de São Paulo. Isolados provenientes de Valinhos foram os que provieram de pontos mais distantes de coleta, com aproximadamente 300km, razão essa que aparentemente contribuiu à formação do grupo GIV, restritos apenas a esses isolados, e com alta similaridade genética, de aproximadamente 0,885.

Estudos de diversidade genética de *Colletotrichum* spp. obtidos de pimenta e mamão, de regiões distintas, também mostraram uma relação entre o agrupamento UPGMA e a origem geográfica (RATANACHERDCHAI et al., 2010; RAMPERSAD 2012). Genótipos de *C. gloeosporioides* podem ocupar regiões geográficas específicas que podem ser associados com a co-evolução de hospedeiro e adaptação às condições ambientais (CANNON; BUDDIE; BRIDGE 2008). Segundo Weeds et al., (2003), a diversidade genética de *C. gloeosporioides* é maior no centro de origem das espécies hospedeiras, quando comparado com locais onde as espécies hospedeiras foram recentemente introduzidas. O Brasil é considerado um dos centros de origem da goiaba, o que pode ter influenciado nessa alta diversidade genética entre os isolados estudados.

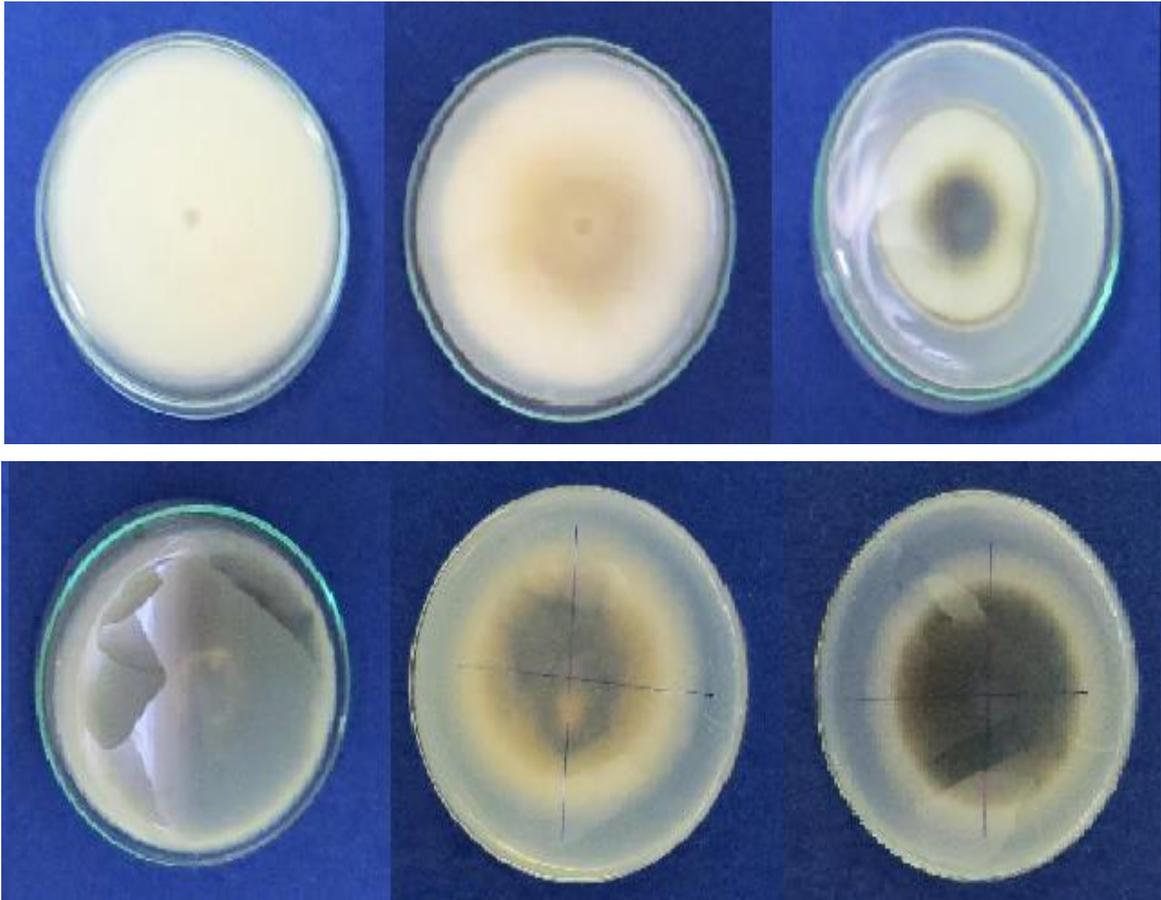
As estimativas de similaridade genética apresentaram boa acurácia, visto que o coeficiente de variação obtido com base em 10.000 reamostragens (bootstraps) em função do número de marcas avaliadas foi de 10,3% (Figura 15).



**Figura 15.** Coeficiente de variação (%) obtido pela análise bootstraps (10.000x) utilizando software Dboot (COELHO, 2001) dos fragmentos utilizando marcadores ISSR para 27 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de vários municípios do estado de São Paulo.

#### 4.3.3. Caracterização morfocultural

Quanto a avaliação morfocultural, a coloração nas colônias variaram de branco, cinza a salmão com predominância da cor branca. A coloração do bordo das colônias variou de branca a cinza, com predomínio do branco, enquanto a coloração do reverso foi a característica mais diversificada nesse estudo (Figura 16). Resultados semelhantes foram obtidos por Peres et al. (2002), Andrade et al. (2007) e Pimenta (2009) que também identificaram uma alta variabilidade das colorações das colônias de *Colletotrichum* spp.



**Figura 16.** Fotos evidenciando a diversidade dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de goiaba quanto a cor do reverso.

As variações apresentadas pelas colônias de *C. gloeosporioides* podem ser atribuídas ao genótipo de cada isolado, cuja expressão fenotípica está associada ao ambiente de cultivo, assim como à biossíntese de metabólitos secundários, fatores esses que contribuem às variações, tanto culturais quanto patogênicas (BAILEY; JERGER 1992; BONETT et al., 2010)

Os resultados do estudo de patogenicidade foram positivos para todos os 27 isolados estudados, porém os níveis de severidade dos sintomas foram distintos (Tabela 16).

**Tabela 16.** Classificação dos 27 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de goiaba com sintomas de antracnose, quanto à cor da colônia, cor do bordo, cor do reverso, presença ou ausência de setores e a patogenicidade média, em meio BDA, a 25 °C, sob luz contínua.

Isolados	C_C	C_B	C_R	S	Patogenicidade	
Testemunha	-	-	-	-	0	a
Itápolis 01	1	1	1	-	3	b
Itápolis 02	2	1	3	-	3	b
Itápolis 03	1	1	1	-	2,83	ab
Itápolis 04	1	1	2	-	2,83	ab
Itápolis 07	1	1	3	-	3,33	b
Itápolis 08	2	2	3	-	3,66	b
Itápolis 09	2	2	3	-	3	b
Itápolis 10	1	1	1	-	3	b
Itápolis 11	1	1	1	-	3,33	b
Itápolis 12	2	1	3	-	3,66	b
Itápolis 21	1	1	1	-	3,66	b
Itápolis 22	1	1	1	-	3,5	b
São Lourenço 1	2	2	3	-	3,5	b
São Lourenço 2	1	1	1	-	3,5	b
São Lourenço 3	1	1	1	-	3	b
São Lourenço 4	4	1	5	-	2,66	ab
São Lourenço 5	4	1	5	-	2,83	ab
São Lourenço 6	1	1	1	-	2,83	ab
Valinhos 1	1	1	1	-	2,5	ab
Valinhos 2	2	2	3	-	2,83	ab
Valinhos 3	1	1	2	-	3	b
Vista Alegre LD	2	1	6	-	3	b
Vista Alegre LV	1	1	1	-	3	b
Vista Alegre 1	1	1	1	-	3,66	b
Vista Alegre 2	3	1	6	-	4	b
Vista Alegre 3	1	1	3	-	4	b
Vista Alegre 4	2	1	3	-	3,16	b

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $P \geq 0,05$ ). A letra a representa a menor patogenicidade e a letra b a maior patogenicidade. CV= 31,08; DMS= 2,91.

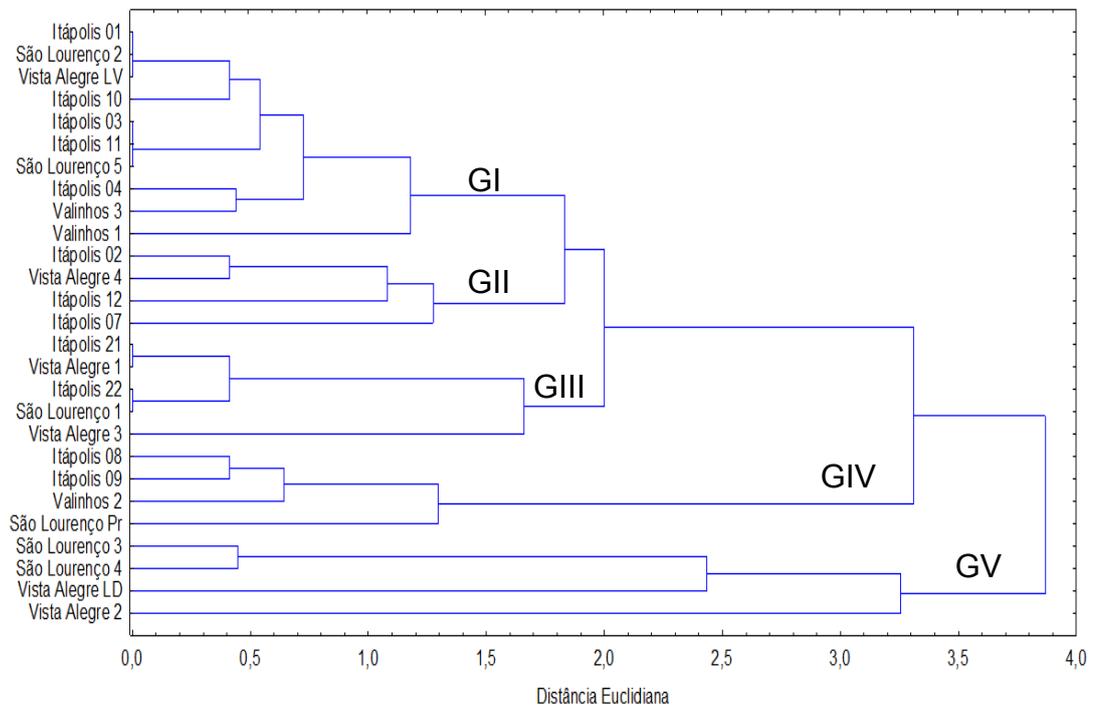
C\_C: Coloração das colônias; C\_B: Coloração do bordo; C\_R: Coloração do reverso; S: Presença (+) ou ausência de setores (-).

Segundo Sutton, 1992, colônias de cor salmão, bordo branco e reverso salmão são características comuns de *C. acutatum*. Entretanto os isolados de São Lourenço do Turvo 3 e 4, apresentaram essas características, muito embora, segundo a análise molecular tenha sido classificado como *C. gloeosporioides*, comprovando que os métodos baseados em análises morfológicas e culturais têm se

mostrado insuficientes para a classificação da espécie de *Colletotrichum* spp., conforme já ressaltados por Freeman e colaboradores (1998).

Algumas variações apresentadas pelas colônias do patógeno podem ser atribuídas ao genótipo de cada isolado, cuja expressão fenotípica está associada ao ambiente de cultivo, assim como à biossíntese de metabólitos secundários, a qual já tem sido caracterizada no gênero *Colletotrichum* (BAILEY; JERGER 1992).

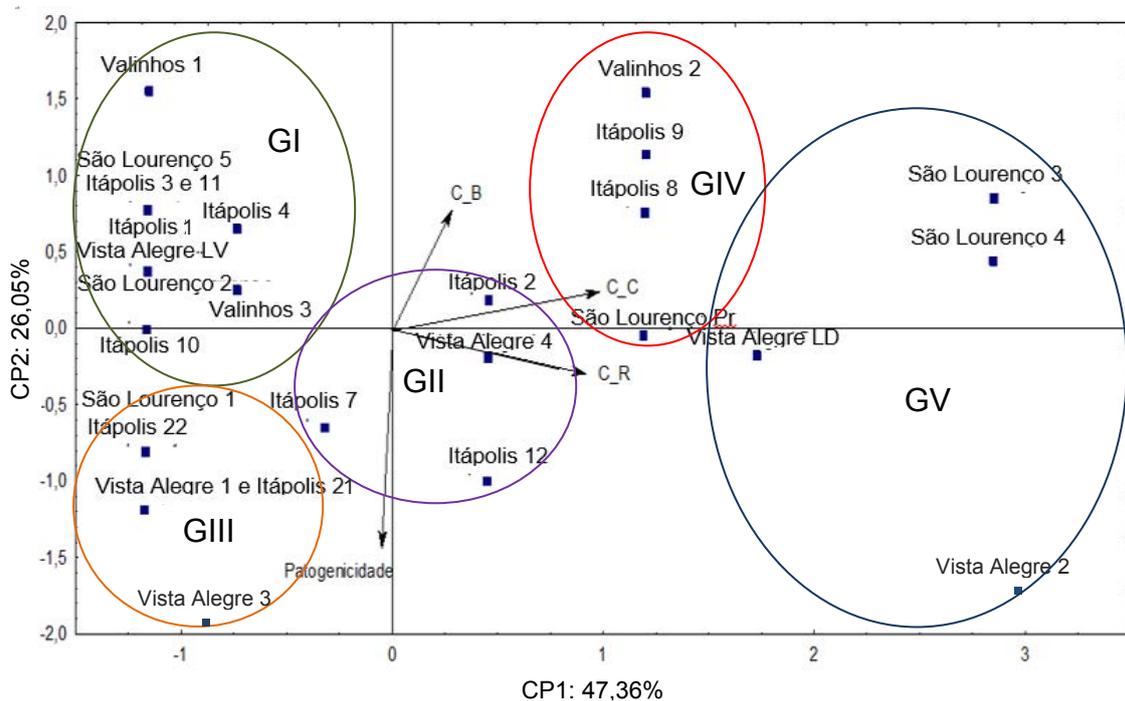
Por meio da análise de agrupamento pelo método hierárquico aplicada às variáveis coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores e patogenicidade, verificou-se grande variabilidade entre os isolados, resultando numa arquitetura envolvendo três grupos de isolados caracterizados como grupo I (GI), grupo II (GII), grupo III (GIII) e grupo IV (GIV) (Figura 17).



**Figura 17.** Dendrograma resultante da análise de agrupamento pelo método hierárquico mostrando a formação de grupos segundo as variáveis: coloração das colônias, do bordo e do reverso, presença ou ausência de setores e patogenicidade.

A representação gráfica nos componentes principais permitiu caracterizar as variáveis que mais discriminaram a formação dos grupos GI, GII, GIII, GIV e GV, inclusive com possibilidade da identificação de isolados que apresentaram características muito particulares entre si.

Dois autovalores foram superiores a unidade, o que gerou dois componentes principais, sendo preservado 73,41% da variabilidade original (47,36% em CP1 e 26,05% em CP2). Assim, o conjunto inicial de quatro variáveis dependentes passou a ser caracterizado por duas novas variáveis latentes independentes, o que possibilitou sua localização em figuras bidimensionais (Figura 18) (ordenação dos isolados por componentes principais).



**Figura 18.** Biplot mostrando a projeção das variáveis (C\_C), cor do reverso (C\_R), cor do bordo (C\_B) e patogenicidade nos dois primeiros componentes principais, 1 e 2, com distribuição dos 27 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Pode-se observar que as correlações positivas são responsáveis pela discriminação dos isolados localizados à direita de CP1 e a correlação negativa pela discriminação dos isolados, à esquerda de CP1. As variáveis com correlação positiva são as responsáveis pela discriminação dos isolados localizados na parte superior de CP2 e as variáveis com correlação negativa são as responsáveis pela discriminação dos isolados localizados na parte inferior de CP2. É possível observar que as variáveis associadas com características morfológicas (cor da colônia,

bordo e reverso) estão voltadas para direita de CP1 e a variável patogenicidade está a esquerda de CP1.

Os Isolados São Lourenço do Turvo 3 e 4 são os mais distantes do fluxo de massa, por possuírem características particulares quando comparado com os demais isolados. Esses dois isolados possuem cor da colônia e do reverso branco/salmão e borda branca, se encontram no grupo GV, juntamente com o isolado Vista Alegre do Alto LD, grupo esse influenciado principalmente pela cor da borda branca e pela coloração da colônia, e reverso diferenciado da maioria dos demais isolados.

Os isolados Valinhos 2, Itápolis 9, Itápolis 8 e São Lourenço do Turvo P se agrupam no GIV no dendrograma de agrupamento hierárquico e aparecem deslocados na análise de coordenadas principais devido as características idênticas da coloração da colônia (cinza), bordo (cinza) e reverso (preto), idênticas entre si.

Os isolados São Lourenço do Turvo 1, Vista Alegre do Alto 1 e Itápolis 22 e 21 apresentam todas as características da colônia na cor branca e a patogenicidade entre 2,5 e 2,66, o enquadrando-se no agrupamento GIII.

Os isolados Itápolis 2, Itápolis 7, Itápolis 12 e Vista Alegre 4 possuem características de coloração de borda (branco) e reverso (preto) idênticos, compondo o grupo GII.

Os isolados Itápolis 1, Itápolis 3, Itápolis 4, Itápolis 10, Itápolis 11, Vista Alegre do Alto LV, São Lourenço do Turvo 2 e 5, Valinhos 1 e 3 formam o grupo GI, e se caracterizam pela cor da colônia e cor do bordo brancos, e pela patogenicidade, menor que 2.

Ferraz (1977) classificou isolados do gênero *Colletotrichum* em grupos, em função da variação observada nas características culturais. Porém, segundo Miranda (2003) e Mehta e Mehta 2010, essas características não são adequadas para fins taxonômicos desse grupo, porém, tais informações são importantes para o conhecimento da biologia do fungo, no seu contexto geral e específicos.

Em termos de aspectos culturais, de um modo geral há um elevado polimorfismo entre os isolados do gênero *Colletotrichum*. Esse comportamento deve-se, normalmente, às influências do meio ambiente, notadamente aos aspectos

relacionados aos tipos de meios de cultivo, temperatura ambiente e luminosidade (NECHET; ABREU 2002; MAIA et al., 2011).

#### 4.3.4. Avaliação de fungicidas

Os isolados Itápolis 8, Itápolis 12, Itápolis 21, Itápolis 22, São Lourenço 1, São Lourenço 2, Vista Alegre 1, Vista Alegre 2 e Vista Alegre 3 foram submetidos ao teste de sensibilidade, esses foram selecionados por apresentarem uma nota de patogenicidade entre 3,5 e 4.

Os dados referentes ao diâmetro médias das colônias de *C. gloeosporioides* submetidos a 4 concentrações de fungicidas (0; 0,1; 1; 10; 100), incluindo a testemunha, foram significativos para o teste F, assim como à interação Doses X Fungicida. Todos os fungicidas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 17), havendo relação negativa direta entre concentração e tamanho das colônias, para os três fungicidas avaliados.

**Tabela 17.** Diâmetro médio das colônias (em mm) de *Colletotrichum gloeosporioides* após 6 dias de incubação em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA acrescido de fungicidas em diferentes concentrações (mg/L).

Concentração (mg/L)	Tebuconazole	<i>Bacillus subtilis</i>	Azoxystrobina
0	81,08 a	81,01 a	80,34 a
0,1	67,65 b	67,68 b	64,19 a
1	45,29 a	65,02 b	46,68 a
10	10,15 a	56,8 c	34,54 b
100	0 a	0 a	0 a

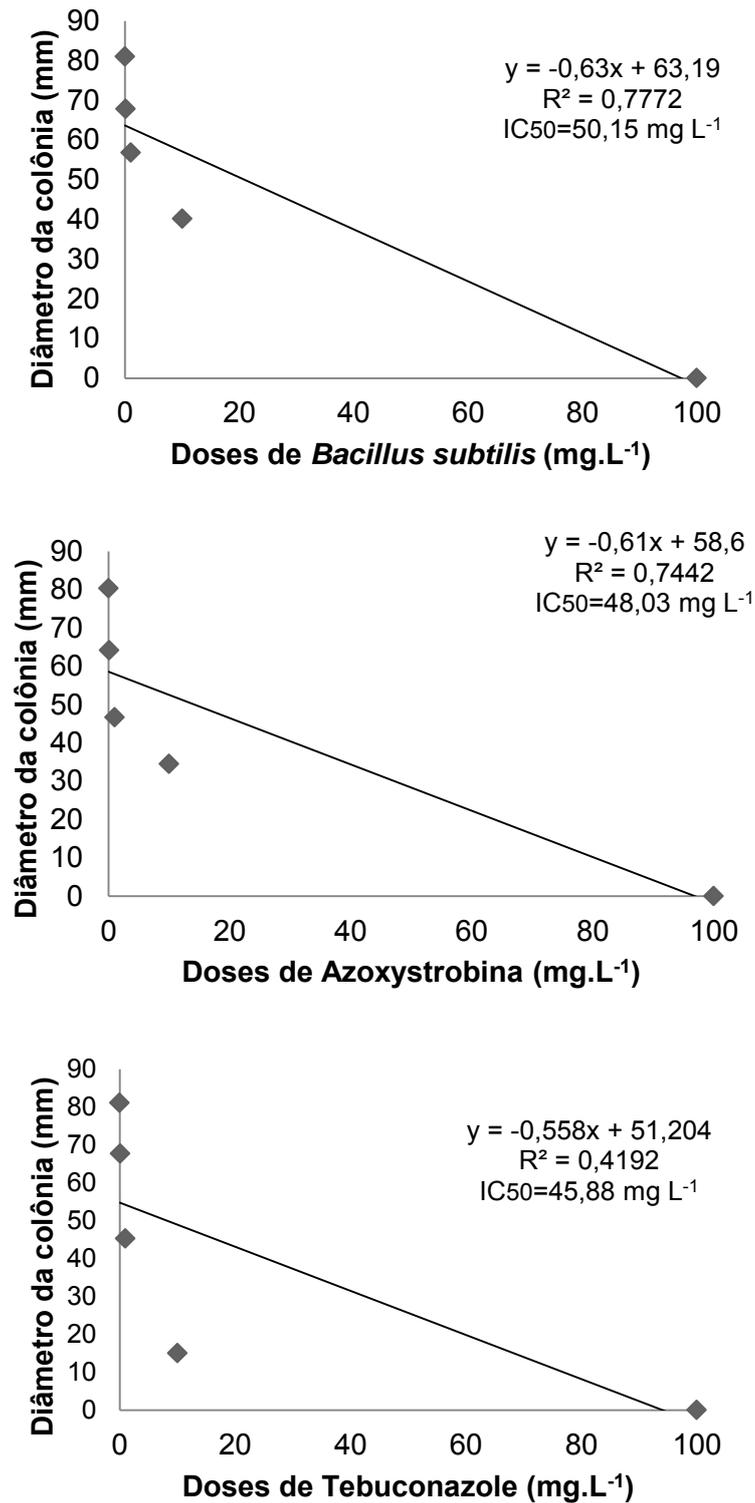
\*Medias seguidas da mesma letra na linha não difere entre si a nível de  $p(<0,05)$  de significância pelo teste de Tukey. DMS=18,09; CV = 16,1%.

Dentre as alternativas avaliadas, observou-se que as maiores colônias foram observadas quando os isolados de *C. gloeosporioides* foram expostas ao meio de cultivo BDA contendo  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  do fungicida correspondente a *Bacillus*. Contrariamente, o menor diâmetro foi observado em meio de cultivo acrescido de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de tebuconazole. Em meio de cultivo acrescido de azoxystrobina a inibição do crescimento das colônias foi relativamente baixa, sendo, porém, superior ao observado por apresentou menor diâmetro médio do micélio que o *Bacillus*

*subtilis*.Tavares; Souza (2005) obteve um resultado de 100% de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* apenas com 10 mg.L<sup>-1</sup>de tebuconazole.

A concentração 100 mg.L<sup>-1</sup> não apresentou crescimento micelial até o sexto dia de avaliação para nenhum dos fungicidas testados.

Os fungicidas tebuconazole e azoxystrobina apresentaram IC<sub>50</sub> igual a 45,88 e 48,03 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que o agente biológico *Bacillus subtilis* o foi de 50,15 mg.L<sup>-1</sup>(Figura 19). Lopes et al. (2015) testaram diversos fungicidas, isoladamente ou em misturas, constatando que os melhores resultados de inibição foram com trifloxistrobina + tebuconazole, porém nenhum fungicida sendo eficiente quanto à inibição total da germinação de conídios, até a concentração 100 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 19.** Representação gráfica, ajuste das equações de regressão e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) da variável diâmetro da colônia, submetidas a cinco concentrações dos fungicidas *Bacillus subtilis*, azoxystrobina e tebuconazole.

O crescimento dos isolados mostrou-se inversamente proporcional à concentração dos fungicidas avaliados, cujas equações se ajustaram ao modelo linear, de tal forma que o aumento das mesmas implica em redução no tamanho das colônias.

Considerando o IC<sub>50</sub> para classificar os fungicidas quanto a eficiência, é possível afirmar que o *B. subtilis* apresentou o pior resultado quando comparado aos outros dois fungicidas, esse foi considerado ineficiente no controle de *C. gloeosporioides* isolados de goiaba.

A aplicação da mistura Triazol + Estrobilurina nos últimos anos tem apresentado melhores resultados, porém algumas regiões já apresentam controle ineficiente provavelmente pelo uso desmedido. O fungicida Amistar WG é um fungicida sistêmico do grupo das Estrobilurinas, com atividade predominantemente preventiva, mas também com ação curativa e anti-esporulante (BRASIL 2015).

O fungicida Folicur 200 EC é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis com ação preventiva e curativa, atua no bloqueio da biossíntese de ergosterol, que é um importante lipídio fúngico para a formação da membrana das células. A ausência desta camada leva ao colapso da célula fúngica e à interrupção do crescimento.

Os micélios de *C. gloeosporioides* isolados de mamão foram mais sensíveis ao fungicida tebuconazole (triazol) que a azoxystrobina (estrobilurina). Tavares e Souza (2005) obteve um IC<sub>50</sub> menor que 1 mg.L<sup>-1</sup>, inferior ao deste estudo, tanto para azoxystrobina como para tebuconazole, sendo classificado como altamente eficiente no controle do patógeno.

O serenade é um fungicida bactericida microbiológico que possui múltiplos modos de ação. Os lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* QST713 presentes na formulação atuam na membrana celular das estruturas reprodutivas do fungo, provocando sua deformação e produzindo rupturas. É usado em pulverização preventiva no controle de doenças.

#### 4.4. CONCLUSÕES

- *Colletotrichum gloeosporioides* mostra-se como a única espécie de *Colletotrichum* associada a sintomas de antracnose em frutos de goiaba, de três variedades, coletadas em quatro municípios do estado de São Paulo;
- Não se observa relação entre origem geográfica, hospedeiro (variedade) e diversidade genética entre os 27 isolados de *C. gloeosporioides* avaliados;
- Todos os isolados de *C. gloeosporioides* avaliados mostram-se patogênicos, em níveis diferenciados, quando inoculados em frutos de goiaba, independente das variedades;
- Os fungicidas azoxystrobina, tebuconazole e Serenade, uma formulação obtida a partir de uma linhagem de *Bacillus subtilis*, são capazes de inibir o crescimento de colônias de *C. gloeosporioides* apenas quando a concentração contem 100 mgL<sup>-1</sup>, sendo, pois, de baixa eficiência *in vitro*.

#### 4.5. REFERÊNCIAS

AGROFIT Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: Acesso em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). 11 jun. 2015.

ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 32(1):21-31, 2007.

ANUAR, I. S. M.; VIJAYA, S. I.; ZAKARIA, L. Molecular characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* sp. from guava. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. Vol. 47, No. 13, 1549-1556, 2014. <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2013.850198>

BAILEY, J.A.; JEGER, J. M. ***Colletotrichum: biology, pathology control***. Oxford: British Society for Plant Pathology, 388 p. 1992

BONETT, L.P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R.G.A.; AQUINO, F.A. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência**, Guarapuava, v.6, n.3, p.451-463, 2010.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.;

SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, 39: 183-204, 2009.

CANNON, P. F., BUDDIE, A. G., AND BRIDGE, P. D. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon** 104:189-204, 2008.

COELHO, A.S.G. dBood: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap: versão 3.01. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001.

COSTA, H. Controle de doenças de goiabeira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. Controle de doenças de plantas: fruteiras. v.2, p. 1247-1278, 2002.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 28, nº 5, p.528-533, 2003.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARROW, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

FERRAZ, D. M. M. Controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em pós-colheita da goiaba (*Psidium guajava*), produzida em sistema de cultivo convencional e orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotermia e cloreto de cálcio. 103 f. Mestrado (Dissertação). Universidade de Brasília, 2010.

FERRAZ, J. F. P. Morfologia, comportamento cultural e patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. **Agronomia Lusitana** 38:163-179, 1977.

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

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

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola**. 2011. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=161&3z=t&o=11&i=P>. Acesso em: 31 mai. 2015.

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

LOPES, L. N. S.; SILVA, A. S.; PEREIRA, C. C. O.; MENEZES, I. P. P.; MALAFAIA, G.; LIMA, M. L. P. Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Multi-Science Journal**. 1(1):106-114, 2015.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCA, W. L. A.; MAIA, J. B.; ABREU, M. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Biosci. J.**, Uberlândia, 27:(2):205-210, 2011.

MIRANDA, E. F. O. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003

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

MORAES, S. R. G.; TANAKA F. A. O.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Histopathology of *colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*psidium guajava* L.). **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal - SP, v. 35, n. 2, p. 657-664 Junho 2013.

MUKTA, D.; BORA, K. N. *Colletotrichum acutatum* a new fruit rotting pathogen of guava (*Psidium guajava* L.) in storage. **Indian, J. Mycol. Plant. Pathol.** 23, 331, 1993.

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

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose da goiabeira no Estado de São Paulo**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado). Escola superior de Agrucultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2009.

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. **J. Phytopathology**. 150, 128-134, 2002.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: **Ceres**, v.2, cap.44. p.401-405, 2005.

PIMENTA, A. A. **Caracterização morfológica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)**. 2009, 79 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista „Julho de Mesquita Filho“, Jaboticabal. 2009

RAMPERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology** 103:182-189, 2013.

RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H.; LIN, F.; SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross- inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chili anthracnose. **Microbiology Research** 4(1), 76–83, 2010.

SOARES-COLLETTI, A. R. **Doenças quiescentes em goiabas, quantificação e controle pós-colheita**.2012. 143 f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”. Piracicaba, 2012.

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

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Effects of fungicides on the in vitro control of *Colletotrichum gloeosporioides*, the anthracnosis etiologic agent of the Papaya tree (*Carica papaya* L.). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

TOKAIRIN, T. O.; CAPPELLO, F. P.; SPOSITO, M. B. Custo de produção de goiabas para mesa produzidas com e sem ensacamento: Estudo de caso. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 3, p. 542- 549, 2014.

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

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

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

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho caracterizou molecular e morfológicamente, 100 isolados de *Colletotrichum* spp., sendo 21 provenientes de mamão, 52 de manga e 27 de goiaba. As regiões consideradas como principais produtoras da fruta foram priorizadas na coleta dos isolados. Exclusivamente, os isolados oriundos de manga foram coletados de frutos e folhas, contemplando-se 33 variedades. No geral, o número de isolados foi representativo, porém restringiram-se apenas a áreas comerciais e coleção de variedades existentes no estado de São Paulo.

Neste estudo verificou que *Colletotrichum gloeosporioides* não é o único agente causador da antracnose em manga, mamão e goiaba. Isolados de *Colletotrichum acutatum* também foram identificados como agente patogênico em frutos de mamoeiro, fato que não ocorreu em manga e goiaba.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram grande diversidade morfocultural, o que impossibilita a identificação das espécies de *Colletotrichum* por meio desse procedimento, mostrando-se convergente com antecedentes já registrado na literatura. Estudos complementares envolvendo um conjunto maior de isolados, assim como diferentes regiões geográficas, associados ao sequenciamento de regiões genômicas, justificam-se plenamente visando-se abordar e identificar as espécies de *Colletotrichum* spp. associadas às culturas da manga, mamão e goiaba.

Fungicida comercial representado pela mistura de trifloxistrobina e tebuconazole é registrado para o controle de antracnose nas culturas da manga, mamão e goiaba, na concentração contendo  $0,6L.ha^{-1}$ , do produto comercial. A eficiência *in vitro* de tais ingredientes ativos, comprova os antecedentes positivos das moléculas ativas no controle de *Colletotrichum* spp. associados a essas culturas. Viabilidade técnica no controle de tais patógenos, *in vitro*, foi também verificada mediante o emprego de *Bacillus subtilis* linhagem QST 713, com perspectivas de alternativa sustentável e ecologicamente mais adequado. Estudos complementares a campo fazem-se necessários.