

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE**  
***Colletotrichum* CAUSADORAS DE ANTRACNOSE**  
**EM HORTALIÇAS SOLANÁCEAS**

**Cassiara Regina Noventa Corrêa Bueno**

Dissertação apresentada para obtenção  
do título de Mestre em Agronomia. Área  
de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**

**2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Cassara Regina Noventa Corrêa Bueno**  
**Engenheira Agrônoma**

**Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas**

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba****2005****Agradecimentos**

A meus pais que me ajudaram a cumprir esta etapa importante da minha vida;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior pela orientação, oportunidade e dedicação;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos destinada a realização deste trabalho;

Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia por todos os ensinamentos e companheirismo;

Ao Hilton Ferrari Gonçalves pelo carinho e paciência em todos os momentos;

A minha amiga Noemia Aparecida de Souza pelo incentivo e apoio;

Ao meu amigo Hugo José Tozze Júnior pelo entusiasmo dedicado a este trabalho;

Aos amigos de turma: Alejandro, Ana, André, Cristiane, Daniel, Fabrício, Franklin, Isolda, Karen, Leonardo e Thaïs pela amizade e convívio;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

## RESUMO

### Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas

O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar as espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose em pimentão, pimenta e jiló. Foram estudados 42 isolados de *Colletotrichum*, sendo 26 de pimentão, 6 de pimenta e 10 de jiló. A caracterização morfológica foi baseada no tamanho e formato dos conídios. A patogenicidade foi avaliada por inoculações de cada isolado em frutos feridos e não feridos de pimentão, pimenta e jiló, separadamente. O DNA total extraído do micélio de cada isolado foi usado para o PCR com pares de primers específicos. Todos os isolados provenientes de pimenta, 7 de jiló e 14 de pimentão foram identificados pelo PCR como *C. acutatum*. Dois isolados de pimentão foram identificados como *C. gloeosporioides*. A análise de morfologia de conídios não concordou sempre com a identificação molecular. Os isolados de jiló foram capazes de infectar jiló, pimentão e pimenta. *C. acutatum* isolado de pimentão e pimenta não infectaram jiló. Porém, *C. gloeosporioides* isolado de pimentão infectou jiló. Estes dados sugerem que outras características, em adição às estudadas, são necessárias para a correta identificação das espécies de *Colletotrichum*.

Palavras chave: antracnose, fungo fitopatogênico, hortaliças, jiló, patogenicidade, pimenta, pimentão, solanácea.

## ABSTRACT

### Identification and characterization of species of *Colletotrichum* that cause anthracnose in three solanaceous species

The objective of the present work was the identification and characterization of *Colletotrichum* species causing anthracnose in pepper, chili and garden egg. Forty two *Colletotrichum* isolates, being 26 from chili, 6 from pepper and 10 from garden egg were studied. Morphological characterization was based on size and shape of conidia. Pathogenicity was evaluate by inoculating each isolate on wounded and non wounded fruits of chili, pepper and garden egg, separately. Total DNA extract from mycelium of each isolate was used for PCR with specific pair of primers. All six isolates collect from chili, 7 from garden egg and 14 from pepper were identified by PCR as *C. acutatum*. Two isolates from pepper were identified as *C. gloeosporioides*. Morphological analyses of the conidia were not always in accordance with the molecular identification. The isolates from garden egg were able to infect garden egg, pepper and chili. *C. acutatum* isolated from pepper and chili did not infect garden egg. However, *C. gloeosporioides* isolated from pepper infected garden egg. These data suggested that other characteristics are necessary for the correct identification of the *Colletotrichum* species.

Key words: anthracnose, phytopathogen fungi, vegetables, garden egg, pepper, chilli, patogenicity, solanacea.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	.... 4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE FIGURAS	.. 7
LISTA DE TABELAS	..... 9
LISTA DE ABREVIATURAS	..... 10
1 INTRODUÇÃO	... 11
2 DESENVOLVIMENTO.....	
13	
2.1 Revisão de literatura	13
2.2 Material e métodos	19
2.2.1 Obtenção dos isolados	19
2.2.2 Caracterização morfológica	21
2.2.3 Caracterização patogênica	22
2.2.3.1 Multiplicação do inóculo	23
2.2.3.2 Inoculação	23
2.2.3.3 Avaliação	23
2.2.4 Identificação molecular	24
2.2.5 Delineamento estatístico	26
2.3 Resultados e discussão	27
2.3.1 Caracterização morfológica	27
2.3.1.1 Dimensões dos conídios	27
2.3.1.2 Formato dos conídios	29

2.3. 2 Caracterização patogênica	34
2.3.2.1 Frutos com fermento	34
2.3.2.2 Frutos sem fermento	42
2.3.3 Identificação molecular	47
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS .....	53

### LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Formato de conídios de <i>Colletotrichum</i> observados em isolados de hortaliças solanáceas .....	22
Figura 2 - Morfologia dos conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> estudados.....	32
Figura 3 - Distribuição dos diferentes formatos de conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> de pimentão, pimenta e jiló.....	33
Figura 4 - Velocidade de crescimento médio diário das lesões causadas pelos PI, PA, JI em pimentão, pimenta e jiló feridos.....	41
Figura 5 - Diâmetro médio das lesões proximais e distais dos isolados PI, PA e JI em pimentão, pimenta e jiló aos 12 dias após a inoculação.....	42
Figura 6 - Frutos de jiló feridos inoculados com os isolados PI 07 (fruto da esquerda, sem lesão) e PI 13 (fruto da direita, com lesão), aos 12	



dias após a inoculação.  
 .....46

Figura 7 - Frutos de pimenta feridos inoculados com os isolados PA 09 (fruto da esquerda) e JI 07 (fruto da direita) aos 10 dias após a inoculação. Notar a diferença na coloração da massa de conídios.....46

Figura 8 - Frutos de pimentão feridos inoculados com os isolados PI 809 (fruto da esquerda) e JI 05 (fruto da direita) aos 10 dias após a inoculação.....46

Figura 9 - Frutos de pimentão não feridos inoculados com o isolado PI 2552 aos 12 dias após a inoculação. Fruto verde apresenta-se intacto.....  
 ..... 46

Figura 10 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, Padrão 1, PI 02, PI 03, PI 04, PI 05, PI 06, PI 07, PI 08 e PI 10.....  
 48

Figura 11 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, PI 11, PI 12, PI 13, PI 14, PI 15, PI 16, PI 17, PI 20 e PI 30..... 48

Figura 12 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus PI 40, PI 41, PI 50, PI 634, PI 809, PI 922, PI 2523, PI 2552 e PI 2868....48

Figura 13 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, PA 02, PA 03, PA 04, PA 06, PA 09, PA 10, JI 02, JI 03 e JI 04..... 48

Figura 14 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, JI 05, JI 07, JI 08, JI 10, JI 11, JI 12, JI 13, Padrão 2 e Padrão 3.....49

- Figura 15 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus,  
 Padrão 2, PI 02, PI 03, PI 04, PI 05, PI 06, PI 07, PI 08 e PI 10.....  
 49
- Figura 16 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus,  
 PI 11, PI 12, PI 13, PI 14, PI 15, PI 16, PI 17, PI 20 e PI 30.....  
 .49
- Figura 17 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus,  
 PI 40, PI 41, PI 50, PI 634, PI 809, PI 922, PI 2523, PI 2552 e PI  
 2868.....49
- Figura 18 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus,  
 PA 02, PA 03, PA 04, PA 06, PA 09, PA 10, JI 02, JI 03 e JI  
 04.....50
- Figura 19 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus,  
 JI 05, JI 07, JI 08, JI 10, JI 11, JI 12, JI 13, Padrão 1 e Padrão 3.....  
 50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura, hospedeiro de origem e procedência dos isolados utilizados no estudo.....	..... 19
Tabela 2 - Dimensões dos conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> avaliados.	28
Tabela 3 - Caracterização dos formatos dos conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i>	30
Tabela 4 - Período de incubação, latência, incidência, velocidade média de crescimento por dia (cm) e diâmetro da lesão aos 12 dias após a inoculação (cm) em frutos feridos de pimentão.....	37
Tabela 5 - Período de incubação, latência, incidência, velocidade média de crescimento por dia (cm) e diâmetro da lesão aos 12 dias após a inoculação (cm) em frutos feridos de pimenta.....	.... 38
Tabela 6 - Período de incubação, latência, incidência, velocidade média de crescimento por dia (cm) e diâmetro da lesão aos 12 dias após a inoculação (cm) em frutos feridos de jiló.....	40
Tabela 7 - Período de incubação, latência, incidência, velocidade média de crescimento por dia (cm) e diâmetro da lesão aos 12 dias após a inoculação (cm) em frutos não feridos de pimentão.....	..... 44
Tabela 8 - Período de incubação, latência, incidência, velocidade média de crescimento por dia (cm) e diâmetro da lesão aos 12 dias após a inoculação (cm) em frutos não feridos de pimenta	45
Tabela 9 - Período de incubação, latência, incidência, velocidade média de crescimento por dia (cm) e diâmetro da lesão aos 12 dias após a inoculação (cm) em frutos não feridos de jiló.....	..... 45

## LISTA DE ABREVIATURAS

PI – Isolado de *Colletotrichum* proveniente de fruto de pimentão.

PA – Isolado de *Colletotrichum* proveniente de fruto de pimenta.

JI – Isolado de *Colletotrichum* proveniente de fruto de jiló.

Padrão 1 – Isolado de *Colletotrichum* proveniente de pêsego caracterizado como *C. acutatum*.

Padrão 2 – Isolado de *Colletotrichum* proveniente de mamão caracterizado como *C. gloeosporioides*.

Padrão 3 – Isolado de *Colletotrichum* proveniente de batata caracterizado como *C. coccodes*.

Pi – Período de incubação.

PL – Período de latência.

DL – Diâmetro da lesão.

VMC – Velocidade média de crescimento diário.

VCP – Velocidade média de crescimento diário da lesão proximal.

VCD – Velocidade média de crescimento diário da lesão distal.

i – incidência.

DLP – Diâmetro da lesão proximal.

DLD – Diâmetro da lesão distal.

DM – Diâmetro médio.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* é responsável por danos econômicos significativos em culturas tropicais, subtropicais e até em regiões temperadas, causando doenças conhecidas como antracnoses. As perdas são representativas, pois manifestação da doença pode ocorrer durante o desenvolvimento da cultura no campo ou na pós-colheita, durante seu armazenamento devido a capacidade de quiescência do fungo.

Nas hortaliças solanáceas, em especial, pimentão, pimenta e jiló, antracnose é a principal doença dessas culturas, causando perdas de até 100% em períodos úmidos. A identificação das espécies causadoras de antracnose dessas solanáceas e seu diagnóstico correto são de vital importância para a implementação das alternativas de controle, como, por exemplo, no controle genético, a seleção de isolados para caracterização da resistência de novas variedades e, no controle químico, a escolha adequada do princípio ativo do fungicida, visto que, diferentes espécies comportam-se diferentemente à aplicação de fungicidas.

Atualmente a identificação do gênero *Colletotrichum* é realizada baseando-se na morfologia de conídios e apressórios, testes de patogenicidade e técnicas moleculares. Apenas características morfológicas não é uma forma precisa de identificação porque existe uma grande variação na morfologia dos conídios e características da colônia, o que dificulta a interpretação. Além disso, existe uma faixa de sobreposição para as características morfológicas entre as diferentes espécies descritas na literatura. Testes de patogenicidade com inoculações cruzadas têm sido utilizados com sucesso em estudos que têm por objetivo avaliar a existência de grupos de especialização patogênica nas mais diversas culturas, apesar de diferentes espécies do fungo provocarem sintomas visualmente indistinguíveis quando inoculados em hospedeiros suscetíveis, o que dificulta sua identificação. Atualmente, as técnicas moleculares estão sendo utilizadas em conjunto com a morfologia de conídios e caracterização patogênica por diversos pesquisadores a fim de complementar os resultados de seus trabalhos. A técnica mais utilizada é a PCR, baseando-se na região ITS, com “primers” específicos,

que já estão descritos na literatura para *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* e tem obtido resultados promissores para identificação de espécies de *Colletotrichum*.

Os objetivos desse trabalho foram identificar as espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose das hortaliças pimentão, pimenta e jiló e caracterizá-las morfológicamente, patogenicamente e por técnicas moleculares.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão de literatura

Patógenos do gênero *Colletotrichum* (Penz.) Penz. & Sacc. (teleomorfo *Glomerella*) têm sido relatados como parasitas de uma ampla gama de hospedeiros, incluindo culturas tropicais, subtropicais e temperadas, causando danos significativos à produção. As doenças causadas por esse fungo são conhecidas como antracnoses e podem ocorrer em toda a parte aérea, nas folhas, caules e em frutos pré ou pós-colheita (ALEXOPOULOS; MINS; BLACKWELL et al., 1996, IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004).

Solanáceas como pimentão (*Capsicum annuum*), pimenta (*Capsicum spp.*) e jiló (*Solanum gilo*) apresentam sintomas de antracnose em toda a parte aérea, mas, em frutos, os sintomas são mais expressivos, manifestando-se por meio das lesões necróticas deprimidas de forma circular, que no centro, em condições ambientais favoráveis, apresentam massa mucilaginosa rósea contendo os conídios (FERNANDES; SANTOS; RIBEIRO, 2001, KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Temperaturas entre 23 e 27 °C coincidentes com épocas chuvosas podem provocar prejuízos de 100%. Além disso, os prejuízos ocorrem tanto no campo como em pós-colheita pela habilidade de quiescência do fungo (HADEN; BLACK, 1989, JEFFRIES et al., 1990, PEREIRA, 1995).

Dentro do gênero *Colletotrichum* existem especializações para determinados grupos de hospedeiros, sendo que uma espécie pode estar relacionada com um único hospedeiro, como por exemplo, *C. lindemuthianum*, que ataca o feijoeiro e *C. musae* que ataca bananeira (ALZATE-MARIN et al., 2001, PHOTITA et al., 2005). Também é comum a ocorrência de várias espécies de *Colletotrichum* associadas a um hospedeiro, como em citros, abacate, maçã, pêssigo e manga que podem ser infectados por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, enquanto o morangueiro pode ser infectado por *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* (KURAMAE-IZIOKA et al., 1997,

CARVALHO; LEITE JR.; UENO, 2000, FREEMAN, 2000, CURRY et al., 2002, PERES et al., 2002, DENOYES-ROTHAN et al., 2003). No caso das solanáceas o agente causal descrito em literatura é *C. gloeosporioides*, o mesmo da antracnose do mamão, manga, abacate, maçã e outros frutos (BERNSTEIN; ZEHR; DEAN 1995, KIM; OH; YANG, 1999, FERNANDES; SANTOS; RIBEIRO, 2001, SANDERS; KORSTEN, 2003a, KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Porém, estudos recentes demonstram que existe especialização patogênica mesmo dentro da família solanácea (FERNANDES; SANTOS; RIBEIRO, 2001, TOZZE Jr.; BUENO; MASSOLA Jr., 2004, IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004, KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). As espécies que podem estar envolvidas na antracnose do pimentão, pimenta e jiló são *C. gloeosporioides* (PARK; KIM; LEE, 1990, 1992, LEE; CHUNG, 1995, KIM; OH; YANG, 1999, OH; KIM; KIM, 1999, FERNANDES; SANTOS; RIBEIRO, 2001), *C. coccodes* (DILLARD, 1992, MCGOVERN; POLSTON, 1995, TSROR; JOHNSON, 2000, AHN et al., 2003), *C. capsici* (SINGH; KAUR; SINGH 1993, MANANDHAR; HARTMAN; WANG, 1995, ROY; KILLEBREW; RATNAYAKE, 1997, LIN, et al., 2002) e *C. acutatum* (IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004, TOZZE Jr. et al., 2005).

Em estudos preliminares, Tozze Jr.; Bueno e Massola Jr. (2004) sugerem que a antracnose das solanáceas seja causada por um número superior a duas espécies de *Colletotrichum*, pois, por meio da técnica molecular de PCR e por morfologia dos conídios e apressórios, foram encontrados isolados caracterizados como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, além de alguns isolados que não se enquadram nos parâmetros que classificaram estas duas espécies.

Visto que a resistência a *Colletotrichum* é dependente da espécie do fungo (GNIFFKE, 2005) e que dentro do gênero são conhecidas diferenças de sensibilidade a determinados fungicidas (MELLO; MASSOLA Jr., 2003; PERES et al., 2004, VINNERE, 2004), a identificação da(s) espécie(s) responsável(is) pela antracnose das solanáceas e a caracterização delas é de vital importância para o desenvolvimento e implementação das estratégias de controle químico, cultural ou genético que podem variar de acordo com a variabilidade intra e interespecífica e região de origem dos isolados, além de contribuir para os estudos de epidemiologia dessa doença.



Entre os parâmetros de identificação dos fungos fitopatogênicos, particularmente *Colletotrichum*, estão as técnicas tradicionais de morfologia, como, tamanho e formato de conídios (SMITH; BLACK, 1990, MENEZES, 2002, SANDERS; KORSTEN, 2003b, GONZÁLES; SUTTON, 2004, JAYASINGHE; FERNANDO, 2004); técnicas de patogenicidade por inoculação cruzada ou gama de hospedeiros (ADASKAVEG; HARTIN, 1997, AFANADOR-KAFURI et al., 2003, IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004) e mais recentemente a utilização de técnicas moleculares, como, PCR, ap-PCR, RFLP e seqüenciamento (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998, MARTÍN; GARCÍA-FIGUERES 1999, ABANG et al., 2001, UREÑA-PADILLA et al., 2002).

A análise do tamanho e formato dos conídios é um critério importante na identificação dos fungos fitopatogênicos e, para *Colletotrichum*, é uma técnica usada mundialmente (BARNETT; HUNTER, 1972, SUTTON, 1980, SUTTON, 1992, ADASKAVEG; HARTIN, 1997, GÓES; KIMATI, 1997, FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998, KIM et.al., 1999, ADASKAVEG; FOSTER, 2000, FREEMAN, 2000).

*C. gloeosporioides* é descrito como tendo esporos retos com ápices arredondados de tamanho 9 – 24 x 3 - 4,5 µm; *C. acutatum* como retos, fusiformes, com ápices afilados de tamanho 8,5 - 10,0 x 4,5 - 6,0 µm; *C. coccodes*, em meio de cultivo, forma escleródios, e possui conídios com constricção mediana com tamanho 16 – 22 x 3 – 4 µm e *C. capsici* possui conídios falcados com tamanho 18 – 23 x 3,5 – 4 (SUTTON, 1980).

Apesar de bem caracterizados, a morfologia de conídios é uma técnica não consistente na identificação de espécies de *Colletotrichum*, pois, alguns autores reportaram a ocorrência de diferentes formatos de conídios, mesmo em um único isolado de *Colletotrichum* (ROBERT; SNOW, 1990, GUNNELL; GLUBER, 1992, TANAKA; PASSOS, 1998, SWART, 1999, TALHINHAS et al., 2002, SANDERS; KORSTEN, 2003a). Essa variabilidade de formatos pode estar relacionada com a influência do ambiente na expressão dos caracteres. Conídios produzidos em conidiomas (acérvulos) são mais uniformes do que aqueles produzidos em conidióforos fialídicos (MENEZES, 2002). Adaskaveg e Hartin (1997) caracterizando isolados de *Colletotrichum* de amêndoa e pêssego, concluíram que a morfologia de conídios é

variável dependendo do meio ou substrato utilizado para a produção dos mesmos. Oliveira et al., (2005) encontraram problema semelhante ao caracterizar *Corynespora cassiicola*, e sugeriram que os conídios submetidos à análise morfológica devem ser produzidos no hospedeiro de origem, minimizando a variabilidade e enquadrando-se nas dimensões estabelecidas para cada espécie.

Estudos de patogenicidade de *Colletotrichum* têm sido realizados nas mais diversas culturas. Existem muitos casos nos quais várias espécies ou biótipos estão associados a um único hospedeiro (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998), por exemplo, a antracnose dos frutos da mangueira e abacateiro é causada por *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, enquanto o morangueiro pode ser infectado durante todo seu ciclo por *C. fragariae*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Quando isolados caracterizados como *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foram inoculados em algumas frutíferas, como pêssego e maçã, apresentaram sintomas visualmente indistinguíveis (BERNSTEIN; ZEHR; DEAN, 1995), comprovando a dificuldade de identificação das espécies causadoras de antracnose nesses hospedeiros. Esses dados trazem um problema de ordem prática no controle da doença, já que, como já citado anteriormente, diferentes espécies comportam-se diferentemente a controle químico e controle genético.

Por meio de testes de patogenicidade, resultados positivos foram obtidos por Carvalho; Leite e Ueno (2000) para caracterização de espécies de *Colletotrichum*, onde foi possível caracterizar *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* associados a podridão amarga dos frutos de macieira.

Assis et al. (2001) relatou diferença de agressividade entre os isolados de *C. gloeosporioides* de mangueira além da diferença na intensidade de sintomas quando os isolados foram produzidos sobre substratos com variação na fonte de carbono, sendo que, o amido proporcionou maior indução de patogenicidade.

Em estudos de inoculação cruzada também é possível fazer algumas caracterizações. Freeman; Katan e Shabi (1998) observaram a infecção cruzada de *C. gloeosporioides* entre amêndoa, maçã, abacate e manga, e *C. acutatum* em maçã e pêssego, enquanto Lima; Oliveira e Menezes (2003) observaram que isolados

provenientes de maracujá eram patogenicamente diferentes dos isolados provenientes de caju, mamão, manga e banana, pois estes infectavam todos os hospedeiros mencionados, enquanto maracujá só foi infectado por seus isolados de origem e nenhum dos isolados dos outros frutos.

Em isolados de *Colletotrichum* provenientes de solanáceas, Mello e Massola Jr. (2003) verificaram que houve a infecção cruzada entre isolados de pimenta e pimentão. Isolados de jiló foram patogênicos a pimenta e pimentão, enquanto isolados desses últimos hospedeiros não foram patogênicos a jiló. Esses resultados contrastam com os obtidos por Fernandes; Ribeiro e Escher (1995) que verificaram que isolados de *Colletotrichum* de jiló não infectaram frutos de pimentão.

Estudos conduzidos por Swart (1999) concluíram que a agressividade de isolados de *Colletotrichum* também podem variar de acordo com a região de origem destes, pois isolados de manga e de abacate quando inoculados em frutos de pimentas produziram lesões mais severas que no hospedeiro de origem e foi possível caracterizar essa severidade diferença na agressividade em função da região de origem do isolado.

Além de tudo que já foi mencionado, alguns trabalhos indicam que o estágio de maturação dos frutos também interfere na incidência e severidade da doença. Kim; Oh e Yang (1999) verificaram que frutos imaturos com ou sem fermento e frutos maduros com fermento tiveram sintomas típicos de antracnose quando inoculados com *C. gloeosporioides*, enquanto frutos maduros sem fermentos apresentaram apenas uma descoloração no local da inoculação. Esses autores explicam este fato devido a frutos imaturos terem maior atividade de peroxidases e polifenol-oxidases e menores níveis de compostos fenólicos, aminoácidos e carboidratos que frutos maduros, e estes últimos compostos estão relacionados com hospedeiros resistentes. Outra explicação para o maior desenvolvimento das lesões em frutos imaturos do que maduros é que a camada cerosa presente nos frutos aumenta em espessura conforme a maturação dos mesmos.

Juntamente com testes de patogenicidade, técnicas moleculares auxiliam na caracterização e identificação das espécies de *Colletotrichum* causadoras de

antracnose das solanáceas. Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso para complementar estudo de diferenciação de populações de *Colletotrichum*. Com a utilização de “primers” específicos para espécies de *Colletotrichum* obtidos a partir da análise de seqüência da região ITS podemos confirmar os resultados gerados da morfologia e patogenicidade (MILLS; HODSON; BROWN 1992, ADASKAVEG; FOSTER, 2000, ALAKAHOON; BROWN; SREENIVASAPRASAD, 1994, BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996, FREEMAN; KATAN; SHABI, 1996, FREEMAN; SHABI, 1996, LARDNER et al., 1999, FREEMAN et al., 2000, FREEMAN et al, 2001).

Estes “primers” já estão descritos na literatura, como por exemplo, CaINT 2, específico para *C. acutatum* (SREENIVASAPRASAD et al., 1995), CgINT, específico para *C. gloeosporioides* (MILLS; HODSON; BROWN, 1992) e Cc1NF1, específico para *C. coccodes* (CULLEN et al., 2001) e CcINT, específico para *C. capsici* (AVRDC, 2003). Afanador-Kafuri et al. (2003) estudando características morfológicas e moleculares isolados de *Colletotrichum* de *Solanum betaceae*, manga e maracujá observaram que por características morfológicas, isolados de *S. betaceae* se enquadraram como representantes de *C. acutatum* e isolados de maracujá e manga como *C. gloeosporioides*. Esses mesmos isolados quando submetidos a análise de PCR utilizando “primers” específicos para determinação de espécies, confirmou que isolados provindos de *S. betaceae* eram *C. acutatum* e provindos de manga eram *C. gloeosporioides*, mas, os isolados de maracujá não foram amplificados com “primers” dessas espécies, sendo classificados como *Colletotrichum* sp., confirmando, mais uma vez, a importância de unir estudos de morfologia e patogenicidade com análise de DNA.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Obtenção dos isolados

Foram caracterizados neste estudo 42 isolados de diferentes localidades do Brasil, sendo eles, 26 provenientes de pimentão, 6 de pimenta e 10 de jiló e como padrões para comparação 1 de pêssego (padrão *C. acutatum*), 1 de mamão (padrão *C. gloeosporioides*) e 1 de batata (padrão *C. coccodes*) (Tabela 1). Frutos atacados pelo patógeno tiveram seus tecidos desinfestados com álcool 70% por 1 minuto, em seguida, hipoclorito de sódio 0,5% por 2 minutos, enxaguados com água destilada em abundância e colocados em bandejas plásticas contendo algodão umedecido fechadas com plástico, formando câmara úmida, condição favorável à esporulação. Após a esporulação, os conídios foram plaqueados diretamente em ágar-água e posteriormente foi realizado o isolamento monospórico para assegurar uniformidade genética. O isolamento monospórico foi executado por plaqueamento de suspensão diluída de esporos em placas de Petri com ágar-água e após 16 horas os esporos germinados foram localizados e tiveram a superfície do meio marcada com o auxílio de um microscópio equipado com objetiva própria para esse procedimento. A região contendo o esporo germinado foi transferida para outra placa de Petri com meio de batata-dextrose-ágar, o qual permaneceu a 26 °C, sob luz contínua por cerca de sete dias para, em seguida, iniciar o processo de preservação dos isolados. Estes foram armazenados em tubos de ensaio contendo meio de batata-dextrose-ágar. Após a colonização do meio, foi adicionado óleo mineral estéril, que assegurou a preservação do fungo, mantendo as características originais dos isolados por longos períodos.

Tabela 1- Nomenclatura, hospedeiro de origem e procedência dos isolados utilizados no estudo

(continua)

Isolado	Hospedeiro	Procedência
PI 02	Pimentão	Campinas – SP
PI 03	Pimentão	Jarinu – SP
PI 04	Pimentão	Supermercado local
PI 05	Pimentão	Supermercado local
PI 06	Pimentão	Supermercado local

Tabela 1- Nomenclatura, hospedeiro de origem e procedência dos isolados utilizados no estudo

			(conclusão)
<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Procedência</b>	
<b>PI 07</b>	Pimentão	Mombuca – SP	
<b>PI 08</b>	Pimentão	Elias Fausto – SP	
<b>PI 10</b>	Pimentão	Paulínia - SP	
<b>PI 11</b>	Pimentão	Paulínia – SP	
<b>PI 12</b>	Pimentão	Recife – PE	
<b>PI 13</b>	Pimentão	Recife – PE	
<b>PI 14</b>	Pimentão	Instituto Biológico - SP	
<b>PI 15</b>	Pimentão	Piracicaba	
<b>PI 16</b>	Pimentão	Supermercado local	
<b>PI 17</b>	Pimentão	Brasília – DF	
<b>PI 20</b>	Pimentão	Londrina – PR	
<b>PI 30</b>	Pimentão	Botucatu – SP	
<b>PI 40</b>	Pimentão	PAD –DF	
<b>PI 41</b>	Pimentão	INCRA – DF	
<b>PI 50</b>	Pimentão	Belém - PA	
<b>PI 634</b>	Pimentão	Lins – SP	
<b>PI 809</b>	Pimentão	Bragança Paulista – SP	
<b>PI 922</b>	Pimentão	Clementina - SP	
<b>PI 2523</b>	Pimentão	Bragança Paulista - SP	
<b>PI 2552</b>	Pimentão	Bragança Paulista - SP	
<b>PI 2868</b>	Pimentão	São Miguel Arcanjo - SP	
<b>PA 02</b>	Pimenta doce	Supermercado local	
<b>PA 03</b>	Pimenta vermelha	Pardinho – SP	
<b>PA 04</b>	Pimenta	Turvânia – GO	
<b>PA 06</b>	Pimenta vermelha	Recife – PE	
<b>PA 09</b>	Pimenta americana	Elias Fausto – SP	
<b>PA 10</b>	Pimenta cambuci	Supermercado local	
<b>JI 02</b>	Jiló	Londrina – PR	
<b>JI 03</b>	Jiló	Londrina – PR	
<b>JI 04</b>	Jiló	Bragança Paulista – SP	
<b>JI 05</b>	Jiló	Supermercado local	
<b>JI 07</b>	Jiló	Campinas – SP	
<b>JI 08</b>	Jiló	Indaiatuba – SP	
<b>JI 10</b>	Jiló	Piracicaba – SP	
<b>JI 11</b>	Jiló	Piracicaba – SP	
<b>JI 12</b>	Jiló	Piracicaba - SP	
<b>JI 13</b>	Jiló	Brasília – DF	
<b>JI 14</b>	Jiló	Minas Gerais - MG	
<b>Padrão 1 - <i>C. acutatum</i></b>	Pêssego	Holambra	
<b>Padrão 2 - <i>C. gloeosporioides</i></b>	Mamão	Piracicaba - SP	

### 2.2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica baseou-se nas dimensões e formatos de conídios. A produção dos conídios foi realizada em frutos destacados, sendo que cada isolado foi inoculado no seu hospedeiro de origem. Para isto, colônias dos isolados testados foram cultivadas em meio de aveia a 26 °C por sete dias, e após esse período tiveram seus conídios coletados com uma agulha histológica estéril e inoculados por fermentos nos frutos, que previamente sofreram o processo de assepsia, já descrito no item 2.2.1. Esses frutos permaneceram em câmara úmida por sete dias, período necessário para abundante esporulação. Após esse período, com uma alça de Henle, os conídios sobre os frutos foram coletados, e em seguida preparou-se uma suspensão para a montagem de lâminas semipermanentes usando lactofenol para a fixação.

Para estudos das dimensões os conídios (n=30) dos isolados em estudo tiveram seu comprimento e largura medidos indiretamente por meio da mensuração da imagem dos mesmos. A imagem de aumento de 400x do microscópio óptico (Olympus CH2) foi projetada em monitor televisivo (Color Vídeo Monitor Panasonic CT-2084Y) através de sistema de câmara de vídeo (Digital Color Câmera CCD 1/3" SDC-320 Samsung) acoplado ao microscópio óptico. O valor correspondente às dimensões das imagens (cm), foi convertido para escala real ( $\mu\text{m}$ ), correspondente às dimensões dos conídios (CALDARI Jr., 1998). Para a conversão utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss) e sua imagem no aumento de 400x foi projetada no monitor. As imagens da lâmina foram medidas com uma régua e cada 40  $\mu\text{m}$  da lâmina correspondiam a 19,5 cm no monitor. Assim, por meio de regra de três simples foi possível constatar que cada 1 cm medido no monitor corresponderia a 2,05  $\mu\text{m}$ . Desta forma, todas as medidas de comprimento e largura dos conídios, obtidas em aumento de 400x projetadas no monitor, foram multiplicadas por 2,05, resultando no valor real da dimensão dos conídios, em  $\mu\text{m}$ .

Os resultados obtidos foram comparados com os descritos por Sutton (1980) e Sutton (1992) para fins de classificação.

Para a caracterização dos formatos dos conídios, previamente às avaliações, foram escolhidas lâminas ao acaso que tiveram seus conídios observados com a finalidade de identificar os formatos predominantes. Foram observados sete diferentes formatos que ocorriam com frequência, os quais são descritos abaixo:

Formato 1: fusiforme, ápices afilados

Formato 2: reto, ápices arredondados

Formato 3: clavado, um ápice afilado, outro arredondado

Formato 4: reto, ápices arredondados, constrição mediana

Formato 5: clavado, um ápice afilado, outro arredondado, constrição mediana

Formato 6: semi-clavado, um ápice em bisel, outro arredondado

Formato 7: fusiforme, ápices afilados, constrição mediana

Todas as lâminas foram visualizadas num microscópio óptico Axioshop 2 - Zeiss, em aumento de 400 x, e digitalizadas por meio do programa Carl Zeiss Vision – Axion Vision.

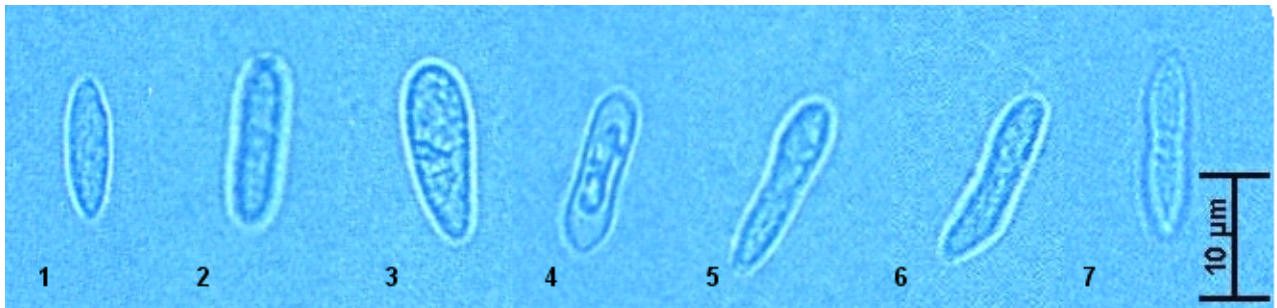


Figura 1 - Formatos de conídios de *Colletotrichum* observados em isolados de hortaliças solanáceas

Para cada isolado estudado verificou-se a frequência de cada formato de conídio (n=30).



### **2.2.3 Caracterização patogênica**

Os 45 isolados foram inoculados em frutos destacados de pimentão cultivar Magda, pimenta dedo de moça e jiló redondo, seguindo a metodologia utilizada por Mello e Massola Jr. (2003).

#### **2.2.3.1 Multiplicação do inóculo**

A multiplicação dos isolados foi realizada por meio de inoculação em frutos destacados como descrito no item 2.2.2. Esses frutos permaneceram em câmara úmida por sete dias, período necessário para abundante esporulação. Após esse período, com uma alça de Henle, os conídios sobre os frutos foram coletados e foram feitas suspensões. A concentração das suspensões foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada para  $10^6$  esporos/ ml.

#### **2.2.3.2 Inoculações**

Todos os isolados foram inoculados em 10 frutos imaturos de cada hospedeiro em estudo, sendo que 5 frutos foram feridos e 5 não sofreram ferimento. Os frutos foram colocados em bandejas plásticas e receberam gotas de 20  $\mu$ L das suspensões de conídios ajustadas a  $10^6$  esporos/ ml em dois pontos distintos de sua superfície, uma mais próxima à região do pedúnculo e próxima a região estilar, chamadas de inoculações proximais e distais, respectivamente. Para o tratamento dos frutos feridos, sob a gota, foram feitos um pequeno ferimento com alfinete entomológico estéril.

Após a inoculação, foram colocados nas bandejas pedaços de algodão umedecidos, para assegurar alta umidade, além de serem cobertas com sacos plásticos borrifados com água, formando câmara úmida. As bandejas foram mantidas a temperatura média de  $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ .

O mesmo procedimento foi utilizado nas testemunhas, mas utilizando apenas água nas inoculações.

Este experimento foi repetido mais uma vez, utilizando-se 14 isolados de pimentão, 6 de pimenta e 10 de jiló, com a finalidade de confirmação dos resultados.

### **2.2.3.3 Avaliação**

As avaliações foram realizadas diariamente e consistiram na: observação do aparecimento do início das lesões (período de incubação - Pi) em dias; observação do aparecimento de esporulação (período de latência - PL) em dias, que foi calculado quando 50% das lesões estavam esporulando; medição do diâmetro das lesões (DL) até 30 dias após a inoculação, em centímetros; cálculo da velocidade média de crescimento (VMC), em centímetros, para cada isolado em cada hospedeiro, tanto na lesão proximal (VCP) quanto na distal (VCD); cálculo da velocidade média de crescimento, em centímetros,  $[(VCP+VCD)/2=VMC]$ ; número de inoculações que apresentaram lesões (incidência - i); diâmetro da lesão aos 12 dias após a inoculação, para frutos dos tratamentos com fermento e 22 dias após a inoculação, para frutos dos tratamentos sem fermentos tanto para lesão proximal (DLP) quanto para lesão distal (DLD) em centímetros.

### **2.2.4 Identificação molecular**

Os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar com estreptomicina, incubados em B.O.D. a 25 °C e fotoperíodo de 12h durante sete dias. O micélio foi utilizado para extração do DNA, seguindo metodologia de Martins e Bacci (2000). Para a lise o micélio foi macerado utilizando solução de TNES (250 mM Tris, 2M NaCl, 100mM EDTA, 2,5% SDS) resfriada, em tubo de microcentrífuga tipo “eppendorf” de 1,5 mL. Após a maceração os tubos foram incubados em banho-maria a 55 °C por 3 h. Completado esse período, foi adicionado RNase A (10 mg/mL) seguindo-se de incubação a 37 °C por 30 min. Para a precipitação das proteínas foram adicionados 200 µL de NaCl 5M e os tubos foram, agitados e centrifugados por 15000 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo isopropanol 100% e agitado para a precipitação do DNA, descartando o “pellet” de proteína. Centrifugou-se novamente centrifugado a 15000 g por 3 min, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de etanol 70 %, agitou-se e centrifugou-se conforme passo anterior. O sobrenadante foi descartado e o

tubo invertido sobre papel para secagem completa. O DNA foi ressuspensão com TE (10 mM Tris-HCl e 0,1 mM EDTA, pH 8,5) e armazenado a -20 °C.

A análise por PCR foi realizada conforme metodologia descrita para cada “primer”.

Para a detecção de *C. acutatum* foi utilizado o “primer” CaINT2 (5' GGG GAA GCC TCT CGC GG 3'), descrito por Sreenivasaprasad, et al., 1995, onde a reação final foi composta de 25 µl, contendo 1,5 µL de DNA extraído (aproximadamente 25 - 50 ng de DNA) em TE, 4 µL de 200 µM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 2,5 µL de 10X tampão para PCR, 0,5 µL de 100 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL do “primer” CaINT2 a 1,0 µM e 1 µL do “primer” ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') a 1,0 µM e 0,13 µL de Taq polimerase (2.5 unidades) em 14,37 µL de água milli-Q. O termociclador foi programado para 30 ciclos de 1,5 min a 94 °C para denaturação, 2 min a 55 °C para anelamento e 3 min a 72 °C para extensão.

Para a detecção de *C. gloeosporioides* foi utilizado o “primer” CgINT (5' GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG 3'), descrito por Mills, et al., 1992, e a reação final foi composta de 25 µl, contendo 1,5 µL de DNA extraído (aproximadamente 25 - 50 ng de DNA) em TE, 4 µL de 200 µM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 2,5 µL de 10X tampão para PCR, 0,5 µL de 100 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL do “primer” CgINT a 1,0 µM e 1 µL do “primer” ITS4 a 1,0 µM e 0,13 µL de Taq polimerase (2.5 unidades) em 14,37 µL de água milli-Q. O termociclador foi programado para 35 ciclos de 1 min a 94 °C para denaturação, 2 min a 59 °C para anelamento e 2 min a 72 °C para extensão.

Para a detecção de *C. coccodes* foi utilizado o “primer” Cc1NF1 (5' TGC CGC CTG CGG ACC CCC CT 3') em conjunto com o “primer” Cc2NR (5' GGC TCC GAG AGG GTC CGC CA 3'), descrito por Cullen, et al., 2001, e a reação final foi composta de 25 µl, contendo 1,5 µL de DNA extraído (aproximadamente 25 - 50 ng de DNA) em TE, 4 µL de 200 µM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 2,5 µL de 10X tampão para PCR, 0,5 µL de 100 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada “primer” a 0,3 µM e 0,2 µL de Taq

polimerase (2.5 unidades) em 14,3 µL de água milli-Q. O termociclador foi programado para 35 ciclos de 45 seg a 95 °C para denaturação, 2 min e 25 seg a 72 °C para anelamento e extensão.

Para a detecção de *C. capsici* foi utilizado o “primer” CcINT (5' TCT CCC CGT CCG CGG GTG G 3') em conjunto com o “primer” ITS4, descrito por AVRDC, 2003, e a reação final foi composta de 25 µl, contendo 1,5 µL de DNA extraído (aproximadamente 25 - 50 ng de DNA) em TE, 4 µL de 200 µM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 2,5 µL de 10X tampão para PCR, 0,5 µL de 100 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada “primer” a 0,3 µM e 0,2 µL de Taq polimerase (2.5 unidades) em 14,3 µL de água milli-Q. O termociclador foi programado para 35 ciclos de 30 seg a 94 °C para denaturação, 30 seg a 63 °C para anelamento e 1 min e 30 seg a 72 °C para extensão.

Para a confirmação do gênero *Colletotrichum* foi utilizado o par de “primers” Cc1F1 (5' ACC TAA CTG TTG CTT CGG CG 3') e Cc2R1 (5' AAA TTT GGG GGT TTT ACG GC 3') descrito por Cullen, et al., 2001. A reação original descrita pelos autores precisou sofrer algumas alterações, sendo a reação final composta de 25 µl contendo 1,5 µL de DNA extraído (aproximadamente 25 - 50 ng de DNA) em TE, 0,2 µL de 200 µM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 5 µL de 10X tampão para PCR, 1 µL de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µL dos “primers” Cc1F1 e Cc2R1 a 1,0 µM e 0,13 µL de Taq polimerase (2.5 unidades) em 16 µL de água milli-Q. O termociclador foi programado para 40 ciclos de 1 min de 94 °C para denaturação, 2 minutos a 60 °C para anelamento e 2 minutos a 72 para extensão, com extensão final de 5 min a 72 °C.

Após as amplificações, os produtos dos PCR foram aplicados em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X. A corrida eletroforética ocorreu em voltagem constante de 100V por 1 h. A seguir, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio por 10 min., para coloração, com posterior lavagem em água destilada por 10 min. As bandas de DNA amplificadas foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas.

### 2.2.5 Delineamento estatístico

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. As análises estatísticas foram realizadas por meio do “software” SANEST e SAS para “Windows”, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Caracterização morfológica

#### 2.3.1.1 Dimensões dos conídios

Os dados de dimensões dos conídios obtidos não puderam ser utilizados para identificar as espécies encontradas devido à variabilidade que ocorre na classificação, existindo uma faixa de sobreposição de dimensões entre as espécies. Para *C. acutatum* já foram descritos conídios com 8,3 -14,4 x 2,5 – 4  $\mu\text{m}$  (SIMMONDS, 1965), 8 – 16 x 2,5 – 4  $\mu\text{m}$  (DYKO; MORDUE, 1979), 8,5 – 10 x 4,5 – 6,0  $\mu\text{m}$  (SUTTON, 1980), 12,3 – 14,7 x 4,4 – 5,3  $\mu\text{m}$  (SMITH; BLACK, 1990), 10 – 18 x 2,5 – 4,5 (WALKER; NIKANDROW; MILLAR, 1991) e 12,5 – 20 x 3 – 5  $\mu\text{m}$  (GUNNEL; GLUBER, 1992) enquanto para *C. gloeosporioides* 16 – 18 x 4 – 6  $\mu\text{m}$  (SACCARDO, 1884, citado por VINNERE, 2004), 12 -22 x 4 – 6  $\mu\text{m}$  (von ARX, 1957), 5,0 – 47,5 x 2,5 - 7,5  $\mu\text{m}$  (MORDUE, 1971) e 9 – 24 x 3 – 4,5  $\mu\text{m}$  (SUTTON, 1980).

Todos os isolados avaliados se enquadraram nas classificações já existentes, porém, devido a sobreposição nas dimensões, as espécies não puderam ser identificadas com base nesta característica. Entretanto houve diferenças significativas

nas dimensões dos conídios obtidos nos diferentes isolados avaliados (Tabela 2, figura 2). O comprimento dos conídios avaliados variou de 9,18 a 19,25  $\mu\text{m}$  enquanto a largura de 2,0 a 5,94  $\mu\text{m}$ . Os isolados PI, provenientes de pimentão, variaram no comprimento de 10,10 a 15,96  $\mu\text{m}$ , os PA, provenientes de pimenta, de 13,32 a 15,64  $\mu\text{m}$  e os JI, provenientes de jiló, de 10,47 a 12,81  $\mu\text{m}$ . Todos os isolados JI apresentaram conídios de comprimento inferior aos isolados PA e em grande parte aos isolados PI. Isolados PA e JI foram mais uniformes com relação ao comprimento do que os isolados PI. Em média, os isolados PI apresentaram comprimento de 13,57  $\mu\text{m}$ , isolados PA de 14,52  $\mu\text{m}$  e isolados JI de 11,98  $\mu\text{m}$ .

O fato de o comprimento ser maior em isolados PA já havia sido constatado no trabalho de Bueno; Tozze Jr. e Massola Jr. (2005), que analisando os substratos meio de aveia, meio de BDA, frutos de pimentão, pimenta e jiló, os conídios produzidos em pimenta foram maiores que em relação aos produzidos nos outros substratos, independente do hospedeiro de origem.

Com relação à largura, a variação foi menor do que o comprimento. Todos os isolados foram mais uniformes, com destaque para os isolados JI, para os quais a variação foi apenas de 2,56 a 3,74  $\mu\text{m}$ . Em média, os isolados PI apresentaram largura de 3,17  $\mu\text{m}$ , os isolados PA de 3,27  $\mu\text{m}$  e os isolados JI de 3,28  $\mu\text{m}$ .

A relação comprimento/largura tem sido utilizada por diversos autores para caracterizar a morfologia dos conídios (VERAS; GASPAROTTO; MENEZES, 1997, FURTADO, et al. 1999, COUTO; MENEZES, 2004). Neste caso, também se constatou maior uniformidade dos isolados de PA e JI, diferenciando-os dos isolados PI novamente.

Tabela 2 - Dimensões dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* avaliados

(continua)

Isolado	Comprimento		Largura		C/L
	(menor – maior)	<b>Média*</b>	(menor – maior)	<b>Média</b>	
PI 02	(12,62 – 15,21)	<b>13,91</b> cde	(2,87 – 4,01)	<b>3,73</b> bc	3,73
PI 03	(11,40 – 16,53)	<b>13,11</b> def	(2,85 – 4,56)	<b>3,42</b> cde	3,83
PI 04	(11,40 – 14,42)	<b>12,54</b> def	(2,28 – 3,42)	<b>2,56</b> fg	4,90
PI 05	(13,77 – 15,21)	<b>14,03</b> bcd	(2,29 – 3,70)	<b>3,30</b> cde	4,25
PI 06	(10,66 – 14,55)	<b>12,30</b> def	(2,66 – 4,30)	<b>3,48</b> cd	3,53
PI 07	(11,25 – 15,37)	<b>13,53</b> cde	(2,66 – 3,89)	<b>3,28</b> cde	4,13

PI 08	(12,54 – 18,24)	<b>15,96</b> ab	(2,28 – 3,42)	<b>2,73</b> ef	5,85
PI 10	(10,66 – 14,96)	<b>12,50</b> def	(2,66 – 4,30)	<b>3,48</b> cd	3,59
PI 11	(10,25 – 14,20)	<b>12,34</b> def	(2,87 – 4,01)	<b>3,15</b> de	3,92
PI 12	(9,20 – 11,48)	<b>10,10</b> efg	(2,07 – 2,29)	<b>2,19</b> fg	4,61
PI 13	(10,86 – 15,99)	<b>12,91</b> de	(3,28 – 4,30)	<b>3,89</b> abc	3,32
PI 14	(11,27 – 16,81)	<b>14,14</b> bcd	(2,66 – 4,10)	<b>3,28</b> cde	4,31
PI 15	(12,91 – 15,78)	<b>14,35</b> bc	(2,50 – 4,50)	<b>3,73</b> bd	3,84
PI 16	(10,25 – 15,35)	<b>12,30</b> def	(3,07 – 3,89)	<b>3,28</b> cde	3,75
PI 17	(11,20 – 14,50)	<b>13,30</b> cde	(2,80 – 3,40)	<b>3,30</b> cde	4,03
PI 20	(12,50 – 14,62)	<b>13,68</b> cde	(2,60 – 3,60)	<b>2,80</b> ef	4,88
PI 30	(15,21 – 17,22)	<b>15,49</b> ab	(4,01 – 4,60)	<b>4,30</b> ab	3,60
PI 40	(10,25 – 15,37)	<b>12,91</b> def	(2,66 – 4,10)	<b>3,48</b> cd	3,71
PI 41	(11,27 – 14,55)	<b>13,32</b> cde	(2,87 – 3,48)	<b>3,28</b> cde	4,06
PI 50	(12,54 – 19,95)	<b>15,96</b> ab	(2,28 – 4,56)	<b>3,42</b> cde	4,67
PI 634	(12,30 – 16,04)	<b>14,55</b> bcd	(4,10 – 5,94)	<b>4,71</b> ab	3,09
PI 809	(12,60 – 14,60)	<b>13,70</b> cd	(2,58 – 3,70)	<b>2,87</b> ef	4,77
PI 922	(10,26 – 17,67)	<b>14,25</b> bcd	(1,91 – 2,85)	<b>2,52</b> fg	5,65
PI 2523	(11,26 – 15,37)	<b>12,91</b> def	(2,46 – 4,10)	<b>3,28</b> cde	3,94
PI 2552	(11,27 – 15,37)	<b>13,12</b> de	(2,66 – 3,89)	<b>3,28</b> cde	4,00
PI 2868	(12,90 – 18,65)	<b>15,78</b> ab	(2,58 – 3,73)	<b>3,01</b> ef	5,24
PA 02	(12,91 – 17,22)	<b>14,96</b> abc	(2,66 – 3,69)	<b>3,28</b> cde	4,56
PA 03	(13,32 – 16,19)	<b>14,37</b> bc	(3,28 – 4,10)	<b>3,76</b> bd	3,82

Tabela 2 - Dimensões dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* avaliados

(conclusão)

Isolado	Comprimento		Largura		C/L
	(menor – maior)	Média*	(menor – maior)	Média	
PA 04	(13,77 – 16,64)	<b>15,64</b> ab	(2,87 – 3,73)	<b>3,15</b> de	4,97
PA 06	(12,91 – 15,49)	<b>14,92</b> abc	(2,58 – 3,44)	<b>3,30</b> cde	4,52
PA 09	(11,27 – 16,60)	<b>13,32</b> cde	(2,46 – 3,69)	<b>2,87</b> ef	4,64
PA 10	(11,48 – 15,78)	<b>13,91</b> cd	(2,00 – 3,73)	<b>3,30</b> cde	4,22
JI 02	(9,40 – 15,64)	<b>11,76</b> efg	(2,35 – 3,52)	<b>3,28</b> cde	3,59
JI 03	(10,25 – 12,71)	<b>11,48</b> efg	(2,87 – 3,69)	<b>3,28</b> cde	3,50
JI 04	(9,40 – 15,28)	<b>12,81</b> def	(2,32 – 4,04)	<b>3,52</b> bcd	3,64
JI 05	(10,66 – 15,37)	<b>14,04</b> cd	(2,46 – 4,30)	<b>3,74</b> bc	3,75
JI 07	(10,45 – 14,55)	<b>12,71</b> def	(2,87 – 4,10)	<b>3,28</b> cde	3,88
JI 08	(9,18 – 10,90)	<b>10,47</b> efg	(2,29 – 3,04)	<b>3,01</b> ef	3,48
JI 10	(11,27 – 13,94)	<b>12,71</b> de	(2,87 – 4,10)	<b>3,28</b> cde	3,88
JI 11	(9,22 – 14,35)	<b>11,89</b> ef	(2,87 – 3,89)	<b>3,48</b> cde	3,42
JI 12	(9,46 – 12,91)	<b>10,47</b> efg	(2,46 – 3,00)	<b>2,56</b> fg	4,09
JI 13	(9,22 – 13,53)	<b>11,48</b> ef	(2,87 – 4,10)	<b>3,48</b> cd	3,30
<i>C. acutatum</i>	(12,91 – 14,35)	<b>14,35</b> bc	(2,28 – 3,44)	<b>3,15</b> de	4,56
<i>C. gloeosporioides</i>	(12,90 – 17,00)	<b>14,90</b> ab	(2,60 – 3,60)	<b>3,30</b> de	4,51
<i>C. coccodes</i>	(12,62 – 17,22)	<b>14,92</b> ab	(2,87 – 3,44)	<b>3,17</b> de	4,71

\* Análise estatística realizada com dados não transformados. A comparação entre as médias deve ser realizada na coluna. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey. Coeficiente de variação de 7,4%.

1 Isolado de pêsego, 2 de mamão e 3 de batata.

### 2.3.1.2 Formato dos conídios

Os conídios foram classificados com relação aos formatos descritos no item 2.2.2 e estão apresentados na tabela 3 e figura 2 e 3.

Dos 42 isolados estudados, 21 apresentaram predominantemente o formato tipo 1 que é característico por ser fusiforme de ápices afilados; 19 o formato tipo 2 que são retos de ápices arredondados e 2 do tipo 3, clavado, um ápice arredondado, outro afilado.

Todos os isolados PA apresentaram formato tipo 2 o que os classificaria como representantes da espécie *C. gloeosporioides*. Os isolados JI apresentaram formato tipo 1, com exceção do isolado JI 05, o que os classificaria como representantes da espécie *C. acutatum*. Dos 26 isolados PI, 12 foram do tipo 1, 12 foram do tipo 2 e 2 do tipo 3, representando as duas espécies já mencionadas.

Os isolados JI apresentam menor variação quanto ao formato que os isolados PA e PI.

Essa variação fenotípica tem sido relatada por outros autores, sendo descrito que uma das causas das diferenças encontradas em conídios decorre diretamente da estrutura onde são produzidos. Conídios produzidos em acérvulos são mais uniformes que aqueles produzidos em conidióforos filídicos, freqüentemente produzidos em meio de cultura. Dessa forma, cada isolado de *Colletotrichum* é constituído por uma população de biótipos, tornando muito difícil a definição do conceito morfológico de espécie (MENEZES, 2002).

Isolados que possuem morfologia intermediária não podem ter a espécie definida, devendo-se usar uma integração de métodos para tal finalidade. Mesmo assim, em alguns trabalhos que usaram a integração de métodos, os dados moleculares não concordaram com dados morfológicos (SREENIVASAPRASAD, et al., 1995; YANG; SWEETENGHAM, 1998; NIRENBERG; FEILER; HAGEDORN, 2002).

Atualmente sabemos que muitos caracteres morfológicos podem ser facilmente alterados dependendo do ambiente e não necessariamente porque há variação dentro



de seus genomas. Uma das maiores limitações de utilizar caracteres morfológicos para a identificação de espécies é que diferenças morfológicas não representam, necessariamente, diferentes espécies, mas uma variação fenotípica dentro da espécie. Essa variação fenotípica dificulta ainda mais a identificação quando há conídios que exibem formas morfológicas intermediárias, como no caso de *Colletotrichum*, discutido primeiramente por van der Aa; Noordeloos e de Gruyter (1990).

Apesar dessas considerações, caracteres morfológicos e suas técnicas de diagnóstico não devem ser subestimados ou negligenciados, mas sim suplementados com outras técnicas.

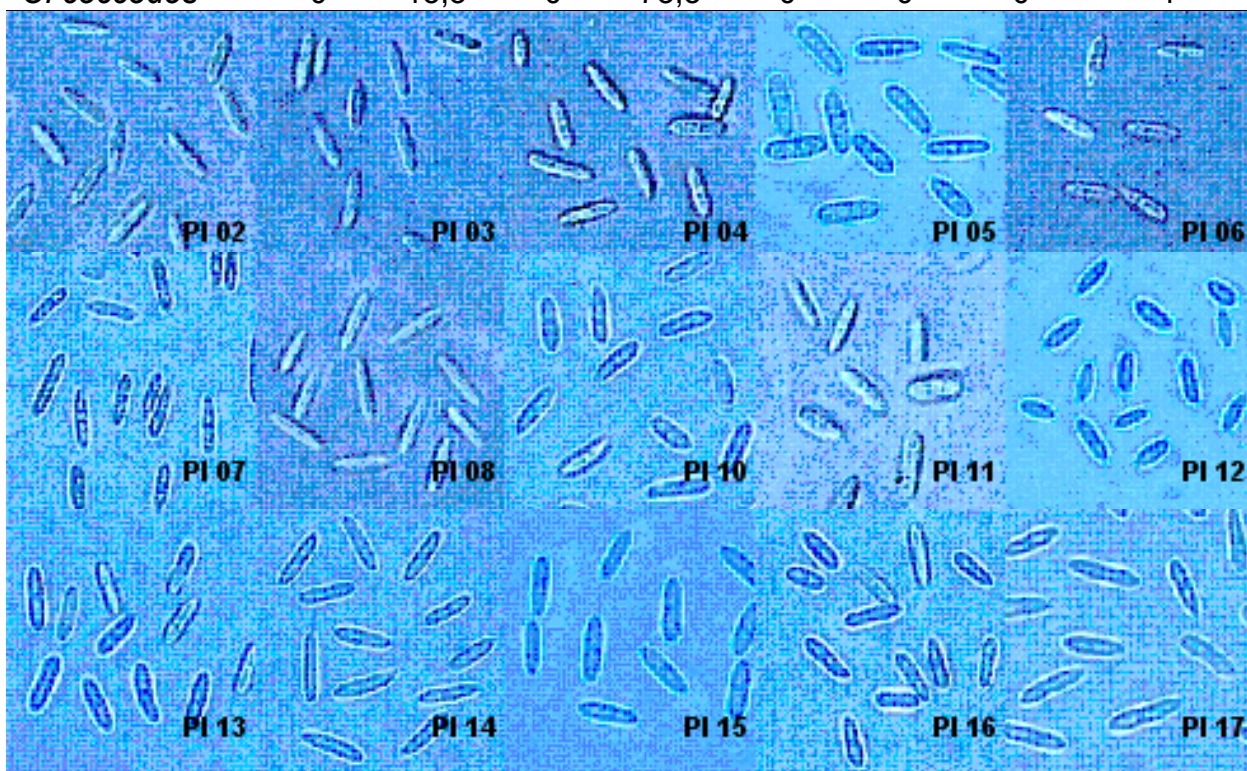
Tabela 3 - Caracterização dos formatos dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* (continua)

Isolado	Tipo de formato (%)							Maior %
	1	2	3	4	5	6	7	
PI 02	50	6,7	40	0	3,3	0	0	1
PI 03	76,7	3,3	20	0	0	0	0	1
PI 04	76,7	0	13,3	6,7	3,3	0	0	1
PI 05	73,3	16,7	10	0	0	0	0	1

Tabela 3 - Caracterização dos formatos dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* (conclusão)

Isolado	Tipo de formato (%)							Maior %
	1	2	3	4	5	6	7	
PI 06	6,7	46,7	20	0	16,7	10	0	2
PI 07	73,3	10	13,3	0	0	3,3	0	1
PI 08	6,7	73,3	0	13,3	0	6,7	0	2
PI 10	20	23,3	36,7	3,3	10	3,3	3,3	3
PI 11	23,3	46,7	23,3	0	6,7	0	0	2
PI 12	76,7	0	23,3	0	0	0	0	1
PI 13	3,3	63,3	16,7	13,3	0	3,3	0	2
PI 14	36,7	3,3	40	3,3	16,7	0	0	3
PI 15	86,7	0	6,7	0	0	0	0	1
PI 16	0	73,3	3,3	13,3	10	0	0	2
PI 17	6,7	73,3	0	16,7	3,3	6,7	0	2
PI 20	86,7	0	13,3	0	0	0	0	1
PI 30	0	93,4	6,7	0	0	0	0	2
PI 40	3,3	80,0	10,0	3,3	3,3	0	0	2
PI 41	6,7	73,3	0	16,7	3,3	6,7	0	2
PI 50	0	73,3	16,7	6,7	3,3	0	0	2
PI 634	76,7	3,3	20	0	0	0	0	1
PI 809	86,7	0	13,3	0	0	0	0	1
PI 922	33,3	46,7	13,3	0	6,7	0	0	2

PI 2523	26,7	50	10	6,7	3,3	0	3,3	2
PI 2552	86,7	0	6,7	0	3,3	3,3	0	1
PI 2868	73,3	0	13,3	0	0	13,3	0	1
PA 02	0	40	23,3	10	0	26,7	0	2
PA 03	3,3	46,7	30	6,7	0	13,3	0	2
PA 04	0	73,3	3,3	0	16,7	0	0	2
PA 06	0	50	23,3	20	0	6,7	0	2
PA 09	6,7	46,7	26,7	3,3	0	16,7	0	2
PA 10	0	63,3	13,3	10	0	13,3	0	2
JI 02	80	0	20	0	0	0	0	1
JI 03	93,3	0	0	0	0	0	6,7	1
JI 04	93,3	0	0	0	0	0	6,7	1
JI 05	6,7	86,7	3,3	6,7	0	0	0	2
JI 07	80	3,3	3,3	0	13,3	0	0	1
JI 08	93,3	0	6,7	0	0	0	0	1
JI 10	80	0	10	0	0	10	0	1
JI 11	100	0	0	0	0	0	0	1
JI 12	86,7	0	3,3	10	0	0	0	1
JI 13	76,7	13,3	6,7	3,3	0	0	0	1
<i>C. acutatum</i>	76,7	6,7	16,7	0	0	0	0	1
<i>C.</i>	0	63,3	33,3	0	0	3,3	0	2
<i>gloeosporioide</i>								
<i>s</i>								
<i>C. coccodes</i>	0	13,3	0	73,3	0	0	0	4



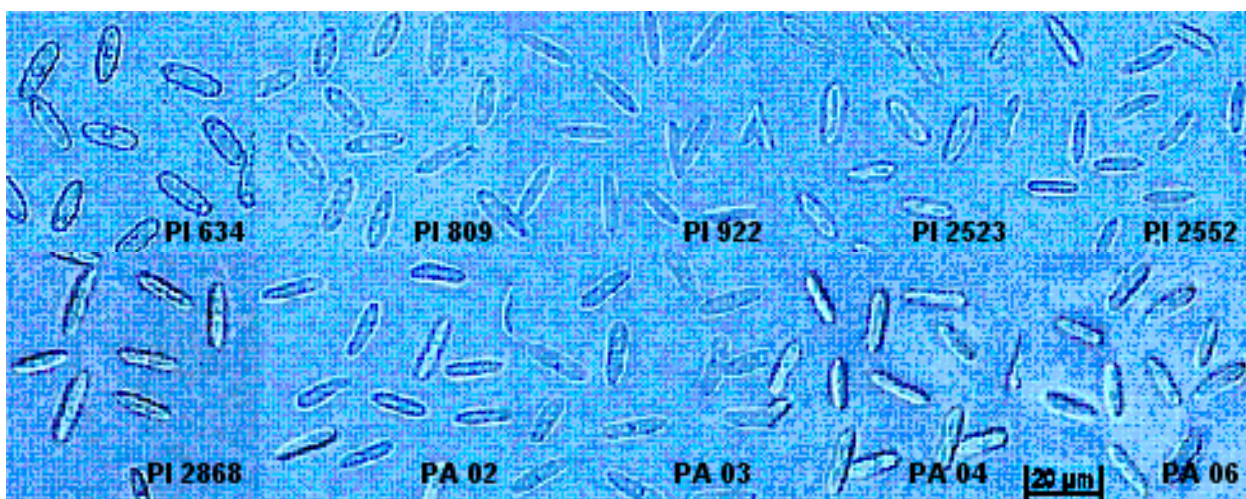
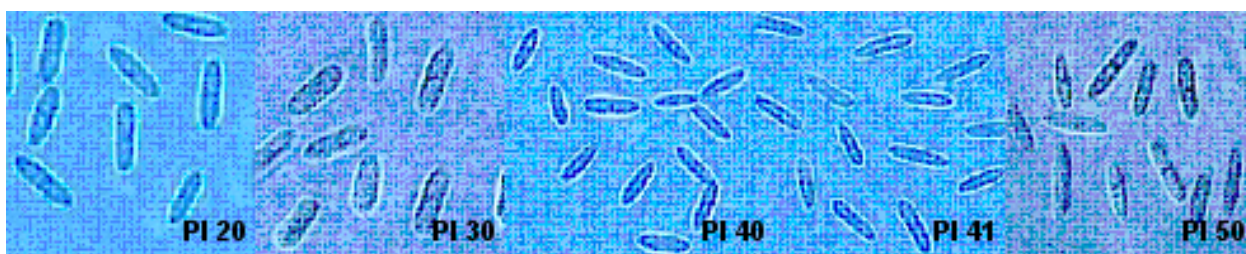
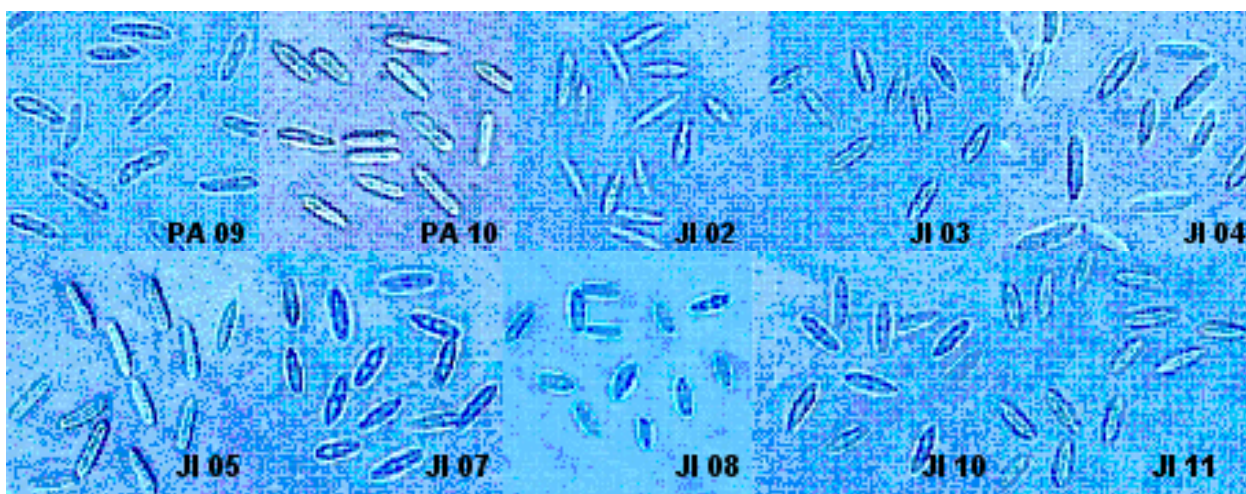


Figura 2 - Morfologia dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* estudados

(continua)



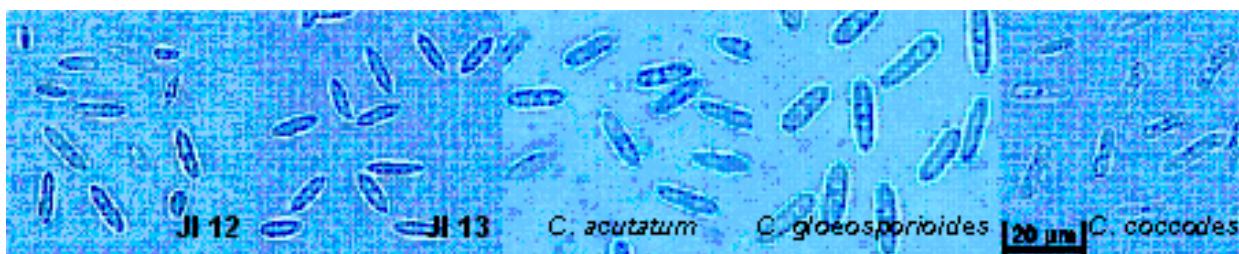


Figura 2 - Morfologia dos conídios dos isolados de *Colletotrichum*

(conclusão)

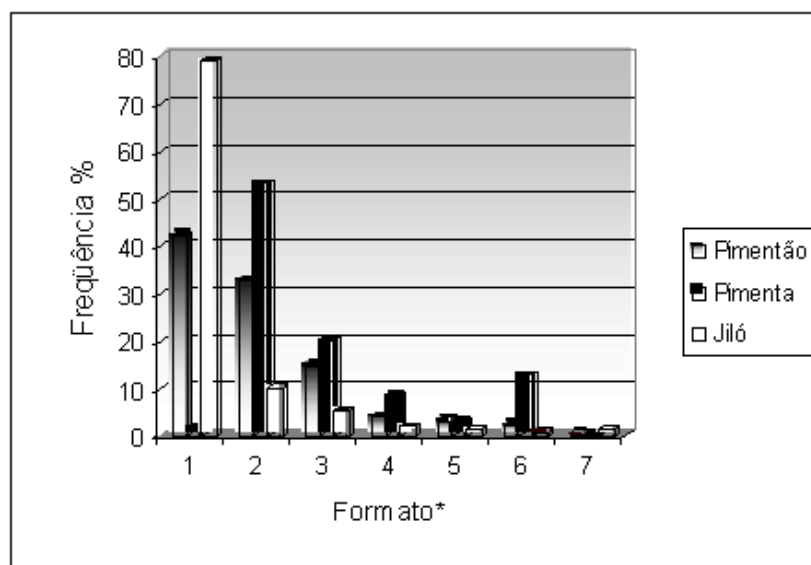


Figura 3 - Distribuição dos diferentes formatos de conídios dos isolados de *Colletotrichum* de pimentão, pimenta e jiló. \*Formatos 1: fusiforme, ápices afilados; 2: reto, ápices arredondados; 3: clavado, um ápice afilado, outro arredondado; 4: reto, ápices arredondados, constrição mediana; 5: clavado, um ápice afilado, outro arredondado, constrição mediana; 6: semi-clavado, um ápice em bisel, outro arredondado; 7: fusiforme, ápices afilados, constrição mediana

### 2.3.2 Caracterização patogênica

Os frutos inoculados com água destilada esterilizada, que serviram como testemunhas, não apresentaram sintomas da doença. Todos os demais tratamentos apresentaram lesões típicas de antracnose.

### 2.3.2.1 Frutos com fermento

Os dados sobre as inoculações em frutos de pimentão podem ser observados na tabela 4, em frutos de pimenta na tabela 5 e em frutos de jiló na tabela 6.

Em frutos de pimentão (Tabela 4) a incidência variou de 30 a 100%, mas em 74% dos casos foi de 100%. Todos os isolados avaliados causaram doença. Em frutos de pimenta (Tabela 5) a incidência também variou de 30 a 100%, sendo que os isolados PA sempre apresentaram 100% de infecção. Apenas o isolado JI 10 não foi capaz de causar doença em frutos de pimenta. Isolados PA e PI não foram capazes de infectar frutos de jiló (Tabela 6), salvo os isolados PI 13 e PI 30 (figura 6), que foram os únicos identificados molecularmente como *C. gloeosporioides* (figura 15).

Os padrões também foram inoculados nos três hospedeiros. O isolado padrão de *C. acutatum* (pêssego) infectou frutos de pimenta, mas não de pimentão ou jiló. Já os padrões de *C. gloeosporioides* (mamão) e *C. coccodes* (batata) infectaram tanto pimentão quanto pimenta, sendo que os frutos de jiló não foram infectados por nenhum dos padrões utilizados.

Para os frutos de pimentão o período de incubação variou de 2 a 5 dias, sendo que para os isolados PI esse período variou de 2 a 5 dias. Para os isolados PA e JI, o período de incubação em frutos de pimentão variou entre 2 e 3 dias, apresentando menor variação em comparação os isolados PI. Para frutos de pimenta o período de incubação foi superior que para os frutos de pimentão, variando de 3 a 10 dias, sendo que isolados PI foram os mais variáveis, apresentando o período de 4 a 10 dias. Frutos de jiló apresentaram também alta variabilidade quanto ao período de incubação, variando de 3 a 9 dias. Frutos inoculados com isolados provenientes do mesmo hospedeiro que deu origem ao isolado, apresentaram período de incubação inferior aos demais, com exceção em alguns casos em frutos de pimentão.

O período de latência ocorreu, normalmente, 1 ou 2 dias após o período de incubação. Em frutos de pimentão, todos os isolados esporularam num curto período após a inoculação, ou seja, entre 3 e 7 dias. É interessante notar que o período de latência está totalmente ligado ao período de incubação e não a fatores intrínsecos do hospedeiro pimentão, pois todos isolados esporularam logo após o aparecimento das lesões. Em frutos de pimenta, o mesmo não parece acontecer. Alguns isolados PI não

tiveram a capacidade de esporular sobre as lesões, isto é, apesar de existir a lesão e o isolado ser capaz de esporular, pois todos esporularam em frutos de pimentão, algo intrínseco ao fruto de pimenta impediu isso. Além disso, isolados PI e JI tiveram o período de latência superior aos isolados PA, apresentando um quadro diferente do hospedeiro pimentão. Em frutos de jiló o período de latência foi bem inferior para os isolados JI, de 4 a 8 dias, do que para os dois únicos isolados PI que infectaram jiló, que apresentaram PL de 10 a 11 dias, mas todos esporularam sobre as lesões.

Isolados JI apresentaram, no centro das lesões, massa de conídios acinzentados, independente do hospedeiro inoculado, contrastando com a massa rósea produzidas pelos isolados PI e PA (figura 7 e 8).

A velocidade de crescimento média diária foi calculada durante doze dias, período máximo no qual as lesões proximais e distais não coalesceram. A VMC dos isolados inoculados em frutos de pimentão variou de 0,35 a 0,85 cm/dia. Os isolados PI de 0,35 a 0,80 cm/dia enquanto os solados PA e JI de 0,35 a 0,45 e 0,35 a 0,70 cm/dia, respectivamente. Em frutos de pimenta a VMC teve maior amplitude, variando de 0,26 a 1,05 cm/dia. Neste caso os isolados PA se destacaram, crescendo de 0,33 a 1,05 cm/dia comparados aos isolados PI e JI que apresentaram 0,26 a 0,85 cm/dia e 0,35 a 0,65 cm/dia, respectivamente. Frutos de jiló proporcionaram menor VMC dos isolados de 0,15 a 0,60 cm/dia quando comparado aos frutos de pimentão e pimenta. Todos os isolados tiveram VMC menor que 0,60 cm/dia.

A VCD foi, em quase a totalidade, superior a VCP em frutos de pimentão e pimenta. Já em jiló não existiram diferenças significativas entre as VCD e VCP. As VCP e VCD variaram de 0,30 a 0,80 cm/dia e 0,20 a 1,00 cm/dia para frutos de pimentão, 0,20 a 1,00 cm/dia e 0,29 a 1,10 cm/dia para frutos de pimenta e 0,20 a 0,70 cm/dia e 0,40 a 0,50 cm/dia para frutos de jiló.

O diâmetro médio das lesões foi sempre maior nas lesões distais que nas proximais para os três hospedeiros e variaram de 2,15 a 5,84 cm, de 0,50 a 2,88 cm e de 0,65 a 2,67 cm para pimentão, pimenta e jiló, respectivamente.

Pimentão, pimenta e jiló tiveram suas lesões proximais com o diâmetro variando de 2,00 a 5,65 cm, 0,50 a 3,20 cm e 0,66 a 2,34 cm, respectivamente, enquanto para

as lesões distais foram 2,30 a 6,10 cm, de 0,50 a 3,40 cm e de 1,20 a 3,00 cm, respectivamente.

Com base nesses resultados não se pode agrupar isolados de acordo com hospedeiro de origem, nem com localidade. As reações dependeram, totalmente, dos hospedeiros em que foram inoculados. Muitos estudos de inoculação cruzada tem sido conduzidos para demonstrar que a maioria dos isolados de *Colletotrichum* não é específica ao hospedeiro (ALAHAKOON; BROWN; SREENIVASAPRASAD, 1994, FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998, FREEMAN, 2000, FREEMAN et al., 2000, PERES, et al., 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho foram muito próximos daqueles conseguidos por Bernstein, Zehr e Dean (1995), com exceção dos isolados JI apresentarem lesões e massas de esporos escurecidas em frutos de pimentão e pimenta quando comparados aos isolados PI e PA (figuras 7 e 8). Bernstein, Zehr e Dean (1995) inocularam isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* provenientes de frutos de pêssigo em frutos destacados de abacate, amêndoa, pêssigo e manga. Todos foram infectados, mas não conseguiram relacionar o tamanho das lesões com a origem dos isolados, além dos sintomas serem indistinguíveis entre as espécies do fungo testadas. Trabalho parecido foi conduzido por Freeman e Shabi (1996). Estes pesquisadores inocularam isolados de subpopulações de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* de frutos de abacate, amêndoa, maçã, manga e pêssigo que foram capazes de causar lesões em frutos de abacate, amêndoa, maçã e manga, sem distinção entre tipos de lesões. Portanto, os parâmetros avaliados  $P_i$ ,  $P_L$ ,  $VMC$  e  $DM$  não diferiram de acordo com os isolados, mas sim apenas de acordo com o hospedeiro. Apenas isolados JI parecem ter uma maior especificidade no hospedeiro jiló, já que apenas isolados JI e dois isolados PI, identificados molecularmente como *C. gloeosporioides*, foram capazes de infectá-lo.

Tabela 4 - Período de incubação ( $P_i$ ), latência ( $P_L$ ), incidência ( $i$ ), velocidade média de crescimento por dia em cm ( $VMC$ ) e diâmetro da lesão em cm aos 12 dias após a inoculação ( $DM$ ) em frutos feridos de pimentão

(continua)

1º experimento	2º experimento
----------------	----------------

Isolado	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
PI 02	3	4	60	0,50 cde	3,30 ef	-	-	-	-	-
PI 03	4	5	80	0,45 def	5,00 bc	-	-	-	-	-
PI 04	2	3	90	0,80 ab	3,40 ef	-	-	-	-	-
PI 05	2	3	100	0,45 def	3,60 e	-	-	-	-	-
PI 06	3	4	100	0,50 cde	2,63 fg	-	-	-	-	-
PI 07	2	3	100	0,50 cde	5,51 b	3	4	100	0,45 efg	5,20 bc
PI 08	5	7	80	0,35 efg	2,35 fg	-	-	-	-	-
PI 10	2	4	100	0,46 def	5,51 b	2	4	100	0,50 cde	5,50 b
PI 11	2	4	100	0,55 cde	2,40 fg	-	-	-	-	-
PI 12	3	4	90	0,40 efg	3,00 efg	-	-	-	-	-
PI 13	2	3	100	0,50 cde	5,24 bc	2	3	100	0,60 bc	5,50 b
PI 14	3	5	100	0,52 cde	4,04 de	2	5	100	0,60 bc	4,30 de
PI 15	3	5	100	0,45 def	2,15 fgh	2	4	100	0,40 efg	2,20 fgh
PI 16	4	5	100	0,50 cde	4,25 de	-	-	-	-	-
PI 17	4	7	100	0,60 bcd	4,63 cd	-	-	-	-	-
PI 20	4	5	60	0,40 def	2,75 fg	-	-	-	-	-
PI 30	3	4	100	0,55 cde	4,00 d	3	4	100	0,60 bc	4,23 de
PI 40	3	4	100	0,50 cde	4,68 cd	-	-	-	-	-
PI 41	3	4	100	0,60 bc	4,63 cd	3	4	100	0,55 bcd	4,56 cd
PI 50	2	3	100	0,85 ab	5,25 bc	2	4	100	0,80 ab	5,20 bc
PI 634	2	4	100	0,68 bc	5,84 a	2	3	100	0,60 bc	5,50 b
PI 809	2	3	100	0,61 bcd	5,54 b	2	3	100	0,60 bc	5,41 b
PI 922	2	3	100	0,55 cde	4,25 de	2	3	100	0,50 cde	4,20 de
PI 2523	3	4	100	0,45 def	5,00 cd	2	3	100	0,50 cde	5,50 b
PI 2552	2	3	100	0,40 def	5,25 bc	2	3	100	0,50 cde	5,52 b
PI 2868	2	3	100	0,60 bc	4,15 de	3	3	100	0,60 bc	4,01 de
PA 02	3	4	100	0,45 def	4,64 c	3	4	100	0,45 efg	4,57 cd
PA 03	3	4	100	0,45 def	4,43 cd	3	4	100	0,45 efg	4,20 de
PA 04	3	4	90	0,45 def	5,12 cd	3	4	100	0,45 efg	4,63 cd
PA 06	2	4	100	0,54 cde	5,84 a	3	4	100	0,50 cde	5,62 b
PA 09	2	4	100	0,44 def	5,74 ab	2	4	100	0,45 efg	5,60 b
PA 10	3	5	30	0,55 cde	4,26 de	2	4	90	0,50 cde	4,21 de
JI 02	3	4	100	0,35 efg	2,62 fg	3	4	100	0,35 efg	2,86 fg
JI 03	3	5	100	0,55 cde	3,52 ef	3	5	100	0,50 cde	3,45 ef
JI 04	3	6	50	0,35 efg	2,75 gf	2	5	70	0,40 efg	2,80 gf
JI 05	2	5	100	0,60 bc	3,94 de	2	5	100	0,50 cde	4,02 de
JI 07	3	6	100	0,37 efg	3,82 e	3	6	100	0,40 efg	4,05 de

Tabela 4 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VMC) e diâmetro da lesão em cm aos 12 dias após a inoculação (DM) em frutos feridos de pimentão

(conclusão)

1º experimento

2º experimento



Isolado	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
<b>JI 08</b>	3	5	100	0,35 efg	4,14 de	3	5	100	0,40 efg	4,00 de
<b>JI 10</b>	3	4	100	0,45 def	4,02 de	3	4	100	0,40 efg	3,82 de
<b>JI 11</b>	3	5	100	0,35 efg	3,86 e	3	5	100	0,35 efg	3,95 e
<b>JI 12</b>	3	5	100	0,45 def	3,86 e	3	5	100	0,40 efg	4,00 de
<b>JI 13</b>	3	6	100	0,70 ab	4,20 de	3	5	100	0,60 bc	4,10 de
<b>C. acutatum</b>	ni*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>C. gloeosporioides</b>	4	7	40	0,45 efg	3,25 ef	-	-	-	-	-
<b>C. coccodes</b>	5	7	70	0,45 efg	2,75 fg	-	-	-	-	-

Análise estatística realizada com dados não transformados. A comparação entre as médias deve ser realizada na coluna. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey. Coeficiente de variação de 8,5% para VCM e de 2,3% para DM. \* ni = não infectou.

Tabela 5 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VMC) e diâmetro da lesão em cm aos 12 dias após a inoculação (DM) em frutos feridos de pimenta

(continua)

Isolado	1º experimento					2º experimento				
	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
<b>PI 02</b>	5	7	100	0,55 cde	2,75 bc	-	-	-	-	-
<b>PI 03</b>	5	6	100	0,45 de	2,15 de	-	-	-	-	-
<b>PI 04</b>	4	5	100	0,35 def	2,40 ce	-	-	-	-	-
<b>PI 05</b>	4	6	100	0,28 ef	1,75 ef	-	-	-	-	-
<b>PI 06</b>	3	0	10	0,30 def	0,50 h	-	-	-	-	-
<b>PI 07</b>	4	6	100	0,27 ef	1,10 f	5	7	100	0,30 ef	1,20 f
<b>PI 08</b>	4	7	100	0,50 cde	2,30 ce	-	-	-	-	-
<b>PI 10</b>	4	6	100	0,28 ef	1,75 ef	4	6	100	0,35 ef	2,10 de
<b>PI 11</b>	4	6	80	0,70 bc	2,15 de	-	-	-	-	-
<b>PI 12</b>	4	6	100	0,55 cd	2,75 bc	-	-	-	-	-
<b>PI 13</b>	4	5	100	0,85 ab	2,85 a	4	6	100	0,80 ab	2,75 bc
<b>PI 14</b>	10	12	100	0,70 bc	2,50 bc	7	9	100	0,68 bc	2,38 cd
<b>PI 15</b>	8	0	10	0,35 def	2,15 de	7	10	50	0,41 def	2,22 de
<b>PI 16</b>	5	0	100	0,65 cd	1,90 e	-	-	-	-	-
<b>PI 17</b>	7	9	100	0,45 d	1,95 e	-	-	-	-	-
<b>PI 20</b>	6	8	80	0,50 cde	2,30 cd	-	-	-	-	-
<b>PI 30</b>	5	8	60	0,65 c	2,35 cd	4	6	50	0,70 bc	2,43 ce

Tabela 5 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VMC) e diâmetro da lesão em cm aos 12 dias após a inoculação (DM) em frutos feridos de pimenta

(conclusão)

Isolado	1º experimento					2º experimento				
	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
<b>PI 40</b>	7	8	50	0,65 c	2,35 cd	-	-	-	-	-
<b>PI 41</b>	4	5	100	0,45 de	1,92 e	4	6	100	0,52 cde	2,10 de
<b>PI 50</b>	4	5	100	0,55 cde	2,50 bc	4	5	100	0,55 cde	2,35 cd
<b>PI 634</b>	4	6	100	0,26 ef	2,09 d	4	5	100	0,32 def	2,18 de
<b>PI 809</b>	4	5	100	0,28 ef	1,75 ef	4	6	100	0,25 ef	1,70 ef
<b>PI 922</b>	4	5	100	0,65 c	2,45 b	4	6	100	0,70 bc	2,50 bc
<b>PI 2523</b>	3	5	90	0,55 cde	1,24 f	4	6	100	0,57 cde	1,45 ef
<b>PI 2552</b>	3	4	70	0,45 cd	2,33 cd	5	7	90	0,45 cd	2,52 bc
<b>PI 2868</b>	3	4	100	0,55 cde	2,50 bc	4	5	100	0,61 cde	2,71 bc
<b>PA 02</b>	3	4	100	1,05 a	2,45 bc	3	4	100	0,90 ab	2,35 cd
<b>PA 03</b>	4	5	100	1,00 a	2,49 bc	4	5	100	1,10 a	2,60 bc
<b>PA 04</b>	3	4	100	1,00 a	2,80 a	3	5	100	1,06 a	2,75 bc
<b>PA 06</b>	3	7	100	0,45 cd	1,37 f	3	5	100	0,55 cde	2,10 de
<b>PA 09</b>	3	5	100	0,33 def	2,23 d	3	5	100	0,33 def	2,35 cd
<b>PA 10</b>	3	5	100	0,70 bc	1,75 ef	3	5	100	0,81 bc	2,08 de
<b>JI 02</b>	3	7	100	0,65 c	2,88 a	3	6	100	0,60 cde	2,72 bc
<b>JI 03</b>	9	0	10	0,50 cde	1,25 f	5	8	40	0,59 cde	1,47 ef
<b>JI 04</b>	5	8	90	0,40 d	1,95 e	5	7	80	0,52 cde	2,13 de
<b>JI 05</b>	4	5	90	0,45 cd	1,95 e	5	6	90	0,45 cd	2,00 e
<b>JI 07</b>	3	7	100	0,65 c	2,88 a	4	6	90	0,68 c	2,80 a
<b>JI 08</b>	4	5	90	0,75 bc	2,15 de	3	6	90	0,80 ab	2,40 cd
<b>JI 10</b>	ni*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>JI 11</b>	3	6	80	0,70 bc	2,28 cd	3	5	100	0,75 ab	2,48 cd
<b>JI 12</b>	4	6	100	0,35 def	1,00 f	4	6	100	0,42 cd	1,26 f
<b>JI 13</b>	5	7	30	0,45 cd	1,12 f	5	6	50	0,45 cd	1,38 ef
<b>C. acutatum</b>	5	7	50	0,45 cd	1,75 ef	-	-	-	-	-
<b>C. gloeosporioides</b>	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>C. coccodes</b>	7	0	30	0,25 ef	0,60 g	-	-	-	-	-

Análise estatística realizada com dados não transformados. A comparação entre as médias deve ser realizada na coluna. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey. Coeficiente de variação de 9,5% para VCM e de 5,08% para DM.

\* ni = não infectou.

Tabela 6 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VMC) e diâmetro da lesão em cm aos 12 dias após a inoculação (DM) em frutos feridos de jiló

(continua)

Isolado	1º experimento					2º experimento				
	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
PI 02	ni*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 03	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 04	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 05	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 06	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 07	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 08	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 10	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 11	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 12	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 13	9	11	50	0,45 bc	1,18 de	7	10	70	0,50 bc	1,32 d
PI 14	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 15	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 16	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 17	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 20	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 30	8	10	60	0,45 bc	1,30 d	8	9	80	0,50 bc	1,47 c
PI 40	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 41	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 50	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 634	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 809	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 922	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 2523	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 2552	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI 2868	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA 02	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA 03	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA 04	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA 06	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA 09	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA 10	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JI 02	4	6	80	0,42 bc	1,50 cd	3	5	70	0,35 de	1,25 de
JI 03	6	8	90	0,15 e	0,65 f	5	7	80	0,23 e	0,76 f
JI 04	4	5	90	0,40 cd	1,40 c	4	7	80	0,35 de	1,15 de
JI 05	3	4	80	0,45 bc	2,13 bc	3	5	90	0,52 bc	2,13 bc
JI 07	3	4	100	0,60 a	2,67 a	3	5	80	0,70 a	2,58 a

JI 08 6 7 60 0,35 de 1,15 de 5 8 50 0,35 de 2,17 bc

Tabela 6 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VMC) e diâmetro da lesão em cm aos 12 dias após a inoculação (DM) em frutos feridos de jiló

(conclusão)

Isolado	1º experimento					2º experimento				
	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
JI 10	4	5	100	0,45 bc	1,11 e	4	5	100	0,50 bc	1,33 de
JI 11	5	7	60	0,40 cd	1,03 e	4	6	80	0,42 bc	1,22 de
JI 12	4	5	100	0,45 bc	1,50 cd	4	6	100	0,42 bc	1,35 de
JI 13	3	5	100	0,30 d	2,33 b	3	6	90	0,35 de	2,22 b
C. <i>acutatum</i>	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C. <i>gloeosporioides</i>	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C. <i>coccodes</i>	ni	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Análise estatística realizada com dados não transformados. A comparação entre as médias deve ser realizada na coluna. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey. Coeficiente de variação de 4,9% para VCM e de 6,6% para DM.

\* ni = não infectou.

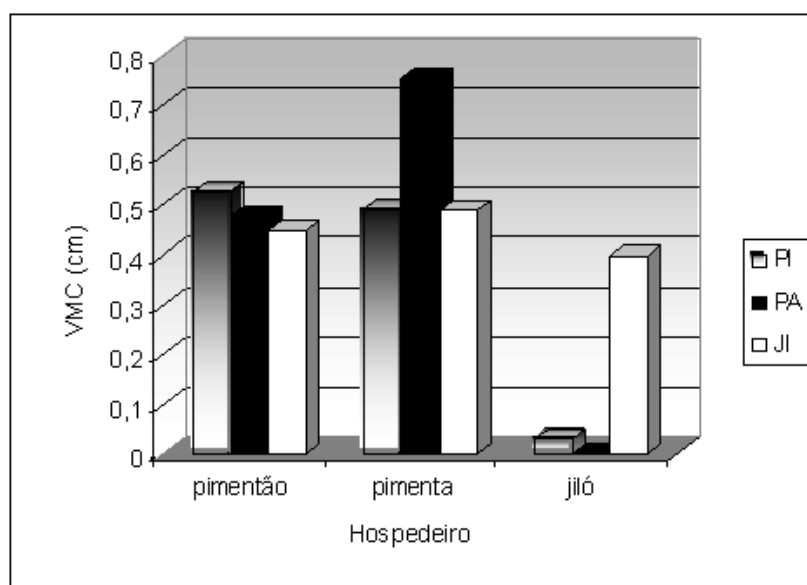


Figura 4 - Velocidade de crescimento médio diário das lesões causadas pelos isolados PI, PA, e JI em pimentão, pimenta e jiló feridos

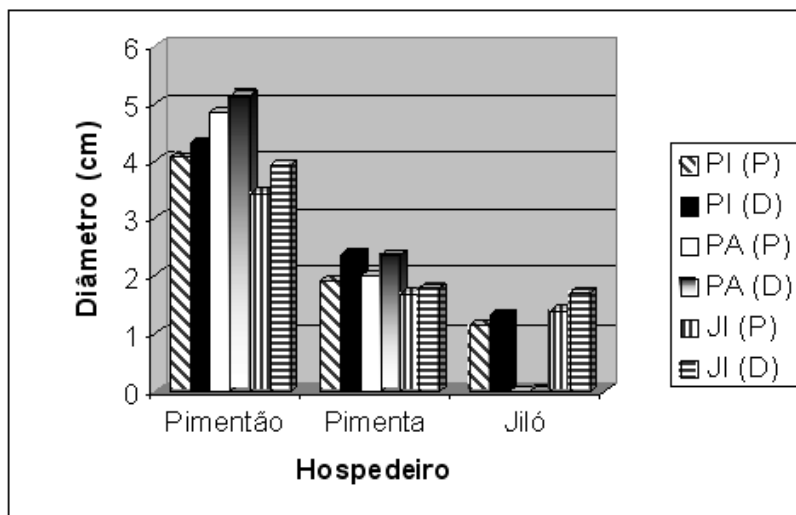


Figura 5 - Diâmetro médio das lesões proximais e distais dos isolados PI, PA e JI em pimentão, pimenta e jiló feridos aos 12 dias após a inoculação

### 2.3.2.2 Frutos sem ferimentos

Os dados sobre as inoculações em frutos não feridos podem ser observados nas tabelas 7, 8 e 9. Apenas os isolados que infectaram os frutos estão apresentados nas tabelas, mas os 42 isolados foram inoculados.

O surgimento de lesões em frutos de pimentão esteve vinculado ao amadurecimento dos frutos; frutos avermelhados ou vermelhos apresentaram lesões enquanto frutos verdes continuaram intactos, ambos inoculados nas mesmas condições (figura 9). Todos os frutos inoculados eram verdes, o amadurecimento ocorria após as inoculações.

Este fato pode ser explicado porque a espessura da cutícula muda durante o processo de amadurecimento e pode interferir diretamente na infecção, além da

interação patógeno-hospedeiro ser controlada por estímulos químicos que variam com a idade fenológica do fruto. O trabalho de Manandhar; Hartman (1995) mostra que a espessura da cutícula foi significativamente correlacionada com a produção de conídios e expansão da lesão em pimentão. Eles explicam que frutos vermelhos de pimentão estimulam quimicamente a formação de apressório, pois frutos maduros exudam mais nutrientes de seus tecidos que frutos verdes. Além disso, Adikaran, et al (1983), citado por Manandhar e Hartman (1995), observaram que apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. capsici* permaneceram quiescentes em frutos verdes e progrediram para lesões típicas apenas quando o fruto ficou vermelho e amadureceu.

Contrários a esses resultados estão Kim; Oh e Yang (1999) que verificaram a ocorrência de lesões apenas em frutos imaturos, já que maduros apresentaram apenas descoloração local. Os autores explicam este fato devido a frutos imaturos terem maior atividade de peroxidases e polifenol-oxidases e menores níveis de compostos fenólicos, aminoácidos e carboidratos que frutos maduros, e estes últimos compostos estão relacionados com hospedeiros resistentes. Outra explicação para o maior desenvolvimento das lesões em frutos imaturos do que maduros é que a camada cerosa presente nos frutos aumenta em espessura conforme a maturação dos mesmos.

A incidência em frutos de pimentão variou de 10 a 100%, sendo que apenas 20 isolados dos 45 testados produziram lesões. O período de incubação foi bastante alto quando comparado aos resultados de frutos feridos, de 8 a 19 dias após a inoculação. Todas as lesões esporularam, seguindo o mesmo padrão dos frutos feridos, de 2 a 3 dias após a incubação. A VCM variou de 0,30 a 0,85 cm/dia, a VCS de 0,20 a 0,90 cm/dia e a VCI de 0,40 a 0,90 cm/dia, muito próxima das velocidades de crescimento dos isolados quando inoculados em frutos feridos. Com o DM ocorreu fato semelhante, variando de 1,00 a 5,18 cm.

Apenas 8 isolados foram capazes de causar doença em frutos de pimenta não feridos. Mesmo assim, a incidência foi bem baixa, variando de 10 a 50%. O período de incubação foi de 8 a 17 dias e todos os isolados esporularam, tendo período de latência poucos dias após o período de incubação. A VCM variou de 0,13 a 0,60 cm/dia, valor bem inferior quando comparado aos dados de frutos feridos. As lesões ocorreram em

maior número na parte inferior dos frutos, sendo que em alguns casos não existiu lesão nas partes superiores.

Apenas 2 isolados, ambos de jiló, foram capazes de causar doença em frutos de jiló não feridos. Além disso, a incidência foi de 10 a 30% com VCM e DM bem inferiores aos resultados dos frutos de jiló feridos.

Tabela 7 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VCM) e diâmetro da lesão em cm aos 22 dias após a inoculação (DM) em frutos não feridos de pimentão

Isolado	1º experimento					2º experimento				
	Pi	PL	i	VCM	DM	Pi	PL	i	VCM	DM
<b>PI 06</b>	14	16	80	0,50 cd	2,31 de	-	-	-	-	-
<b>PI 07</b>	12	15	50	0,66 bc	3,48 cd	12	14	80	0,72 ab	4,17 bc
<b>PI 10</b>	13	15	60	0,55 cd	3,08 de	-	-	-	-	-
<b>PI 14</b>	19	20	10	0,30 e	1,00 f	16	17	40	0,57 bc	3,83 bc
<b>PI 16</b>	19	21	30	0,85 a	2,78 d	-	-	-	-	-
<b>PI 40</b>	8	10	100	0,85 a	3,60 c	-	-	-	-	-
<b>PI 41</b>	8	10	80	0,85 a	4,00 bc	12	14	60	0,57 bc	3,83 bc
<b>PI 634</b>	8	10	50	0,57 bc	3,83 bc	10	12	60	0,85 a	4,73 b
<b>PI 809</b>	11	13	60	0,63 bc	5,13 a	12	14	70	0,30 e	0,60 f
<b>PA 02</b>	14	17	80	0,75 ab	3,72 bc	14	14	80	0,50 cd	2,31 de
<b>PA 03</b>	15	17	20	0,55 cd	1,05 f	16	17	30	0,64 bc	5,18 a
<b>PA 04</b>	14	17	30	0,45 cd	1,50 e	15	16	40	0,85 a	3,60 c
<b>PA 06</b>	8	11	60	0,64 bc	5,18 a	10	12	100	0,45 cd	1,57 e
<b>PA 09</b>	12	15	70	0,72 ab	4,17 bc	11	13	100	0,85 a	2,58 def
<b>PA 10</b>	14	17	60	0,85 a	4,73 b	15	16	80	0,72 ab	4,17 bc
<b>JI 03</b>	18	20	40	0,40 de	1,70 e	16	17	30	0,63 bc	5,13 a
<b>JI 05</b>	15	17	20	0,30 e	0,60 f	15	17	40	0,85 a	2,78 d
<b>JI 07</b>	15	17	30	0,45 cd	1,57 e	16	18	50	0,66 bc	3,48 cd
<b>JI 11</b>	15	17	20	0,65 bc	3,10 de	14	16	60	0,55 cd	3,08 de
<b>JI 13</b>	11	13	70	0,85 a	2,58 def	13	15	40	0,72 ab	4,17 bc

Análise estatística realizada com dados não transformados. A comparação entre as médias deve ser realizada na coluna. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey. Coeficiente de variação de 6,1% para VCM e de 3,3% para DM.



Tabela 8 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VMC) e diâmetro da lesão em cm aos 22 dias após a inoculação (DM) em frutos não feridos de pimenta

Isolado	1º experimento					2º experimento				
	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
<b>PI 07</b>	11	13	10	0,18 d	0,50 d	10	12	20	0,18 d	0,41 d
<b>PI 10</b>	8	10	30	0,30 c	1,20 b	-	-	-	-	-
<b>PI 634</b>	11	13	10	0,13 d	0,40 d	11	13	30	0,17 d	0,34 d
<b>PI 809</b>	11	13	40	0,33 c	0,93 c	12	15	40	0,56 b	2,76 a
<b>PA 03</b>	14	17	20	0,60 ab	2,50 ab	15	17	10	0,55 b	2,82 a
<b>PA 06</b>	17	19	50	0,55 b	2,71 a	15	18	30	0,32 c	0,91 c
<b>PA 09</b>	17	19	10	0,13 d	0,40 d	16	18	20	0,23 cd	1,50 b
<b>JI 13</b>	17	20	10	0,23 cd	1,50 b	14	17	50	0,19 d	0,51 d

Análise estatística realizada com dados não transformados. A comparação entre as médias deve ser realizada na coluna. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey. Coeficiente de variação de 7,5% para VCM e de 4,3% para DM.

Tabela 9 - Período de incubação (Pi), latência (PL), incidência (i), velocidade média de crescimento por dia em cm (VMC) e diâmetro da lesão em cm aos 22 dias após a inoculação (DM) em frutos não feridos de jiló

Isolado	Pi	PL	i	VMC	DM	Pi	PL	i	VMC	DM
<b>JI 07</b>	12	15	30	0,26 a	1,60 a	13	15	40	0,30 a	1,75 a
<b>JI 13</b>	15	18	10	0,05 b	0,40 b	13	17	30	0,10 b	0,62 b

Análise estatística realizada com dados não transformados. A comparação entre as médias deve ser realizada na coluna. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % pelo Teste de Tukey. Coeficiente de variação de 2,7% para VCM e de 1,4% para DM.



Figura 6 - Frutos de jiló feridos inoculados com os isolados PI 07 (fruto da esquerda, sem lesão) e PI 13 (fruto da direita, com lesão), aos 12 dias após a inoculação

Figura 7 - Frutos de pimenta feridos inoculados com os isolados PA 09 (fruto da esquerda) e JI 07 (fruto da direita) aos 10 dias após a inoculação. Notar a diferença na coloração da massa de conídios



Figura 8 - Frutos de pimentão feridos inoculados com os isolados PI 809 (fruto da esquerda) e JI 05 (fruto da direita) aos 10 dias após a inoculação

Figura 9 - Frutos de pimentão não feridos inoculados com o isolado PI 2552 aos 12 dias após a inoculação. Fruto verde apresenta-se intacto

### 2.3.3 Identificação molecular - “primer” específico

As figuras de 10 a 19 apresentam os resultados dos PCR utilizando os “primers” específicos para espécies.

Dos 42 isolados submetidos a PCR, 27 foram positivos para *C. acutatum* e 2 positivos para *C. gloeosporioides*. Os 2 identificados como *C. gloeosporioides* foram provenientes de pimentão, PI 13 e PI 30 (figura 16) enquanto dos 27 identificados como *C. acutatum*, 14 foram provenientes de pimentão PI 06, PI 07, PI 10, PI 14, PI 15, PI 16, PI 17, PI 40, PI 41, PI 634, PI 809, PI 922, PI 2523 e PI 2552 (figuras 10, 11 e 12),

6 de pimenta PA 02, PA 03, PA 04, PA 06, PA 09 e PA 10 (figura 13) e 7 de jiló JI 02, JI 05, JI 07, JI 10, JI 11, JI 12 e JI 13 (figuras 13 e 14).

Nenhum dos isolados foi identificado como *C. coccodes* ou *C. capsici*.

Este é o primeiro relato de *C. acutatum* no Brasil causando antracnose em pimentões, pimentas e jilós. Nos Estados Unidos, Ivey; Nava-Diaz e Miller (2004) também identificaram *C. acutatum* em pimentões verdes recentemente. Esta espécie tem causado perdas de até 100% no campo, perdas muito superiores aquelas causadas por *C. gloeosporioides* e *C. coccodes* por eles constatados. Também neste caso foi utilizado o “primer” CaINT2 e características morfológicas para a identificação da espécie.

Alguns isolados, 11 provenientes de frutos de pimentão e 3 provenientes de frutos de jiló não foram identificados pelos “primers” específicos das 4 espécies utilizados. Acreditamos que este fato pode ter ocorrido por uma das razões seguintes:

- os isolados são de uma espécie que não foi contemplada pelos “primers”;
- os “primers” utilizados não são universais para as espécies quais representam, já que estes foram testados para poucos isolados europeus;
- que sejam de uma espécie testada, como *C. acutatum*, mas que essa espécie apresente variantes ou subgrupos, como no caso dos trabalhos de Föster e Adaskaveg (1999), Freeman, et al (2001) e Denoyes-Rothan, et al (2003).

Trabalhos futuros de caracterização de *Colletotrichum* em solanáceas devem contemplar o uso de técnicas de seqüenciamento de DNA ribossomal da região ITS e do gene da  $\beta$  – tubulina para minimizar as interpretações da identificação de espécies.



Figura 10 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, Padrão 1, PI 02, PI 03, PI 04, PI 05, PI 06, PI 07, PI 08 e PI 10



Figura 11- Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, PI 11, PI 12, PI 13, PI 14, PI 15, PI 16, PI 17, PI 20 e PI 30



Figura 12 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, PI 40, PI 41, PI 50, PI 634, PI 809, PI 922, PI 2523, PI 2552 e PI 2868

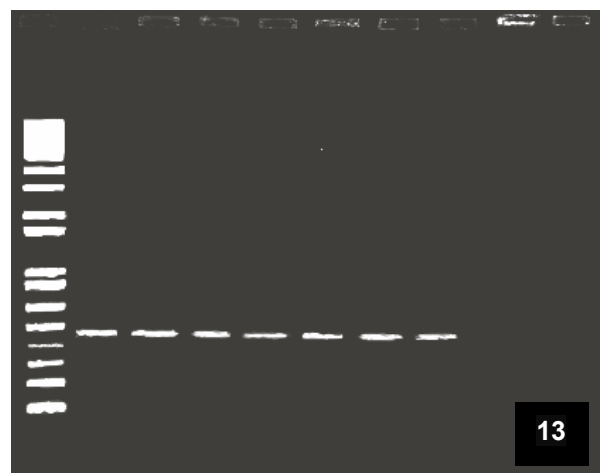


Figura 13 - Produtos de PCR utilizando o “primer” Calnt2: Marcador 1kb Ladder Plus, PA 02, PA 03, PA 04, PA 06, PA 09, PA 10, JI 02, JI 03 e JI 04

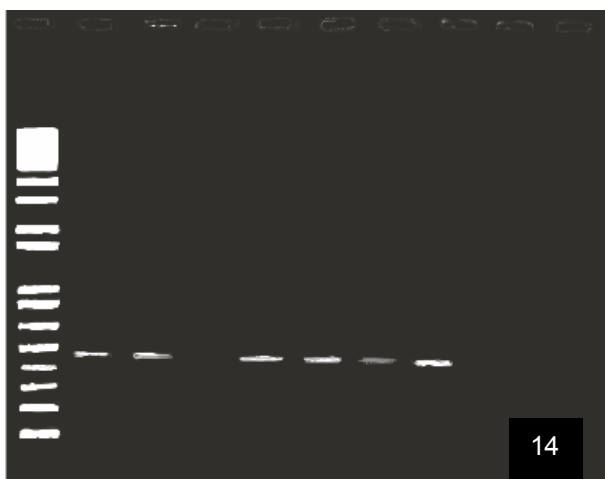


Figura 14 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CalInt2: Marcador 1kb Ladder Plus, JI 05, JI 07, JI 08, JI 10, JI 11, JI 12, JI 13, Padrão 2 e Padrão 3



Figura 15 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus, Padrão 2, PI 02, PI 03, PI 04, PI 05, PI 06, PI 07, PI 08 e PI 10



Figura 16 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus, PI 11, PI 12, PI 13, PI 14, PI 15, PI 16, PI 17, PI 20 e PI 30

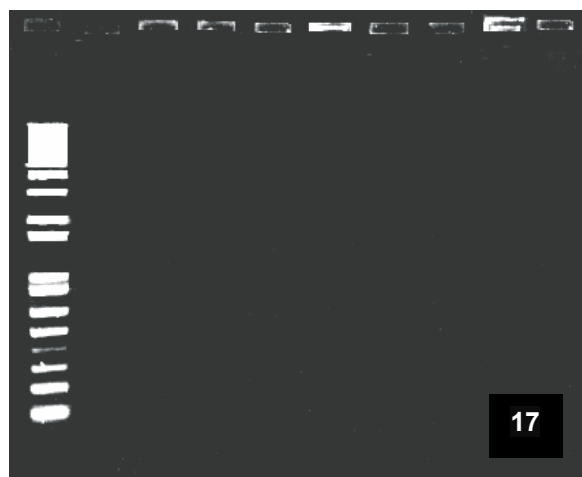


Figura 17 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus, PI 40, PI 41, PI 50, PI 634, PI 809, PI 922, PI 2523, PI 2552 e PI 2868



Figura 18 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus, PA 02, PA 03, PA 04, PA 06, PA 09, PA 10, JI 02, JI 03 e JI 04

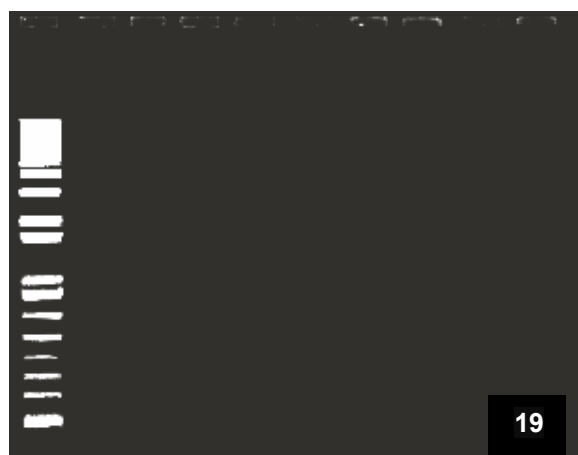


Figura 19 - Produtos de PCR utilizando o “primer” CgInt: Marcador 1kb Ladder Plus, JI 05, JI 07, JI 08, JI 10, JI 11, JI 12, JI 13, Padrão 1 e Padrão 3

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos a partir deste trabalho permitiram concluir que há, pelo menos, duas espécies do gênero *Colletotrichum*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* que causam antracnose em hortaliças solanáceas no Brasil.

Apenas os isolados provenientes de frutos de pimentão identificados como *C. gloeosporioides* foram capazes de infectar frutos de jiló. Assim frutos de jiló se revelaram bons hospedeiros para diferenciar as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* provenientes de hortaliças solanáceas.

A espécie *C. gloeosporioides* foi bem caracterizada, pois todos os parâmetros avaliados, morfologia, patogenicidade e identificação molecular foram coesos. Já os isolados identificados molecularmente como *C. acutatum* nem sempre apresentaram morfologia típica desta espécie, ou seja, com conídios fusiformes e de ápices afilados. Cerca de 51% dos isolados identificados molecularmente como *C. acutatum* foram caracterizados morfologicamente como *C. gloeosporioides*, por possuírem conídios retos e com ápices arredondados. Como representantes típicos deste último grupo temos todos os isolados provenientes de frutos de pimenta.

Cerca de 26% dos isolados que não puderam ser identificados molecularmente. Estes, provavelmente não são representantes da espécie *C. gloeosporioides*, uma vez que não causaram infecções em frutos de jiló. Eles podem ser de uma espécie não contemplada pelos “primers” das quatro espécies testadas ou ainda pertencer a um subgrupo de *C. acutatum* não identificado pelo “primer” específico para esta espécie. Já é fato conhecido que existem subgrupos dentro da espécie *C. acutatum*, com algumas variações na morfologia e patogenicidade entre eles, fato que dificulta a correta identificação por meio de PCR específico.

Os isolados provenientes de frutos de pimenta e jiló foram grupos mais homogêneos morfologicamente do que isolados provenientes de frutos de pimentão. A maioria dos isolados provenientes de frutos de jiló foi identificada e caracterizada como representantes da espécie *C. acutatum* e foi capaz de causar antracnose, tanto em jiló como em pimentão e pimenta. Por outro lado, os isolados de *C. acutatum* provenientes



de pimentão e pimenta, caracterizados morfológicamente e identificados molecularmente como desta espécie, como por exemplo, PI 07, PI 15, PI 634, PI 809 e PI 2552, não foram capazes de infectar frutos de jiló, mas infectaram frutos de pimentão e pimenta. Dessa forma, *C. acutatum* proveniente de frutos de pimentão e pimenta, parecem constituir *forma specialis* desta espécie para o gênero *Capsicum*.

Ficou evidente neste trabalho que as técnicas utilizadas isoladamente não permitiram identificar corretamente todos os isolados testados, ora porque não houve amplificação nas reações de PCR específico, ora porque houve conflito entre as identificações moleculares e morfológicas. Dessa forma, estudos futuros de identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose nas hortaliças solanáceas devem contemplar o uso de outras técnicas moleculares, como o seqüenciamento do DNA ribossomal, em especial das regiões ITS e do gene da  $\beta$  – tubulina, por fornecerem melhores informações a respeito da identificação das espécies.

## REFERÊNCIAS

ABANG, M.M.; WINTER, S.; GREEN, K.R.; HOFFMANN, P.; MIGNOUNA, H.D.; WOLF, G.A. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. **Plant Pathology**, Bangor, v. 51, p.63-71, 2001.

ADASKAVEG, J.E.; FÖSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host pathogen interaction. St Paul: The American Phytopathological Society, 2000 chap. 19, p. 317-335.

ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n.9, p. 979-987, 1997.

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 570-587, 2003.

AHN, I.P.; UHM, K.H.; KIM, S.; LEE, Y.H. Signaling pathways involved in preinfection development of *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. coccodes* and *C. dematium* pathogenic on red pepper. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63., n.5, p.281-289, 2003.

ALAHAKOON, P.W.; BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S. Genetic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates obtained from mango. **International Journal Pest Management**, Oxfordshire, v. 40, n. 2, p.225-229, 1994.

ALEXOPOULOS, C.J., MINS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. th. New York: John Wiley. 1996. 868p.

ALZATE-MARIN, A.L.; NIETSCHKE, S.; COSTA, M.R.; SOUZA, K.A.; SARTORATO, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Análises de DNA de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* visando identificação de patótipos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n.2, p. 197-202, 2001.

ASIA VEGETABLE RESERCH AND DESENVELPMENT CENTER - **AVRDC report 2003**. Shanhua: AVRDC—The World Vegetable Center, 2004, 194 p.

ASSIS, T.C.; MENEZES, M.; ANDRADE, D.E.G.T.; COELHO, R S.B.; OLIVEIRA, S.M. A. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n.2, p. 208-212, 2001.

BARNET, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustred genera of imperfect fungi**. 3 th. Minneapolis: Burgess Publishing, 1972. 241p.

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

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n.5, p.523-527, 1996.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JR., H.J.; RAGO, A.M., MASSOLA JR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes substratos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.34, 2005.

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

CARVALHO, F.M.S.; LEITE JÚNIOR., R.P.; UENO, B. Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.1, p. 72-78, 2000.

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

CULLEN, D. W.; LEES, A. K.; TOTH, I. K.; DUNCAN, J. M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, Bangor, v. 51, p. 281-292, 2001.

CURRY, K.J.; ABRIL, M.; AVANT J.B.; SMITH, B.J. Strawberry anthracnose: histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n.10, p.1055-1063, 2002.

DENOYES-ROTHAN, B; GUÉRIN, G.; DÉLYE, C.; SMITH, B.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n.2, p.219-228, 2003.

DILLARD, H. R. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford, CAB International, 1992. chap. 11. p.225 – 237.

DYKO, B.J.; MORDUE, J.E.M. *Colletotrichum acutatum*. **CMI** Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute, UK, 1979.

FERNANDES, M.C.A.; RIBEIRO, R.L.D.; ESCHER, M.M. Caracterização patogênica e eletroforética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de *Capsicum annum*, *Solanum melongena* e *Solanum gilo*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p.370, 1995.

FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, R. L. D. Sensibilidade ao fungicida benomyl in vitro de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n.2, p.89-95, 2001.

FÖSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n.11, p.1056-1065, 1999.

FREEMAN, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN. **Colletotrichum: host specificity, pathology and host pathogen interaction**. St Paul: The American Phytopathological Society, 2000 chap. 9, p. 131-145.

FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 6, p.395-404, 1996.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 1014-1020, 1996.

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

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 6, p.608-614, 2000.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; MAYMON, M.; ZVEIBIL, A. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 6, p.586-592, 2001.

FURTADO, E.L.; BACH, E.E; KIMATI, H.; MENTEN, J.O.M.; SILVEIRA, J.A. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum*

*gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.25, n.3, p.222-228, 1999.

GNIFFKE, P. **Host resistance to pepper anthracnose**. Disponível em: <http://www.avrdc.org/pdf/3anthracnose.pdf>. Acesso em: 16 maio 2005.

GÓES, A.; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados a queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.23, n.1, p. 4-10, 1997.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B. Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing Glomerella leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p. 1335-1340, p.2004.

GUNNELL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, New York, v.84, p.157-156, 1992.

HADEN, J.F.; BLACK, L.L. Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. In: International Symposium On Integrated Management Practices: Tomato and Pepper Production in the Tropics, Tainan: AVRDC, 1989.

IVEY, M.L.L.; NAVA-DIAZ, C.; MILLER, S. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n.11, p.1198-1204, 2004.

JAYASINGHE, C.K.; FERNANDO, T.H.P.S. Re-identificação and characterization of pathogens causing uguirassa (*Flacourtia inermis*) fruit anthracnose. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 157, n.1, p. 81-85, 2004.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 39, p. 343-366, 1990.

KIM, K.D.; OH, B.J.; YANG, J. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. **Phytoparasitica**, Revohot, v.27, n.2, p. 1-10, 1999.

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

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.;

BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, p.592-593.

LARDNER, R.; JOHNSTON, P.R.; PLUMMER, K.M.; PEARSON, M.N. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Mycological research**, New York, v. 103, n.3, p.275-285, 1999.

LEE, T.H.; CHUNG, H.S. Detection and transmission of seed borne *Colletotrichum gloeosporioides* in red pepper, *Capsicum annuum*. **Seed Science and Technology**, Bassersdorf, v. 23, n.2, p.533-541, 1995.

LIMA, 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, 2003.

LIN, Q.; KANCHANA-UDOMKARN, C.; JAUNET, T.; MONGKOLPORN, O. Genetic analysis of resistance to pepper anthracnose caused by *Colletotrichum capsici*. **Thailand Journal Agricultural Science**, Bangkok, v. 35, p. 259-264, 2002.

MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L.; WANG, T.C. Semiselective medium for *Colletotrichum gloeosporioides* and occurrence of tree *Colletotrichum* spp. on pepper plants. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n.4, p.376-379, 1995.

MARTÍN, M.P.; GARCÍA-FIGUERES, F. *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. **European Journal of Plant Pathology**, Dublin, v. 105, p.733-741, 1999.

MARTINS, V.G.; BACCI JR., M. **Métodos moleculares para estudo do DNA: extração e amplificação de DNA I**. Rio Claro: UNESP Centro de Estudos de Insetos Sociais/UNESP, 2000.

McGOVERN, R.J.; POLSTON, J.E. First report of fruit rot of *Capsicum chinense* caused by two *Colletotrichum* species. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n.2, p.212-212, 1995.

MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização patogênica, isoenzimática e sensibilidade a benomyl de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de hortaliças solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.1, p.73-73, 2003.

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

MILLS, P.R.; HODSON, A.; BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J.

**Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford, CAB International, 1992. chap. 14. p.269 – 1288.

MORDUE, J.E.M. *Colletotrichum gloeosporioides*. **CMI** Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute, UK, 1971.

NIRENBERG, H.I.; FEILER, U.; HAGEDORN, G. Description of *Colletotrichum lupini* comb. Nov. in modern terms. **Mycologia**, v. 94, p.307-320, 2002.

OH, B.J.; KIM, K.D.; KIM, Y.S. Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology - Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 147, n.9, p.547-552, 1999.

OLIVEIRA, R.R.; VIDA, J.B.; AGUIAR, B.M.; SEVERINO, J.J.; ITAKO, A.T.; UEDA, M. Efeito do meio de cultura nas características morfológicas de conídios de *Corynespora cassicola*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, p.90 – 91, 2005.

PARK, H.K.; KIM, B.S.; LEE, W.S. Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in pepper (*Capsicum annuum* L.) II. Genetic analysis of resistance to *Colletotrichum dematium*. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Korea, v.31, n.3, p.207-212, 1990.

PEREIRA, R. M. F. V. **Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de *Colletotrichum gloeosporioides* “sensu” Arx, isolados de pimentão (*Capsicum annuum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Raddi) e seu controle químico**. 1995. 151p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1995.

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

PERES, N.A.; SOUZA, N.L.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, St Paul, v.88, n.2, p. 125 – 130, 2004.

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

PHOTITA, W.; TAYLOR, P.W.J.; FORD, R.; HYDE, K.D.; LUMYONG, S. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 18, n.1, p.117-133, 2005.

ROBERT, R.G.; SNOW, J.P. Morphological and pathological studies of *Colletotrichum capsici* and *C. indicum*. **Mycologia**, Lancaster, v.82, p. 82-90, 1990.

ROY, K.W.; KILLEBREW, J.F.; RATNAYAKE, S. First report of *Colletotrichum capsici* on bell pepper in Mississippi. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n.6, p.693-693, 1997.

SANDERS, G. M.; KORSTEN, L. A comparative morphological study of the South Africa avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Canadian Journal Botanical**, Ontario, v. 81, p. 877-885. 2003a.

SANDERS, G.M.; KORSTEN, L. A. Comparison of cross inoculation potencial of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, Jerra, v. 158, n.2, p.143-150, 2003b.

SIMMONDS, J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Journal of Agriculture and Animal Science**, v.22, p.437-459, 1965.

SINGH, H.P.; KAUR, S.; SINGH, J. Determination of infection in fruit rot (*Colletotrichum capsici*) of chili (*Capsicum annum*). **Indian Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v. 63, n.5, p.310-312, 1993.

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

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 45, p.650-655, 1995.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980, England, 236p

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



SWART, G.M. **Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango**. 1999. Tesis (Doctor in Science) – Faculty of Biological and Agricultural Sciences, Universidade de Pretoria, South África, 1999. 193p.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n.9, p.986-996, 2002.

TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A. Caracterização cultural e morfo-fisiológica de isolados de *Colletotrichum* causadores de antracnose do morangueiro em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.24, n.2, p.145-151, 1998.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; BUENO, C.R.N.C.; 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, 2004.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; BUENO, C.R.N.C.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. *Colletotrichum acutatum* como agente causal de antracnoses em hortaliças solanáceas. **Resúmenes**: Córdoba, Sociedade Argentina, 2005, p.468.

TSROR, L.; JOHNSON, D.A. *Colletotrichum coccodes* on potato. In: PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN. **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host pathogen interaction. St Paul: The American Phytopathological Society, 2000 chap. 22, p. 363 – 373, cap. 22.

UREÑA – PADILLA, A.R.; MACKENZIE, S.J.; BOWEN, B.W.; LEGARD, D.E. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 11, p. 1245 – 1252, 2002.

Van de AA, H.A.; NOORDELOOS, M.E.; GRUYTER, J. Species concept in some larger genera of the Coelomycetes. **Studies in Mycology**, v.32, p.3-19, 1990.

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

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science ad Technology** Disponível em: <http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn>. Acesso em: 21 out. 2004.

Von, ARX, J.A. Die arten der gattung *Colletotrichum* cda. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlim, v. 29, p. 413-468.

WALLER, J.M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum***: biology, pathology and control. Wallingford, CAB International, 1992. chap. 8 p.167 – 185.

WALKER, J.; NIKANDROWN, A.; MILLAR, G.D. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* with comments on some taxonomic and problems in *Colletotrichum*. **Mycological Research**, v. 95, 1175-1193.

YANG, H.A.; SWEETINGHAN, M.W. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates with lupine anthracnose. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 49, p. 1213-1223, 1998.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)