

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

**Caracterização e identificação molecular de espécies de
Colletotrichum associadas à antracnose da goiaba
no Estado de São Paulo**

Wagner Vicente Pereira

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

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Wagner Vicente Pereira
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum*
associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

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

Piracicaba
2009

À Deus pela presença em todos os momentos da minha vida.

À minha Mãe Rute, ao meu Pai José, por dedicarem parte de suas vidas, na minha formação pessoal e profissional, pelo amor a mim dedicado e por me proporcionarem paz na alma e felicidade na vida.

As minhas irmãs, Eliane e Ivone, por todo o amor e disponibilidade em ajudar.

Dedico.

Você vê as coisas e diz:

“Por quê?”

Mas eu sonho com as coisas que nunca existiram e digo:

“Por que não?”

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior por sua orientação, amizade e ensinamentos;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos amigos do Laboratório de Micologia: Gustavo Ogasawara, Juliana Ramiro, Maria Eugenia, Nara Carvalho, Paula Panosso, Roberto Chapola, Sylvia Raquel, pela amizade e pelos bons momentos de descontração;

Aos amigos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos e Virologia pela ajuda nos trabalhos e pela agradável convivência;

Ao amigo Hugo Tozze pelo grande apoio e sugestões na realização dos experimentos;

Ao Ivan Fisher pela colaboração e fornecimento dos isolados utilizados nos experimentos;

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pelos ensinamentos e colaborações.

Ao secretário Jeferson Brajão pela amizade e disposição para resolver assuntos burocráticos.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia;

Aos meus familiares: avós, tios e tias, primos e primas por sempre me incentivarem a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus pais pelo amor incondicional, orações, confiança, apoio e exemplo de vida a seguir;

A Prof^a. Dr^a. Marli Papa da FEIS-UNESP pela valiosa participação na iniciação da minha vida acadêmica e científica e pelos constantes conselhos a mim fornecidos;

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

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão bibliográfica.....	21
2.1.1 Goiabeira: uma visão geral da cultura.....	21
2.1.2 Gênero <i>Colletotrichum</i>	23
2.1.2.1 Identificação de espécies de <i>Colletotrichum</i>	26
2.1.3 Antracnose.....	29
2.2 Material e métodos.....	31
2.2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados.....	31
2.2.2 Caracterização cultural.....	32
2.2.2.1 Avaliação.....	34
2.2.2.2 Análise dos dados.....	35
2.2.3 Caracterização morfológica.....	36
2.2.3.1 Avaliação.....	36
2.2.3.2 Análise dos dados.....	37
2.2.4 Identificação molecular.....	37
2.2.4.1 Extração de DNA.....	37
2.2.4.2 Reação de PCR.....	38
2.2.5 Atividade enzimática <i>in vitro</i>	38
2.2.5.1 Atividade amilolítica <i>in vitro</i>	39
2.2.5.2 Atividade lipolítica <i>in vitro</i>	39
2.2.5.3 Atividade celulolítica <i>in vitro</i>	40
2.2.5.4 Atividade proteolítica <i>in vitro</i>	40
2.2.5.5 Atividade pectinolítica <i>in vitro</i>	40
2.2.5.6 Análise dos dados.....	41
2.2.6 Caracterização patogênica.....	41

2.2.6.1 Seleção e desinfestação dos frutos.....	41
2.2.6.2 Preparo das suspensões.....	42
2.2.6.3 Inoculação.....	42
2.2.6.4 Avaliação.....	42
2.2.6.5 Análise dos dados.....	43
2.3 Resultados e discussão.....	43
2.3.1 Caracterização cultural.....	43
2.3.2 Caracterização morfológica.....	49
2.3.3 Identificação molecular.....	54
2.3.4 Caracterização patogênica.....	58
2.3.5 Caracterização enzimática.....	61
3 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	71

RESUMO

Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo

A antracnose é uma das principais doenças que afetam a goiaba no Estado de São Paulo. Tanto *Colletotrichum gloeosporioides* quanto *Colletotrichum acutatum*, são relatados como sendo os agentes causais da doença. Os objetivos do trabalho foram caracterizar e identificar 54 isolados de *Colletotrichum* oriundos de lesões de goiaba, baseados nos aspectos culturais, morfológicos, moleculares e enzimáticos, além da caracterização patogênica de isolados representativos de cada espécie de *Colletotrichum* identificadas. A caracterização cultural foi avaliada mediante a mensuração do crescimento micelial dos isolados a 25 °C, além dos aspectos culturais, como a coloração e a topografia das colônias. Na caracterização morfológica foram mensurados comprimento e largura de conídios, bem como avaliados os seus formatos. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados na caracterização molecular, visando identificar as espécies dos isolados de *Colletotrichum*. A caracterização enzimática envolveu a mensuração, *in vitro*, do halo de degradação dos substratos da amilase, proteinase, celulase, pectinase e lipase. Por fim, alguns isolados representativos e identificados foram utilizados na caracterização patogênica, sendo avaliados os períodos de latência e incubação, a área lesionadas dos frutos e a esporulação. Baseados na coloração das colônias, os isolados foram reunidos em 9 grupos diferentes. Os mesmos puderam se reunidos em dois grupos distintos de acordo com a taxa do crescimento micelial. Os conídios apresentaram os formatos: (i) reto, fusiforme, com ápices afilados, (ii) reto, oblongo, com ápices arredondados, (iii) reto, clavado, afilado em uma extremidade e (iv) reto, com constrição. As dimensões variaram de 11,4 a 16,8 µm de comprimento por 2,6 a 4,9 µm de largura. O uso de oligonucleotídeos específicos permitiu identificar *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* entre os isolados avaliados. Grande parte dos isolados, 94%, foram identificados como pertencendo à espécie *C. gloeosporioides*, enquanto que apenas 4% foram identificados como *C. acutatum*. Em relação à caracterização enzimática, apenas a atividade celulolítica proporcionou diferenças significativas entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. A patogenicidade dos isolados avaliados mostrou alta variabilidade na severidade da doença nos frutos, contudo não foi possível evidenciar diferenças significativas que distinguíssem *C. acutatum* de *C. gloeosporioides*. Os períodos de incubação e latência foram menores para os isolados de *C. acutatum* em relação aos isolados de *C. gloeosporioides*. *C. acutatum* produziu quantidade superior de esporos nos frutos inoculados quando comparados a *C. gloeosporioides*. Observou-se, ainda, correlação positiva entre a área do halo de degradação de pectina, lipídio e amido e a área lesionada dos frutos afetados pelos isolados avaliados.

Palavras-chave: *Colletotrichum acutatum*; *Colletotrichum gloeosporioides*, *Psidium guajava*, Antracnose

ABSTRACT

Characterization and molecular identification of *Colletotrichum* species associated with guava anthracnose in São Paulo State

Anthracnose is one of the major diseases affecting guava in the State of São Paulo. Both *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* are reported as the causal agents of the disease. The objectives of this work were to characterize and to identify 54 *Colletotrichum* isolates from guava, based on cultural, morphological, molecular, enzymatic, and pathogenic aspects. Cultural characterization was achieved by measuring the mycelial growth at 25 ° C, as well as reporting cultural aspects, such as color and topography of the colonies. In the morphological characterization it was measured length and width of conidia, and rated their shapes. CaInt2 and CgInt specific primers were used in the molecular identification of the *Colletotrichum* isolates. The enzymatic characterization was performed by measuring, *in vitro* degradation of starch, protein, cellulose, pectin and lipid. Finally some representative and identified isolates were used in the pathogenic characterization, evaluated by latency and incubation periods, diseased area and sporulation. Based on the color of the colonies, the isolates were grouped in 9 different groups. These same isolates showed two distinct growth patterns according to the mycelial growth rates. Conidia showed shapes: (i) straight, fusiform, with acute ends, (ii) straight, oblong, with round ends, (iii) straight, clavate, tapered at one end and (iv) straight, with a constriction in the middle. Conidia size ranged from 11.4 to 16.8 µm in length by 2.6 to 4.9 µm in width. The use of specific primers identified *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* among the isolates. Most of the isolates (94%) were identified as *C. gloeosporioides*, while only (6%) were identified as *C. acutatum*. In the enzymatic characterization, only cellulolytic activity revealed significant differences between *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*. Pathogenicity of the isolates was highly variable, but could not help to distinguish between *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*. The incubation and latency periods were shorter for *C. acutatum* in relation to *C. gloeosporioides*. *C. acutatum* produced higher amounts of spores on inoculated fruits compared to *C. gloeosporioides*. There was also a positive correlation between *in vitro* degradation of pectin, lipid and starch, and the diseased area for tested isolates.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Psidium guajava*; Anthracnose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição dos isolados coletados para condução dos experimentos.....	35
Figura 2-	Aspectos das colônias de <i>Colletotrichum</i> em meio BDA, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Isolados padrões dos grupos: A, B, C, D, E, F, G, H e I.....	45
Figura 3-	Fragmentos amplificados pela PCR utilizando os oligonucleotídeos CaInt2 e ITS4 (<i>C. acutatum</i>), observados em gel de agarose 1%. Amostras: M (marcador molecular 1 kb), Col 35 (isolado padrão de <i>C. acutatum</i>), Col 48 (isolado padrão de <i>C. gloeosporioides</i>), 1 (isolado MIR 1), 2 (isolado MIR 3), 3 (isolado CAFE 3), 4 (isolado AND 1), 5 (isolado CAM 1), 6 (isolado IT 2), 7 (isolado BR 4), 8 (isolado PR 1), 9 (isolado CR 3).....	57
Figura 4-	Fragmentos amplificados pela PCR utilizando os oligonucleotídeos CgInt e ITS4 (<i>C. acutatum</i>), observados em gel de agarose 1%. Amostras: M (marcador molecular 1 kb), CA (isolado padrão de <i>C. acutatum</i>), CG (isolado padrão de <i>C. gloeosporioides</i>), 1 (isolado MIR 1), 2 (isolado MIR 3), 3 (isolado CAFE 3), 4 (isolado AND 1), 5 (isolado CAM 1), 6 (isolado IT 2), 7 (isolado BR 4), 8 (isolado PR 1), 9 (isolado CR 3).....	57
Figura 5-	Lesões promovidas por diferentes espécies de <i>Colletotrichum</i> em goiabas, após 14 dias da inoculação: <i>C. acutatum</i> - MIR 1 (A) e MIR 3 (B), <i>C. gloeosporioides</i> - JAU 1 (C) e BR 4 (D).....	61

Figura 6-	Agrupamento dos isolados de <i>Colletotrichum</i> em função da severidade da doença em frutos de goiabeira.....	61
Figura 7-	Relação entre a atividade enzimática de <i>Colletotrichum</i> , estimada pela área do halo de degradação dos substratos das enzimas (cm ²), e a severidade da doença em goiabas (cm ²).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Identificação do isolado, local de origem, órgão de isolamento e ano de coleta dos 54 isolados de <i>Colletotrichum</i> provenientes de goiaba.....	33
Tabela 2-	Diversidade dos aspectos culturais dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. de goiaba, observados em meio BDA, aos 7 dias.....	45
Tabela 3-	Taxa de Crescimento Micelial (TCM), grupo de coloração e topografia da colônia de isolados de <i>Colletotrichum</i> oriundos de goiaba	47
Tabela 4-	Comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência do formato de conídios produzidos por isolados de <i>Colletotrichum</i> oriundos de goiaba.....	52
Tabela 5-	Identificação das espécies de <i>Colletotrichum</i> com oligonucleotídeos específicos.....	56
Tabela 6-	Área média da lesão (cm ²), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos x 10 ⁶)/cm ² da lesão].....	60
Tabela 7-	Atividade aminolítica, pectinolítica, lipolítica, proteolítica e celulolítica dos isolados de <i>Colletotrichum</i> , expressa pelo halo da degradação dos substratos.....	65

1 INTRODUÇÃO

A cultura da goiabeira (*Psidium guajava* L.) é importante no contexto da fruticultura brasileira e encontra-se em crescente expansão. Em 2007 o Brasil produziu aproximadamente 316 mil toneladas, sendo os estados de São Paulo e Pernambuco os principais produtores (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009).

No estado de São Paulo, a produção destina-se tanto para consumo *in natura* quanto para industrialização. A maior parcela dos frutos produzidos é destinada à industrialização, entretanto, um crescimento significativo tem sido observado no mercado de frutas *in natura* (DURIGAN, 1997).

Dentre as várias doenças que afetam a cultura, a antracnose é uma das mais importantes. Durante muito tempo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. foi considerado o único agente causal da doença (PICCININ et al., 2005; JUNQUEIRA; COSTA., 2002). Mais recentemente, no entanto, Peres et al. (2002) identificaram *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds associado a lesões de antracnose em goiaba.

Diferenciação entre espécies de *Colletotrichum* baseadas no hospedeiro de origem ou em sua gama de hospedeiros pode não ser um critério confiável para fungos deste gênero, que podem infectar inúmeras espécies de plantas hospedeiras. Devido essa complexa situação, a combinação entre uma espécie de *Colletotrichum*, o hospedeiro envolvido e a incidência de antracnose, às vezes é insuficiente para se determinar precisamente a etiologia da doença. Assim, diversos estudos buscam, por meio de várias ferramentas de pesquisa, caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum*, visando compreender a real etiologia da antracnose em diferentes hospedeiros (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; TOZZE JÚNIOR, 2007; AFANADOR-KAFURI et al., 2003, SMITH; BLACK, 1990; SUTTON, 1992; GUNNEL; GUBLER, 1992; TANAKA; PASSOS, 1998). Assim a determinação precisa da etiologia das antracnoses é essencial para a compreensão da epidemiologia da doença e para definição de estratégias de controle.

Os métodos tradicionais para a identificação de espécies de *Colletotrichum* têm se baseado principalmente em diferenças morfológicas, como a cor da colônia, tamanho e forma dos conídios, temperatura ótima, taxa de crescimento, presença ou ausência de setas nos acérvulos (GUNNEL; GUBLER, 1992; SMITH; BLACK, 1990; SUTTON, 1992; VON ARX, 1957).

No entanto, devido às influências ambientais sobre a estabilidade das características morfológicas e a existência de formas intermediárias, tais critérios nem sempre são adequados para a diferenciação confiável entre espécies de *Colletotrichum* (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

Ao longo das últimas décadas, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso para complementar a identificação entre as espécies. Entre as técnicas moleculares, a PCR (“Polymerase Chain Reaction”) têm sido frequentemente utilizada por vários autores (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; ADASKAVEG; HARTIN, 1997; PERES et al., 2002; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR; BUENO; MASSOLA JÚNIOR, 2004; BUENO, 2005).

Atualmente, as técnicas moleculares, associadas às características morfológicas e biológicas têm sido empregadas para diferenciação e caracterização de espécies (FREEMAN; RODRIGUEZ, 1995; FREEMAN; KATAN, 1997; FREEMANN; KATAN; SHABI, 1998; LOPEZ, 2001; ANDRADE, 2007; TOZZE JÚNIOR; BUENO; MASSOLA JÚNIOR, 2004).

Considerando a importância da identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à cultura, bem como a falta de informações a respeito da sua frequência e distribuição no Estado de São Paulo, os objetivos desse trabalho foram: (i) a caracterização cultural, morfológica, molecular e enzimática de isolados de *Colletotrichum* obtidos de goiaba, oriundos das principais regiões produtoras de goiaba do Estado de São Paulo e (ii) a caracterização patogênica de alguns isolados selecionados de *Colletotrichum* associados a antracnose da goiaba no Estado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Goiabeira: uma visão geral da cultura

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma cultura tropical difundida pela América do Sul e Central, África e Ásia, tendo como principais produtores o Brasil, Índia, México, Estados Unidos, Venezuela, África do Sul, Jamaica, Quênia e Austrália. No Brasil ela é cultivada desde o Rio Grande do Sul até o Maranhão (FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005; PEREIRA, 1995).

Dentre as frutíferas tropicais brasileiras, a goiabeira apresenta excelentes condições para exploração em escala comercial, pois seus frutos atingem bons preços no mercado, além de serem muito apreciados por suas características organolépticas e valor nutricional. A goiaba é considerada pelos nutricionistas como uma das frutas mais completas e equilibradas, sendo uma das mais ricas em vitaminas A, C, E e do complexo B, em zinco, fibras, niacina e licopeno, além de concentrar altos teores de fósforo, magnésio, cálcio, ferro, ácido fólico. Suas excelentes propriedades organolépticas a tornam aproveitáveis tanto para o consumo *in natura* quanto para a industrialização. Sua polpa, de alto rendimento, pode ser transformada e comercializada na forma de doces, geléias, sorvetes, coquetéis, compotas, sucos e bebidas (CHOUDBURY et al., 2001).

No Brasil, em 2007, 15.069 hectares foram cultivados com goiabeira, gerando produção aproximada de 316 mil toneladas de frutos. Essa produção coloca o Brasil como o maior produtor mundial dessa fruta, seguido pela Índia e México. Outros importantes países produtores são Cuba, República Dominicana, Egito, Hawaii, Jamaica, Quênia, Malásia, Filipinas, Porto Rico, Taiwan, Tailândia e Venezuela (FNP, 2008; LIM; MANICOM, 2003, SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR - SECEX, 2009).

Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de goiaba, sua participação no mercado internacional da fruta *in natura* é inexpressiva. Em 2007, o país exportou somente 0,07% do total produzido (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF, 2009; SECEX, 2009). O baixo volume exportado deve-se, sobretudo, ao alto grau de perecibilidade do fruto na fase de pós-colheita, exigindo, dessa forma, que o produto tenha uma boa qualidade sanitária e que seja

levado para o mercado internacional por via aérea, onerando demasiadamente os custos de comercialização. Sendo assim, o mercado de goiaba continua acentuadamente dependente do mercado nacional (FAVERET; ORNOND; PAULA, 2000).

Os Estados de Pernambuco e São Paulo são os maiores produtores brasileiros, responsáveis por 65% da produção de goiabas do país. Pernambuco produziu 168 mil toneladas, aproximadamente 40% da produção nacional. O Estado de São Paulo é o segundo maior produtor, com uma produção de 120 mil toneladas, respondendo por 29,5% da produção brasileira (IBGE, 2009).

O volume de goiaba comercializado na Companhia de Entrepósito e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP, registrado em 2006, foi de 11.546 toneladas de goiaba, sendo 1.529 toneladas de goiaba branca e 10.017 toneladas de goiaba vermelha (FNP, 2008).

A produção paulista é típica de pequenos produtores e se concentra em três regiões, compostas pelos municípios de Taquaritinga, Monte Alto, Vista Alegre e Urupês (Grupo 1); Valinhos, Itu e Campinas (Grupo 2); e Mirandópolis e seus circunvizinhos (Grupo 3) (FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005).

Os pomares do grupo 1 ocupam área de 4.215,4 hectares e somam o total de um milhão de plantas, participando com 75% da produção estadual, destinada principalmente para a indústria. Destacam-se os municípios de Taquaritinga e Monte Alto, que apresentam áreas cultivadas próximas a 1.000 hectares, correspondendo a 27% da área total estadual. Essa região tem como vantagem a existência de agroindústrias localizadas nos municípios de Matão, Taquaritinga, Monte Alto e Vista Alegre do Alto (FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005).

A cultura no grupo 2 ocupa área de 806,7 hectares e atinge o total de 210 mil plantas, participando com 8% da produção estadual, destinada majoritariamente ao consumo *in natura*. O principal município produtor é Valinhos, com 429 hectares, seguido de Campinas com 229,1 hectares. Estes municípios próximos à Capital escoam a produção para a Central de Abastecimento S.A. de Campinas (CEASA/Campinas) e para a Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), de onde é distribuída a feirantes, supermercados, frutarias e outros. Esse grupo possui localização estratégica, por estar próximo a rodovias (Presidente Dutra, Bandeirantes, Anhanguera e Regis Bittencourt), bem como aos aeroportos (Guarulhos, Congonhas, e Viracopos), imprescindíveis para o escoamento rápido do produto, por ser uma fruta climatérica e altamente perecível.

No grupo 3, encontram-se 90 mil pés em uma área de 397,4 hectares, que contribuem com 17% da produção estadual, destinada em sua maior parte ao consumo *in natura*. O principal município deste grupo é Mirandópolis com 307,0 hectares. (FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005).

2.1.2 Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* descrito por Corda em 1837 compreende várias espécies, incluindo saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas responsáveis pela doença denominada antracnose em várias plantas hospedeiras, causando enormes prejuízos (VON ARX, 1957; MENEZES, 2002).

Segundo Von Arx. (1957), foi Stoneman que, em 1898, encontrou a forma ascógena em antracnose provocada por espécies de *Gloeosporium*, e as colocou em um novo gênero, ao qual chamou de *Gnomoniopsis*. Porém, esse nome já havia sido ocupado com outro fungo por Berlese em 1892. Então, em 1903, Von Schrenk e Spaulding mudaram a classificação para *Glomerella*, contendo cinco espécies.

Sutton (1992) reorganizou o gênero, incluindo as espécies do gênero *Colletotrichum* no gênero *Vermicularia*. Mais tarde, o gênero foi reorganizado sob vários nomes, sendo os mais comumente empregados: *Dicladium*, *Ellisieola*, *Vermicularia*, *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. Esses e outros nomes foram usados de maneira desordenada durante os séculos XIX e XX para várias espécies que hoje se encontram incluídas no gênero *Colletotrichum*, (SOUSA, 2004).

As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica, particularmente em ambientes quentes e úmidos dos trópicos (JEFFRIES et al., 1990; WALLER, 1992). Incluem espécies desde saprófitas até fitopatógenos, sendo considerado um dos principais patógenos mundiais. Os membros patogênicos de *Colletotrichum* ocorrem em diversas espécies de hospedeiros, desde culturas agrícolas e plantas medicinais, aos arbustos e árvores silvestres, causando podridões em colmos, caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares, infecções latentes e antracnoses. As antracnoses são descritas como lesões necróticas profundas e delimitadas nos tecidos (BAILEY; JEGER, 1992; AINSWORTH, 1971).

Causam prejuízos variáveis, dependendo das condições ambientais favoráveis, do grau de suscetibilidade da planta e, também, na pós-colheita em diferentes regiões produtoras no Brasil e no mundo (BAILEY; JEGER, 1992; PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN, 2000; BINYAMINI; SCHIFFMANN-NADEL, 1972; SEPIAH; PLOETZ; COOKE, 2003; DICKMAN; ALVAREZ, 1983; FITZELL; PEAK, 1984; HOWARD; ALBREGTS, 1983; KAGIWATA, 1986).

O patógeno é favorecido por temperaturas elevadas, sendo a temperatura ótima entre 22 e 25 °C, além de necessitar de alta umidade. Para que os esporos germinem, água livre deve estar disponível. As temperaturas ótimas para germinação de conídios e formação de apressórios estão entre 22 e 23 °C. Os esporos somente são liberados dos acérvulos quando estes encontram abundância de umidade. Respingos de chuva são comuns meios de disseminação. Luz solar, baixa umidade e temperaturas extremas (abaixo de 18 °C ou superior a 28 °C) inativa os esporos rapidamente (PONTE, 1996; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005, MORAES, 2009).

Colletotrichum apresenta colônia de coloração muito variada, escleródios presentes em algumas espécies do gênero (SUTTON, 1992). As células conidiogênicas do gênero geralmente são agregadas em conidiomatas (acérvulos), mas também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio (MENEZES, 2002). Os acérvulos podem variar muito de forma e tamanho dentro de uma mesma espécie e frequentemente sobre uma mesma planta suscetível. São rasos com formato de crosta, lentilha ou pústula e alcançam um diâmetro de 40 µm a 1 mm, instalam-se na epiderme do tecido do hospedeiro, e menos freqüentemente, sob a epiderme. No material vegetal, observa-se com freqüência a presença de setas. O micélio é apocítico (septado) e forte, cresce nas células epidermais ou em células mais profundas. As hifas se orientam no sentido perpendicular à superfície do substrato. Dessa forma, fazem pressão sobre as camadas superficiais, forçando-as a se romperem e liberarem os propágulos reprodutivos do fungo (VON ARX, 1957, SUTTON, 1992).

A formação de setas no acérvulo é variável e controlada por fatores ambientais, portanto, a sua presença ou ausência não deve ser utilizada como um caráter de valor taxonômico para separação de taxa (MENEZES, 2002). De acordo com Menezes (2002), as setas e células conidiogênicas parecem ser homólogas e, em determinadas condições do ambiente, as setas podem produzir conídios na extremidade.

Dentre as espécies deste gênero, *Colletotrichum gloeosporioides* é considerada a mais disseminada, heterogênea e importante, principalmente nos trópicos. Seus conídios são hialinos e

unicelulares produzidos no interior de acérvulos subepidérmicos dispostos em círculos (SUTTON, 1992; VON ARX, 1957, GUNNEL; GUBLER, 1992), geralmente formados em conjuntos de coloração salmão, retos e cilíndricos, com ápices obtusos e bases às vezes truncadas, medindo 12-17 μm de comprimento por 3,5-6 μm de largura. Dentro dos acérvulos, os conídios estão envolvidos por uma matriz gelatinosa alaranjada, constituída de polissarídeos e proteínas solúveis em água, a qual tem a função de protegê-los da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2002).

Os apressórios, estruturas especializadas da hifa que tem a função de fixar o fungo parasita ao hospedeiro, têm formatos arredondados ou levemente clavados a irregulares, medindo de 6-20 μm x 4-12 μm de diâmetro. Formados no tubo germinativo ou diretamente dos conídios ou ascósporos, no início são hialinos, com o passar do tempo tornam-se castanhos ou cinza escuros (VON ARX, 1957, SUTTON, 1992).

Em meio de cultura, *Colletotrichum* forma colônias variáveis, de coloração branco-gelo a cinza escuro, com quantidade variável de micélio aéreo. É variável também a produção de estruturas reprodutivas em meio de cultura (SUTTON, 1992).

Quando o fungo encontra-se na fase teleomórfica (*Glomerella cingulata*), forma os peritécios sobre a epiderme e subepiderme do hospedeiro. Essas estruturas podem alcançar um diâmetro de 85 a 100 μm , são arredondados, com formatos de garrafas e com abertura apical. Estes contêm as ascas, cada uma com 8 ascósporos na maioria dos casos (VON ARX, 1957).

Outra espécie dentro do gênero é *Colletotrichum acutatum*, descrita pela primeira vez para mamão papaia na Austrália, sendo hoje reconhecido como patógeno cosmopolita, causando antracnose em mais de quarenta hospedeiros mundialmente, como goiaba, maçã, kiwi, uva, pêra, amêndoa e pecã (SIMMONDS, 1965; PERES et al., 2002).

Colletotrichum acutatum apresentam conídios, geralmente, elipsóides e fusiformes, pelo menos em uma extremidade, ao invés de ambas as extremidades arredondadas como ocorre normalmente em *C. gloeosporioides* (ADASKAVEG; FORSTER, 2000). A principal produção de conídios está nos acérvulos, no entanto, *C. acutatum* também é capaz de formar conídios secundários na superfície do hospedeiro (LEANDRO et al. 2001). As colônias de *C. acutatum* inicialmente são brancas e depois ficam cobertas por uma massa de conídios róseos a laranjas (ZULFIQAR; TIMMER, 1996). O estágio sexual de certos subgrupos genéticos de *C. acutatum*

foi caracterizado em condições de laboratório e foi designado como *Glomerella acutata* (GUERBER; CORRELL, 2001).

C. acutatum apresenta temperatura ótima de crescimento micelial compreendida entre 25 e 26,5 °C. A taxa de crescimento micelial de *C. acutatum* geralmente é mais lenta que a taxa de crescimento em *C. gloeosporioides*, e esta parece ser uma característica cultural estável e de grande utilidade para separação das duas espécies (VINNERE, 2004).

2.1.2.1 Identificação de espécies de *Colletotrichum*

A taxonomia de *Colletotrichum* ainda é bastante confusa, tanto para as espécies anamórficas como as teleomórficas em *Glomerella*. Existem cerca de 900 espécies descritas ou transferidas para o gênero *Colletotrichum*. Somente para a espécie *C. gloeosporioides* são citadas cerca de 600 sinônimas (VON ARX, 1957; BAILEY et al., 1992).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* é feita tradicionalmente por meio de caracteres como morfologia e morfometria de conídios, coloração da colônia, taxa de crescimento micelial, patogenicidade (SMITH; BLACK, 1990; SUTTON, 1992; GUNNEL; GUBLER, 1992; TANAKA; PASSOS, 1998; FERNANDES et al., 2002; TOZZE JÚNIOR et al., 2006), presença de peritécio (HOWARD; ALBREGTS, 1984; SMITH; BLACK, 1990) e também através de sensibilidade à benomyl (FERNANDEDES; SANTOS; RIBEIRO, 2001; MELLO; MARTINS; MASSOLA, 2003; MELLO; MASSOLA JÚNIOR., 2004; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

É comum encontrarmos na literatura trabalhos que usem as características supracitadas para a identificação de espécies de *Colletotrichum*.

O trabalho de Bernstein et al. (1995) exemplifica bem esta situação. Os autores puderam identificar, por meio de características morfológicas e culturais, espécies de *Colletotrichum*. Para isso foram observadas estas características em setenta e dois isolados de *Colletotrichum* provenientes de pêsego, maçã, pecan, morango e outros hospedeiros. Os isolados puderam ser separados em dois grupos. O grupo que apresentou colônias de coloração rosada a alaranjada foi identificado como sendo *C. acutatum* e apresentou conídios com formato fusiforme. O outro

grupo de isolados apresentou colônias acinzentadas, conídios com extremidades arredondadas. Este último grupo foi identificado como sendo *C. gloeosporioides*.

De maneira semelhante Goes e Kimati (1997) agruparam e identificaram espécies de *Colletotrichum*, procedentes de citros, baseando-se em características morfológicas, culturais e patogênicas. Os isolados que apresentaram colônias de coloração cinza, conídios ligeiramente maiores e crescimento rápido em meio de cultura, foram identificados como *C. gloeosporioides*. Ao passo que os isolados identificados como *C. acutatum*, apresentaram colônias de coloração alaranjada, conídios menores e crescimento lento. Além dessas diferenças culturais e morfológicas, os resultados dos testes de patogenicidade revelaram que somente os isolados de *C. acutatum* reproduziram os sintomas de queda prematura dos frutos, indicando assim que tais características podem ser usadas para a diferenciação de espécies de *Colletotrichum*.

Os métodos tradicionais, acima mencionados, foram utilizados durante muito tempo na identificação de espécies de *Colletotrichum*. No entanto tais critérios, não raras vezes, geravam confusões de interpretações o que dificultava a identificação. Essas dificuldades encontradas nas identificações das espécies de *Colletotrichum* com base em critérios clássicos de taxonomia (como forma e tamanho de conídios e apressórios, presença ou ausência e forma de setas, presença ou ausência de escleródios e peritécios e grau de patogenicidade em hospedeiros) estão relacionadas à grande variabilidade desse fungo em diferentes condições ambientais (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN; SUTTON, 1992; WALLER, 1992). Em diversos casos, encontra-se uma grande variabilidade entre isolados identificados dentro da mesma espécie (LOPEZ, 2001, TOZZE JÚNIOR, 2007; MENEZES, 2002; ADASKAVEG; FORSTER, 2000, ADASKAVEG; HARTIN, 1997).

Os métodos tradicionais, antes utilizados como critério único de classificação, hoje tem sido usados como complemento para técnicas mais sensíveis, como as moleculares e também para verificar variabilidade intraespecífica e interespecífica.

O conhecimento da produção de enzimas extracelulares por fungos fitopatogênicos constitui uma ferramenta importante e adicional para estudos sobre taxonomia química em fungos, permitindo a detecção de diferenças, mesmo entre isolados de uma mesma espécie (LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES et al., 2003; ASSIS, 2001; COUTO; MENEZES; COELHO, 2002).

Couto, Menezes e Coelho (2002), estudando as características de isolados de *C. musae*, verificaram que todos isolados produziram enzimas extracelulares com atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica em meio sólido, permitindo dessa forma comparar a variabilidade entre isolados. Da mesma forma Assis (2001) observou que *Colletotrichum* spp. isolados de manga, produziram enzimas extracelulares com atividades amilolítica, lipolítica e proteolítica, mas não celulolítica. Diante dos dados os autores puderam diferenciar os isolados com base na atividade amilolítica e proteolítica.

Como já mencionado, os métodos tradicionais, para diferenciar isolados de *Colletotrichum* obtidos de diversos hospedeiros, não têm sido suficientes (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). A tecnologia do DNA recombinante permite investigar variações genéticas e genes que controlam a patogenicidade de fungos em plantas (MANNERS et al., 1992). As técnicas “Polymerase Chain Reaction” (PCR), “Random Amplified Polymorphic” DNA (RAPD), “Arbitrarily Primed (ap)-PCR” e outras têm sido usadas para determinar com segurança a diversidade genética intra e inter específica de *Colletotrichum* spp. Primers de PCR têm sido usados, entre inúmeras finalidades, como marcadores para espécies de *Colletotrichum* (AFANADOR-KAFURI et al., 2003) e primers de RAPD vem sendo usados para identificação de isolados de *C. gloeosporioides* que se diferenciam pelos sintomas causados na planta hospedeira (MUNAUT et al, 1998).

Atualmente, técnicas moleculares, associadas a características morfológicas e biológicas também têm sido empregadas para diferenciação e caracterização de espécies (FREEMAN; RODRIGUEZ, 1995; FREEMAN; KATAN, 1997; FREEMAN; KATAN, SHABI, 1998; LOPEZ, 2001; ANDRADE et al., 2007; TOZZE JÚNIOR; BUENO; MASSOLA JÚNIOR., 2004).

Peres et al. (2002) analisou a variabilidade patogênica, características morfológicas, culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum* spp. que afetam frutos, causando podridão, em pós-colheita. Isolados de morango e goiaba apresentaram crescimento lento, colônia alaranjada e alta frequência de conídios do tipo fusiforme, enquanto que os isolados de abacate, mamão, manga e maracujá apresentaram crescimento mais rápido, colônias cinza e alta frequência de conídios obclavados. Essas constatações associadas às análises moleculares permitiram a constatação de duas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de frutos em pós-colheita. Os isolados de morango e goiaba foram identificados como sendo *C. acutatum*

enquanto que os demais isolados foram identificados como *C. gloeosporioides*. O isolado de goiaba que foi identificado como *C. acutatum* nunca tinha sido relatado causando antracnose em frutos de goiaba, sendo esta a primeira constatação no Brasil.

Andrade et al. (2007) caracterizaram vinte e nove culturas monospóricas de *Colletotrichum*, isoladas de frutos e pecíolos de mamoeiro. A caracterização baseou-se, entre outros aspectos, na morfologia dos conídios, coloração e crescimento das colônias. Com base na morfologia dos conídios os 29 isolados foram identificados como *C. gloeosporioides*, tendo a maioria dos isolados conídios cilíndricos e/ou obclavados, em contraste com *C. acutatum*, isolado de morango, que apresentou conídios fusiformes. Em relação à coloração das colônias, todos os isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram-se bastante heterogêneos, variando de branco a cinza-escuro, indicando que tais isolados possam ser *C. gloeosporioides*.

2.1.3 Antracnose

O agente causal da antracnose corresponde ao fungo filamentososo do gênero *Colletotrichum*, considerado um dos principais fitopatógenos em todo mundo. Eles causam significativas perdas econômicas em culturas de regiões temperadas, subtropicais e tropicais no mundo. Cereais, legumes, plantas ornamentais e frutos podem ser seriamente afetados pelo patógeno. Embora muitas frutíferas cultivadas sejam infectadas por *Colletotrichum*, as perdas econômicas mais significativas ocorrem quando atacados em sua fase de frutificação (JUNQUEIRA et al., 2001; JUNQUEIRA et al., 2002; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

O agente causal sobrevive em restos culturais, no próprio hospedeiro ou em outras plantas hospedeiras vizinhas dos pomares. Como os propágulos desse fungo são disseminados por respingos de água, a ação do patógeno é favorecida por alta umidade, principalmente chuvas abundantes. Temperatura média próxima de 23 a 27°C favorece a produção dos esporos. Chuvas menos intensas favorecem o progresso da doença numa mesma planta já infectada, enquanto que chuvas acompanhadas de ventos tendem a transportar o fungo para outras plantas. Em períodos de temperaturas mais baixas, a importância da doença diminui, sendo pequena a sua incidência nos meses de inverno, mesmo que ocorram chuvas (RUGGIERO et al., 1996).

Colletotrichum infecta tanto tecidos em desenvolvimento quanto tecidos maduros (BAILEY, 1992). Dois tipos distintos de infecção podem ocorrer: as que infectam o fruto em desenvolvimento no campo (pré-colheita) e as que infectam os frutos maduros durante o armazenamento (pós-colheita). A capacidade de causar infecções latentes ou quiescentes tem agrupado *Colletotrichum* entre os patógenos mais importantes de pós-colheita.

Sutton (1992) refere-se à habilidade de *Colletotrichum* em causar infecção latente ou quiescente, não mostrando sintomas da doença. Além disso, o micélio permanece viável por longo período de tempo em sementes infectadas, restos culturais e frutos, manifestando-se logo que as condições se tornarem favoráveis para o seu desenvolvimento, e tornando-se um sério problema também na pós-colheita.

Os frutos, após a colheita, estão sujeitos a perdas por injúria mecânica, perdas fisiológicas, perdas patológicas e perdas por insetos e roedores. Embora o ataque de microorganismos seja provavelmente a mais séria causa de perdas pós-colheita, deve-se enfatizar que danos físicos e fisiológicos predisõem os frutos, frequentemente, ao ataque patológico (VILAS BOAS, 2002).

Os sintomas da antracnose nos frutos são caracterizados por áreas de formato mais ou menos circulares e de coloração escura. Quando os sintomas são mais severos, aparecem pequenas lesões deprimidas, encharcadas, de coloração marrom, principalmente, em locais danificados por insetos. As lesões podem coalescer resultando em uma grande mancha de formato irregular. A coloração dessas lesões é marrom-clara e com o tempo, crescem e ficam mais deprimidas, apresentando formato irregular. Em local com alta umidade, uma massa de esporos de cor róseo-alaranjada desenvolve-se sobre o centro da lesão. Quando os frutos aumentam em tamanho a superfície da lesão rompe-se, pois a área atacada não acompanha esse crescimento. A infecção inutiliza os frutos para o mercado de consumo *in natura*. No caso de infecção severa, os frutos tornam-se mumificados e pretos. Em frutos maduros a antracnose manifesta-se por pequenas lesões encharcadas, de coloração marrom-clara que mais tarde tornam-se deprimidas e moles, usualmente recobertas por tufo de conídios cor-de-rosa sobre as áreas descoloridas. Os frutos atacados normalmente apodrecem (JUNQUEIRA et al., 2001; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005; LIM; MANICOM, 2003; PEREIRA; MARTINEZ JÚNIOR, 1986).

Os prejuízos causados pela antracnose, em especial em países tropicais, resultam tanto na redução direta da qualidade e/ou quantidade dos produtos, como no aumento dos custos de produção e de pós-colheita (SKIPP et al., 1995).

A redução das perdas pós-colheita na cadeia produtiva de frutas representa um constante desafio, considerando que os frutos são órgãos que apresentam um alto teor de água e nutrientes e, mesmo após a colheita até a senescência, mantêm vários processos biológicos em atividade, apresentando, muitas vezes, maior predisposição a ocorrência de podridões (KADER, 2002 apud SILVEIRA et al., 2005).

Dessa forma várias precauções, muitas de natureza simples, podem ser adotadas a fim de reduzir substancialmente as perdas pós-colheita, destacando-se a modificação de práticas de manuseio que danificam a superfície da fruta (JOHNSON; COATES, 1995). O desenvolvimento de sistemas convenientes de acondicionamento é essencial para a redução de perdas que ocorrem em pós-colheita, principalmente quando os produtos são consumidos em locais distantes da área de produção (COURSEY; PROCTOR, 1975, apud SILVEIRA et al., 2005).

O controle da antracnose geralmente é realizado por meio de medidas culturais, como a poda e o plantio em espaçamento que permitam bom arejamento de todas as plantas. A limpeza do pomar, a queima imediata dos resíduos, além da aplicação de fungicidas cúpricos, visando reduzir o inóculo da área, são medidas que contribuem para o controle da doença. Após a colheita, é fundamental a lavagem dos frutos em água corrente, imersão dos mesmo em água a 50 °C durante 5 minutos e armazenamento sob condições refrigerada (8 a 10 °C) ou sob atmosfera controlada (3% O₂, 8% CO₂, a 12 °C) (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005; JUNQUEIRA; COSTA., 2002).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados

Para a condução dos experimentos, foram utilizados 54 isolados de *Colletotrichum* oriundos de goiaba, de diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo (Tabela 1 e Figura

1). Nessas regiões foram coletadas goiabas com sintomas típicos de antracnose. A partir desses frutos, foi realizado o isolamento do patógeno, transferindo-se esporos da lesão para placas de Petri contendo meio BDA, com auxílio de um microscópio estereoscópico e de um estilete flambado. Posteriormente essas placas foram incubadas em estufa a 25 °C, durante sete dias. Após esse período, os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA e mantido a 4 °C.

De cada isolado de *Colletotrichum* foram obtidas culturas monospóricas. Para isso em tubo de ensaio contendo 10 mL de água estéril, foi preparada uma suspensão de esporos, de modo a conter de 1 a 10 esporos por campo microscópico, quando examinada sobre lâmina em pequeno aumento (10x). Foi vertido 1 mL da suspensão sobre a superfície de meio de cultura sólido AA (Ágar-Água) contido em placas de Petri e espalhado uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalski, até cobrir inteiramente a superfície do meio. As placas com os esporos foram mantidas em posição inclinada, à temperatura de 25 °C, durante 24 a 36 horas. Foram retirados, pequenos fragmentos do meio contendo um esporo germinado, visualizado em microscópio estereoscópico, e transferido para meio de cultura BDA, obtendo-se dessa forma as colônias monospóricas.

Os isolados monospóricos foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA e, posteriormente à formação da colônia, verteu-se sobre a mesma, óleo mineral autoclavado, visando a preservação dos mesmos.

2.2.2 Caracterização cultural

Para a condução deste experimento foram utilizados os 54 isolados monospóricos de *Colletotrichum* (Tabela 1). Foram avaliadas a taxa de crescimento micelial e a característica morfológica da colônia de cada isolado.

Discos de BDA contendo micélio (5 mm de diâmetro) foram extraídos das margens das colônias, crescidas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Esses discos foram transferidos para o centro de novas placas contendo o meio de cultura BDA (Difco®). As placas contendo os discos foram incubadas a 25 °C e mantidas em fotoperíodo de 12 horas durante oito dias.

Tabela 1 - Identificação do isolado, local de origem, órgão de isolamento e ano de coleta dos 54 isolados de *Colletotrichum* provenientes de goiaba

(continua)

Isolado	Local de origem	Órgão de isolamento	Ano de coleta
CAFE 1	Cafelândia - SP	Fruto	2008
CAFE 2	Cafelândia - SP	Fruto	2008
CAFE 3	Cafelândia - SP	Fruto	2008
CAFE 4	Cafelândia - SP	Fruto	2008
MIR 1	Mirandópolis - SP	Fruto	2008
MIR 2	Mirandópolis - SP	Fruto	2008
MIR 3	Mirandópolis - SP	Fruto	2008
MIR 4	Mirandópolis - SP	Fruto	2008
PR 1	Presidente Prudente - SP	Fruto	2009
PR 2	Presidente Prudente - SP	Fruto	2009
PR 3	Presidente Prudente - SP	Fruto	2009
PR 4	Presidente Prudente - SP	Fruto	2009
CR 1	Cândido Rodrigues - SP	Fruto	2007
CR 3	Cândido Rodrigues – SP	Fruto	2007
CR 5	Cândido Rodrigues – SP	Fruto	2007
CR 6	Cândido Rodrigues – SP	Fruto	2007
MA 1	Monte Alto - SP	Fruto	2007
MA 2	Monte Alto - SP	Fruto	2007
MA 4	Monte Alto - SP	Fruto	2007
MA 5	Monte Alto - SP	Fruto	2007
IB 1	Ibirá - SP	Fruto	2007
IB 2	Ibirá - SP	Fruto	2007
IB 3	Ibirá - SP	Fruto	2007
IB 5	Ibirá - SP	Fruto	2007
TAQ 2	Taquaritinga - SP	Fruto	2007
TAQ 3	Taquaritinga – SP	Fruto	2007
TAQ 4	Taquaritinga – SP	Fruto	2007
TAQ 5	Taquaritinga – SP	Fruto	2007
BR 3	Brotas - SP	Fruto	2007
BR 4	Brotas – SP	Fruto	2007
BR 5	Brotas – SP	Fruto	2007

Tabela 1 - Identificação do isolado, local de origem, órgão de isolamento e ano de coleta dos 54 isolados de *Colletotrichum* provenientes de goiaba

(conclusão)			
Isolado	Local de origem	Órgão de isolamento	Ano de coleta
BR 6	Brotas – SP	Fruto	2007
IT 1	Itajú - SP	Fruto	2007
IT 2	Itajú - SP	Fruto	2007
IT 4	Itajú - SP	Fruto	2007
IT 5	Itajú - SP	Fruto	2007
AND 1	Andradina - SP	Fruto	2009
AND 2	Andradina - SP	Fruto	2009
AND 3	Andradina - SP	Fruto	2009
AND 4	Andradina - SP	Fruto	2009
JAU 1	Jaú - SP	Fruto	2009
JAU 2	Jaú - SP	Fruto	2009
JAU 3	Jaú - SP	Fruto	2009
JAU 4	Jaú - SP	Fruto	2009
BAU 1	Bauru - SP	Fruto	2009
BAU 2	Bauru - SP	Fruto	2009
BAU 3	Bauru - SP	Fruto	2009
BAU 7	Bauru - SP	Fruto	2009
CAM 1	Campinas - SP	Fruto	2009
CAM 2	Campinas - SP	Fruto	2009
PIR 1	Piracicaba - SP	Fruto	2009
PIR 2	Piracicaba – SP	Fruto	2009
PIR 3	Piracicaba – SP	Fruto	2009
PIR 4	Piracicaba - SP	Fruto	2009

2.2.2.1 Avaliação

Foram feitas leituras diárias de dois diâmetros ortogonais das colônias, com auxílio de uma régua milimetrada, durante sete dias. As médias obtidas dos diâmetros serviram para o cálculo da velocidade do crescimento micelial (mm/dia).

No oitavo dia, foi observado visualmente o aspecto morfológico de cada colônia. Para isso levou-se em consideração a topografia e a coloração da colônia.

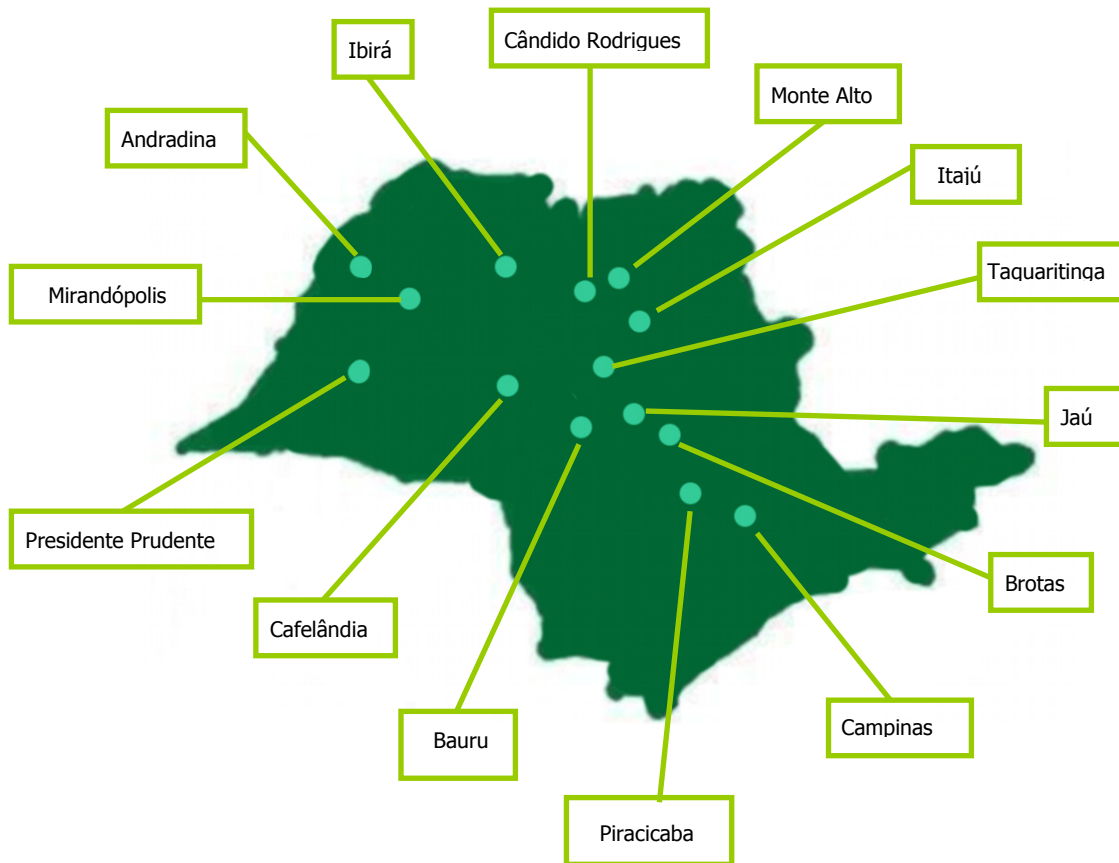


Figura 1 - Distribuição dos isolados coletados para condução dos experimentos

2.2.2.2 Análise dos dados

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com cinco repetições por isolado, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

Os valores médios da velocidade do crescimento micelial foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%.

2.2.3 Caracterização morfológica

Neste ensaio foram verificados a forma e o tamanho dos conídios dos 54 isolados monospóricos de *Colletotrichum*.

Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de Aveia (30 g de aveia; 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada). Após a repicagem, as placas foram mantidas a 25 °C, sob luz contínua. Sete dias após a incubação, foram obtidas suspensões de conídios. Para isso os conídios foram removidos de cada placa com uso de 10 mL de água destilada e auxílio de uma alça de Drigalski, sendo posteriormente filtrados em gaze.

Com a suspensão de conídios, foram confeccionadas lâminas semipermanentes para observação dos isolados quanto à forma e tamanho dos conídios, em microscópio óptico.

2.2.3.1 Avaliação

As lâminas de cada isolado foram avaliadas, sendo caracterizados a forma e o tamanho de 50 conídios.

Quanto ao formato, os conídios foram classificados em quatro grupos: 1) reto, fusiforme, com ápices afilados; 2) reto, oblongo, com ápices arredondados; 3) reto, clavado, afilado em uma extremidade; 4) reto, com constrição (SUTTON, 1992).

Quanto à dimensão, efetuou-se a medição do comprimento e largura de 50 conídios por lâmina. Sendo esses avaliados em sistema de vídeo-câmara acoplado a um microscópio óptico. As mensurações das dimensões reais de cada conídio foram realizadas 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 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 (μm), correspondente às dimensões dos conídios.

2.2.3.2 Análise dos dados

Para a análise dos dados foram obtidos os valores médios de comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios de cada isolado.

2.2.4 Identificação molecular

2.2.4.1 Extração de DNA

Foi extraído o DNA genômico dos 54 isolados de *Colletotrichum* de goiaba, utilizando-se metodologia descrita por Dellaporta, Wood e Hicks (1983) adaptada.

Todos os isolados foram cultivados em meio BDA a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Cerca de 50 mg de micélio aéreo do fungo foram transferidos assepticamente para microtubos de 1,5mL, contendo 600 µL de tampão de extração (NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0; β-mercapoetanol 0,2%). Mediante auxílio de um pistilo de plástico, o micélio foi macerado no tampão de extração. Após maceração foi adicionado em cada microtubo 50 µL de SDS 20%, seguindo-se agitação durante um minuto e incubação a 60 °C por 15 minutos. Posteriormente adicionou-se 300 µL de acetato de potássio 5 M, agitou-se por um minuto e a mistura obtida foi lavada para centrifugação a 14000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, 400 µL do sobrenadante, obtidos da centrifugação, foram transferidos para novos microtubos contendo 400 µL de isopropanol. Uma breve agitação foi realizada nos microtubos e, em seguida, foram levados para centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente do microtubo e junto ao precipitado foram introduzidos 500 µL de etanol 70% em cada tubo. Os microtubos foram submetidos à nova centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos. Por fim todo o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água MilliQ autoclavada.

A quantidade e a pureza do DNA genômico foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). As amostras foram então diluídas até a concentração de 10 ng DNA/µL de suspensão e armazenadas sob temperatura de -20 °C.

2.2.4.2 Reação de PCR

Para a reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3'), específico para *C. acutatum* (SREENIVASAPRASAD et al., 1996) ou CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3'), específico para *C. gloeosporioides* (SREENIVASAPRASAD e BROWN, 1992) em conjunto com o oligonucleotídeo ITS4, para amplificação da região ITS do DNA ribossômico dos isolados analisados.

A reação para *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* foi realizada utilizando-se 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (CaInt2 e ITS4 ou CgInt e ITS4) e 0,04 U Taq DNA polimerase.

Para a reação de *C. acutatum*, o termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C. Na reação para *Colletotrichum gloeosporioides* o termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Após a reação de PCR, os produtos foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA gel Stain (Invitrogen Corporation). A corrida foi realizada em corrente constante de 5 volts/cm por 1 h. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta e fotografadas.

Foram utilizadas amostras de DNA de isolados padrões de *C. acutatum* (Col 35) e *C. gloeosporioides* (Col 48), ambos provenientes de pimentão (TOZZE JÚNIOR, 2007).

2.2.5 Atividade enzimática *in vitro*

Neste ensaio foram avaliadas as atividades amilolítica, lipolítica, proteolítica, celulolítica e pectinolítica, em meios de culturas sólidos para os 54 isolados provenientes das diferentes regiões produtoras de goiaba do estado de São Paulo.

Para tanto, discos (5 mm de diâmetro) de BDA contendo o micélio fúngico, retirados do bordo de colônias jovens, foram repicados individualmente para o centro de placas de Petri, para cada um dos meios sólidos, como descritos nos itens abaixo.

2.2.5.1 Atividade amilolítica *in vitro*

Os isolados foram cultivados em meio mínimo, o qual teve a glucose substituída por amido (6 g de NaNO_3 ; 1,5 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de KCl ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de FeSO_4 ; 0,01 g de ZnSO_4 ; 10 g de amido; 15 g de ágar; 1 L de água destilada; pH = 6,8). Foram preparadas quatro réplicas (placas) por isolado, as quais permaneceram a 25° C sob fotoperíodo de 12 horas.

Decorridos sete dias de cultivo de cultivo dos isolados no meio, procedeu-se à revelação do halo de degradação do amido. Para isso, foram vertidos 2 mL de solução lugol (5 g de KI; 1 g de iodo; 100 mL de água destilada) sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada e a atividade amilolítica detectada pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada.

Com auxílio de uma régua milimetrada, mensuraram-se os diâmetros perpendiculares do crescimento micelial e do crescimento micelial mais o halo de degradação do amido para cálculo de áreas. A área de degradação do amido foi obtida subtraindo-se a área do crescimento micelial.

2.2.5.2 Atividade lipolítica *in vitro*

Para a avaliação da atividade lipolítica, utilizou-se Tween-20 (monolaurato de sorbitan) como substrato. O meio conteve 10 ml de Tween-20, 10 g de peptona, 5 g de NaCl , 0,01 g de CaCl_2 , 20 g de ágar, 1 L de água destilada e pH ajustado para 6,0. Quatro réplicas (placas) por isolado foram preparadas, as quais permaneceram a 25° C sob fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Após a incubação, as placas foram resfriadas a 4 °C por 48 horas. A atividade das enzimas lipolíticas das colônias foi observada como um precipitado visível devido a formação de cristais de sais de cálcio ou como um halo claro deste precipitado ao redor das colônias. A avaliação da área de degradação de lipídio foi realizada como no item 2.2.5.1.

2.2.5.3 Atividade celulolítica *in vitro*

Os isolados foram cultivados em ágar carboximetilcelulose (1 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g de asparagina; 0,5 g de KCl; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de CaCl_2 ; 0,5 g de extrato de leveduras; 10 g de carboximetilcelulose; 20 g de ágar; 1 L de água destilada). Quatro réplicas (placas) por isolado foram preparadas. Estas foram incubadas por sete dias a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas e em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50 °C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão para a revelação do halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia.

A avaliação da área de degradação da celulose foi realizada como no item 2.2.5.1.

2.2.5.4 Atividade proteolítica *in vitro*

Para detectar a atividade proteolítica, foi utilizado o meio nutriente ágar, contendo gelatina como substrato (5 g de peptona; 3 g de extrato de carne; 15 g de ágar; 40 g de gelatina; 1000 mL de água destilada; pH 6,0). As placas foram incubadas durante sete dias a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas. Após o período de incubação dos isolados neste meio, foi adicionado sobre o mesmo uma solução saturada de sulfato de amônio, cujo precipitado tornou o ágar mais opaco e acentuou as zonas claras ao redor das colônias, onde a gelatina foi degradada.

A avaliação da área de degradação da proteína foi realizada como no item 2.2.5.1.

2.2.5.5 Atividade pectinolítica *in vitro*

A atividade pectinolítica foi avaliada em meio mineral tamponado (MMT) (2 g de KH_2PO_4 ; 7 g de K_2HPO_4 ; 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 g de pectina; 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6 g de extrato de levedura; 13 g de ágar; 1 L de água destilada; pH = 7,2). Foram preparadas quatro réplicas (placas) por isolado, as quais permaneceram a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, durante quatro dias. Em seguida, a partir de cada repetição, foi transferido disco (5 mm de diâmetro) de MMT com micélio para placa de Petri com 25 mL de meio Mac Ilvaine (7,74 g de ácido cítrico;

17,93 g de Na_2HPO_4 ; 2,5 g de pectina cítrica; 13 g de ágar; 1 L de água destilada; pH = 6,0), o qual permitiu a difusão das pectinases para o meio circundante. Essas placas foram mantidas a 40°C por 48 h. Decorrido o período de incubação, verteram-se 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura, os quais foram descartados após 10 minutos de repouso. As zonas de substrato degradado foram visualizadas, observando um halo claro ao redor da colônia desenvolvida no meio de cultura.

A avaliação da área de degradação da pectina foi realizada como no item 2.2.5.1.

2.2.5.6 Análise dos dados

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com quatro repetições por isolado, sendo cada repetição representado por uma placa de Petri.

Os valores médios da área de degradação dos substratos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott ao nível de probabilidade de 5%.

2.2.6 Caracterização patogênica

Diante dos resultados das caracterizações cultural, morfológica e molecular, foram selecionados alguns isolados para avaliação da patogenicidade.

2.2.6.1 Seleção e desinfestação dos frutos

Para condução dos experimentos, goiabas da variedade Kumagai foram obtidas da propriedade do Sr. Ricardo Kumagai, em Campinas, SP e selecionadas de acordo com o estágio de maturação. Para tanto foi utilizado colorímetro Minolta (modelo CR-10), para a seleção e homogeneização das goiabas, tomando duas leituras por fruto, em lados opostos de sua região equatorial. Os resultados foram expressos em ângulos de cor (oh) sendo utilizados no experimento os frutos com as leituras de ângulo de cor (oh) entre 117 e 116 (SOAREZ, 2008).

Os frutos foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 5 minutos, lavados em água destilada para retirada do produto, secos a temperatura ambiente e acondicionados em bandejas plásticas.

2.2.6.2 Preparo das suspensões

Os isolados selecionados foram cultivados em meio de aveia (40 g de aveia; 15 g de ágar; 1 L de água destilada), sob temperatura de 25 °C e luz contínua. Após sete dias de incubação nessas condições, cada colônia recebeu 20 mL de água destilada e as suspensões obtidas foram calibradas para 10^5 conídios/mL. Essas suspensões foram utilizada nas inoculações dos frutos.

2.2.6.3 Inoculação

Inicialmente foi demarcada a região de inoculação em cada fruto, com auxílio de uma caneta de tinta permanente. No interior dessa região foram depositados 50 µL da suspensão de conídios. Posteriormente foi realizado o fermento com uma agulha histológica, à profundidade de 0,3 cm para todos os frutos.

Os frutos inoculados foram acondicionados em bandejas plásticas, que continham papéis de filtro e algodão umedecidos. Essas bandejas foram fechadas com filmes plásticos para formação de câmara úmida. Os frutos inoculados ficaram sob condição de câmara úmida por 48 horas. Nas testemunhas o mesmo procedimento foi adotado, porém utilizando água destilada ao invés da suspensão de esporos. As bandejas foram mantidas a 25 °C sob fotoperíodo aproximado de 12 horas durante 15 dias.

2.2.6.4 Avaliação

Foi avaliada a severidade (diâmetro da área lesionada) da doença, a partir do aparecimento da primeira lesão até a senescência dos frutos. O diâmetro da área lesionada foi obtido pela média de duas medidas perpendiculares, medido com auxílio de uma régua milimetrada. O período de incubação (tempo entre a inoculação e o aparecimento de sintomas), o

período de latência (tempo entre a inoculação e o aparecimento de lesões esporulantes) e a esporulação foram calculados.

Para quantificar a esporulação, cada lesão foi lavada com 25 mL de água destilada. Dessa suspensão obtida foram feitas quantificações dos esporos com auxílio de uma câmara de Neubauer. Posteriormente foi calculada a quantidade de esporos produzidos por centímetro quadrado da lesão, multiplicando o valor obtido na câmara de Neubauer (esporos/mL) por 25 e dividindo o resultado obtido pela área da lesão (cm²).

2.2.6.5 Análise dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para cada tratamento utilizaram-se 10 frutos, sendo cada fruto representado por uma unidade experimental. Para análise estatística foi utilizada a média dos valores obtidos nas lesões. Os resultados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização cultural

Os dados referentes à caracterização cultural foram analisados, agrupados e estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Os 54 isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram-se bastante heterogêneos quanto à coloração das colônias. Diante dessa heterogeneidade, observações e descrições das culturas em meio BDA foram realizadas, o que permitiu agrupá-las em 9 grupos distintos (Tabela 2 e Figura 2).

No grupo A, foram reunidos 18 isolados (AND 2, AND 3, PR 2, PR 3, MIR 4, CAFE 2, CAFE 4, IT 1, BAU 2, BAU 3, JAU 4, CR 3, CR 5, TAQ 4, MA 2, MA 4, PIR 1 e CAM 2), o que corresponde a maioria dos isolados (33%).

O grupo B foi composto por 12 isolados (AND 1, PR 1, PR 4, IB 5, JAU 1, JAU, 2, JAU 3, CR 6, TAQ 3, PIR 2, PIR 4, BR 6) correspondendo 22% dos isolados. Cinco isolados (TAQ 2, MA 1, MIR 2, IB 3, IT 5), aproximadamente 9%, foram reunidos no grupo C. Os isolados BAU 7, MIR 1 e BR 5, foram inseridos no grupo D. O grupo E foi representado pelos isolados BAU 1 e PIR 2, enquanto que no grupo F foram agrupados os isolados CAFE 1, CR 1 e BR 4. Quatro isolados (IB 1, IT 2, MA 5 e CAM 1) apresentaram características do grupo G e outros cinco (AND 4, IB 2, IT 4, TAQ 5 e BR 3) do grupo H. Por fim os isolados, MIR 3 e CAFE 3 foram inseridos no grupo I.

Quanto à topografia das colônias, os isolados apresentaram três padrões distintos: (i) micélio aéreo reduzido (colônias com crescimento micelial rente ao meio de cultura), (ii) micélio aéreo moderadamente abundante (colônias com crescimento micelial aéreo de até 2 mm de altura), (iii) micélio aéreo abundante (colônias com crescimento micelial aéreo acima de 2 mm de altura) (Tabela 3). A maioria dos isolados apresentou micélio aéreo moderadamente abundante, o que correspondeu a 52% dos isolados. Foi observado micélio aéreo abundante para 39% dos isolados. Apenas 5 isolados, aproximadamente 9%, apresentaram micélio aéreo reduzido.

Os isolados dos grupos A, B, C, F, G, H apresentaram características culturais semelhantes ao descrito para *Colletotrichum gloeosporioides* (SUTON, 1992). A coloração das colônias desses grupos variou de cinza claro a escuro, alguns com centro claro outros escuros, contendo bordos branco a cinza claro.

O grupo D apresentou colônias de coloração branca, com bordo branco e reverso creme. Segundo alguns autores essas características podem se enquadrar tanto para *C. gloeosporioides* quanto para *C. acutatum* (TOZZE JÚNIOR, 2007; ANDRADE, 2007). O Grupo I reuniu as colônias de coloração salmão, com bordo branco e reverso salmão. Sendo estas características comuns de *C. acutatum* (SUTTON, 1992). Diferentemente dos demais grupos, o grupo E não apresentou características específicas que permitisse enquadrá-lo em alguma espécie de *Colletotrichum*.

Tabela 2 - Diversidade dos aspectos culturais dos isolados de *Colletotrichum* spp. de goiaba, observados em meio BDA, aos 7 dias

Grupo	Cor da colônia	Borda da colônia	Reverso da colônia
A	Cinza claro	Branca	Creme
B	Cinza escuro	Branca	Cinza
C	Cinza escuro	Cinza claro	Cinza claro
D	Branca	Branca	Creme
E	Creme	Creme	Creme
F	Cinza escuro no centro com abundante esporulação de cor laranja	Branca	Salmão
G	Cinza escuro no centro e cinza claro ao redor	Branca	Creme
H	Cinza claro no centro e cinza escuro ao redor	Branca	Creme
I	Salmão	Branca	Salmão

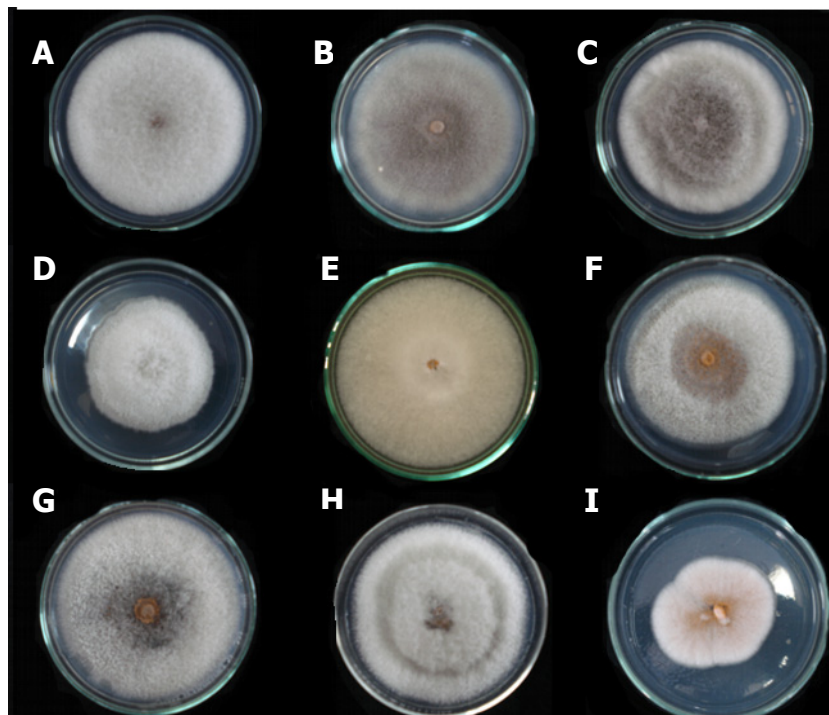


Figura 2 - Aspectos das colônias de *Colletotrichum* em meio BDA, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Isolados padrões dos grupos: A, B, C, D, E, F, G, H e I

Apesar de alguns grupos apresentarem características padrões para algumas espécies de *Colletotrichum*, a princípio, baseados apenas nas características descritivas das colônias, não podemos afirmar categoricamente, qual espécie pertence a cada isolado. A inconsistência dessas características para fins taxonômicos foram levantadas por inúmeros autores (TOZZE JÚNIOR, 2007; ANDRADE et al., 2007; PERES et al., 2002; FREEMAN; KATAN, SHABI, 1998). Vários fatores podem influenciar as características das colônias, tais como: meio de cultura utilizado, fotoperíodo de exposição e período de incubação (COUTO; MENEZES; COELHO, 2002). Mesmo padronizando tais fatores, o patógeno está sujeito a intensa variabilidade governada tanto por pressão do ambiente quanto por características intrínsecas ao patógeno. Teixeira (2001) sugere que a expressão dos aspectos morfofisiológicos é condicionada por inúmeros genes, gerando dessa forma tal variabilidade. Vale ressaltar ainda, que algumas dessas características, muitas vezes são subjetivas, sendo, portanto, dependentes da interpretação de cada autor.

Os dados referentes à taxa do crescimento micelial (TCM) estão apresentados na Tabela 3. Os isolados MIR 1, MIR 3 e CAFE 3 apresentaram as menores TCM, que correspondeu a 6,9, 7,3 e 7,5 mm/dia, respectivamente. Esses isolados não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram estatisticamente dos demais isolados analisados. Diante dessas diferenças puderam-se observar dois padrões distintos de crescimento micelial. Três isolados (MIR 1, MIR 3 e CAFE 3) apresentaram crescimento na faixa de 6,9 a 7,5 mm/dia, enquanto que os demais apresentaram crescimento variando entre 9,1 a 11,7 mm/dia.

De acordo com o padrão de crescimento para *Colletotrichum* proposto por Sutton (1992), a TCM entre 6,9 a 7,5 está mais próxima a faixa obtida para *C. acutatum*, enquanto que a TCM entre 9,1 a 11,9 mm/dia, está mais próxima ao crescimento mostrado por *C. gloeosporioides*.

Esses dados corroboram com os obtidos por diversos autores (PERES et al., 2002; TOZZE JÚNIOR, 2007; VINNIERE, 2004; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; COUTO; MENEZES; COELHO, 2004; ANDRADE et al., 2007). Esses mesmos autores relatam que os isolados de *C. acutatum* crescem em ritmo mais lento do que os isolados de *C. gloeosporioides* (SHI et al., 1992; SICARD et al., 1997; BERNSTEIN et al., 1995). Vinnere (2004), concluiu que, o crescimento mais lento de *C. acutatum* perante *C. gloeosporioides* parece ser a única característica cultural realmente estável, e que pode promover resultados reproduzíveis, auxiliando a separação das duas espécies. Sendo assim a taxa de crescimento micelial tem sido útil para diferenciar populações de *Colletotrichum* em diversas culturas (SHABI et al. 1994).

Tabela 3 - Taxa de Crescimento Micelial (TCM), grupo de coloração e topografia da colônia de isolados de *Colletotrichum* oriundos de goiaba

(continua)

Isolado	TCM (mm/dia)	Grupo de coloração da colônia	Topografia da colônia	
AND 1	10,9	abcdefg*	B	Micélio aéreo abundante
AND 2	11,0	abcdef	A	Micélio aéreo abundante
AND 3	11,1	abcde	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
AND 4	11,7	a	H	Micélio aéreo reduzido
PR 1	11,4	ab	B	Micélio aéreo moderadamente abundante
PR 2	11,5	ab	A	Micélio aéreo abundante
PR 3	11,5	ab	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
PR 4	11,1	abcd	B	Micélio aéreo moderadamente abundante
MIR 1	6,9	t	I	Micélio aéreo moderadamente abundante
MIR 2	11,4	ab	C	Micélio aéreo abundante
MIR 3	7,3	t	I	Micélio aéreo moderadamente abundante
MIR 4	11,4	ab	A	Micélio aéreo abundante
IB 1	11,3	abc	G	Micélio aéreo moderadamente abundante
IB 2	11,2	abcdefg	H	Micélio aéreo moderadamente abundante
IB 3	11,7	abcdefgh	C	Micélio aéreo moderadamente abundante
IB 5	11,9	abcdefgh	B	Micélio aéreo moderadamente abundante
CAFE 1	9,9	defghijklmno	F	Micélio aéreo reduzido
CAFE 2	10,5	abcdefghijk	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
CAFE 3	7,5	t	I	Micélio aéreo moderadamente abundante
CAFE 4	10,5	abcdefghij	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
IT 1	10,0	klmnopqr	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
IT 2	9,9	cdefghijklmn	G	Micélio aéreo reduzido
IT 4	10,3	bcdefghijklm	H	Micélio aéreo moderadamente abundante
IT 5	10,4	abcdefghijkl	C	Micélio aéreo abundante
BAU 1	9,6	ghijklmnopqr	E	Micélio aéreo abundante
BAU 2	9,6	ghijklmnopqr	A	Micélio aéreo abundante
BAU 3	9,7	ghijklmnopqr	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
BAU 7	10,3	bcdefghijklm	D	Micélio aéreo abundante

Tabela 3 - Taxa de Crescimento Micelial (TCM), grupo de coloração e topografia da colônia de isolados de *Colletotrichum oriundos* de goiaba

(conclusão)

Isolado	TCM (mm/dia)	Grupo de coloração da colônia	Topografia da colônia	
JAU 1	9,6	hijklmnopqr	B	Micélio aéreo moderadamente abundante
JAU 2	9,5	nopqr	B	Micélio aéreo moderadamente abundante
JAU 3	9,5	ijklmnopqr	B	Micélio aéreo abundante
JAU 4	9,8	defghijklmno	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
CR 1	10,4	abcdefghijkl	F	Micélio aéreo moderadamente abundante
CR 3	10,5	abcdefghijkl	A	Micélio aéreo abundante
CR 5	10,5	bcdefghijklm	A	Micélio aéreo abundante
CR 6	10,4	abcdefghijkl	B	Micélio aéreo abundante
TAQ 2	10,2	bcdefghijklm	C	Micélio aéreo moderadamente abundante
TAQ 3	10,3	abcdefghijkl	B	Micélio aéreo abundante
TAQ 4	10,5	abcdefghijkl	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
TAQ 5	10,2	bcdefghijklm	H	Micélio aéreo moderadamente abundante
MA 1	9,8	cdefghijklmn	C	Micélio aéreo abundante
MA 2	9,6	ghijklmnopqr	A	Micélio aéreo abundante
MA 4	10,0	cdefghijklmn	A	Micélio aéreo abundante
MA 5	9,9	defghijklmno	G	Micélio aéreo abundante
PIR 1	9,4	qrs	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
PIR 2	9,4	qrs	B	Micélio aéreo abundante
PIR 2	9,3	nopqrs	E	Micélio aéreo reduzido
PIR 4	9,4	jklmnopqr	B	Micélio aéreo moderadamente abundante
BR 3	9,0	klmnopqr	H	Micélio aéreo abundante
BR 4	9,3	nopqr	F	Micélio aéreo reduzido
BR 5	9,2	jklmnopqr	D	Micélio aéreo abundante
BR 6	9,4	lmnopqr	B	Micélio aéreo moderadamente abundante
CAM 1	9,3	nopqrs	G	Micélio aéreo moderadamente abundante
CAM 2	9,1	mnopqr	A	Micélio aéreo moderadamente abundante
CV (%)	2,3			

*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de tukey ao nível de 5% de significância.

2.3.2 Caracterização morfológica

Os dados obtidos na caracterização morfológica dos conídios estão apresentados na Tabela 4. Os formatos dos conídios foram classificados em quatro grupos distintos: 1 - reto, fusiforme, com ápices afilados; 2 - reto, oblongo, com ápices arredondados; 3 - reto, clavado, afilado em uma extremidade; 4 - reto, com constrição.

Os conídios retos, fusiformes, com ápices afilados foram encontrados em 42 isolados e sua frequência variou de 5 a 92%. Os conídios retos, oblongo, com ápices arredondados foram encontrados em todos isolados variando de 4 a 40% do total de conídios avaliados. Os conídios retos, clavados, afilados em uma extremidade, foram encontrados em quase todos os isolados (51 isolados), porém apresentaram baixa frequência, que variou de 1 a 50%. Os conídios retos, com constrições foram encontrados em apenas 10 isolados e sua frequência variou de 3 a 11%.

Os isolados MIR 1, MIR 3 e CAFE 3 apresentaram predominância de conídios com formato reto, fusiforme contendo os ápices afilados. Segundo Sutton (1992) esse formato é típico de *C. acutatum*. A grande maioria dos isolados (AND1, AND 2, AND3 AND 4, PR 1, PR 2, PR 3, PR 4, MIR 2, MIR 4, IB 1, IB 2, IB 3, IB 5, CAFE 1, CAFE 2, CAFE 4, IT 1, IT 2, IT 3, IT 5, BAU 1, BAU 2, BAU 3, BAU 7, JAU 1, JAU 2, JAU 3, JAU 4, CR 1, CR 3, CR 5, CR 6, TAQ 2, TAQ 3, TAQ 4, TAQ 5, MA 1, MA 2, MA 4, MA 5, PIR 1, PIR 2, PIR 3, PIR 4, BR 3, BR 4, BR 5, BR 6, CAM 1, CAM 2) apresentou predominância de conídios retos, oblongo, com os ápices arredondados. Essas características se enquadram nas descritas para *C. gloeosporioides* (SUTTON, 1992).

Analisando a morfometria dos conídios, podemos verificar a alta variabilidade entre os isolados analisados. O comprimento variou de 11,4 a 16,8 μm , enquanto que a largura variou de 2,6 a 4,9 μm . Os isolados MIR 1, MIR 3 e CAFE 3, apresentaram conídios variando de 13,9 a 14,8 μm de comprimento por 2,6 a 2,9 μm de largura. Esses valores enquadram-se na faixa proposta por Sutton (1992) para *C. acutatum*.

Grande parte dos isolados (AND 1, AND 2, AND 3, PR 2, PR 3 PR 4, MIR 2, MIR 4, IB 2, IB 5, CAFE 1, CAFE 4, IT 1, IT 5, BAU 7, JAU 2, JAU 3, JAU 4, TAQ 2, TAQ 3, TAQ 4, TAQ 5, MA 1, MA 2, MA 4, MA 5, PIR 1, PIR 2, PIR 3, PIR 4 BR 3, BR 4, BR 5, BR 6) apresentou conídios que variaram entre 12,7 e 16,8 μm de comprimento e 3,5 e 4,9 μm de

largura. Conídios com essas dimensões estão mais próximos a *C. gloeosporioides*, segundo as dimensões proposta por Sutton (1992).

Segundo Sutton (1992), os conídios de *C. gloeosporioides* variam entre 12 a 17 µm de comprimento por 3,5 a 6 µm de largura e os conídios de *C. acutatum* entre 8,5 a 16,5 µm de comprimento por 2,5 a 4 µm de largura. Como se observa, há uma faixa de sobreposição entre as dimensões proposta para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, o que pode gerar dúvidas no momento da classificação entre essas duas espécies. Diante desse fato, os isolados AND 4, PR 1, IB 1, IB 3, CAFE 2, IT 2, IT 4, BAU 1, BAU 2, BAU 3, JAU 1, CR 1, CR 3, CR 5, CR 6, CAM 1 e CAM 2, não puderam ser identificados com base na morfometria de seus conídios.

De forma semelhante ao obtido nesse trabalho, Tozze Júnior (2007) observou que isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* oriundos de pimentão, apresentaram alta variabilidade e que a sobreposição nas dimensões dos conídios descritas para as espécies, baseando apenas nas características morfológicas, não foi possível identificar alguns isolados como sendo pertencentes a uma única espécie. Dentro deste grupo não identificado poderiam estar presentes isolados de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*.

Andrade et al. (2007), caracterizando isolados de *Colletotrichum* de mamão, também constataram que a diferenciação entre espécies com base nas dimensões de conídios e apressórios foi dificultada pela sobreposição dos valores descritos por Sutton (1992), pois a maioria dos isolados de mamão apresentou dimensões dentro da faixa de variação descrita para as duas espécies, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Couto e Menezes (2004) constataram a presença de conídios com o comprimento superior ao padrão mais frequentemente encontrado para *C. musae* e sugeriram que tal comportamento era devido à ocorrência de segregação genética na proporção de 3:1 (três de tamanho normal e um fora do tipo padrão). Essa segregação pode estar relacionada à condição nuclear dos conídios, sendo um comportamento variável, de acordo com o ambiente de cultivo da espécie (MENEZES; HANLIN, 1996).

Analisando a relação comprimento/largura (C/L) dos isolados, verificou-se que os isolados MIR 1, MIR 3 e CAFE 3, apresentaram relação C/L variando de 5,0 a 5,5, sendo superior aos demais isolados, cuja relação C/L variou de 2,7 a 4,8.

Furtado et al. (1999), estudando a morfometria de isolados de *C. gloeosporioides* em seringueira, verificaram que as médias da relação comprimento/largura variavam de 3,16 a 4,15,

sendo considerando mais ovalados os isolados que apresentavam relações C/L menores. Da mesma forma Veras, Gasparotto e Menezes (1997) observou que o tamanho dos conídios pela relação C/L parece ser um bom parâmetro, indicando que quanto maior o quociente dessa relação, os conídios são mais longos e delgados e vice-versa.

Tabela 4 - Comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência do formato de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum* oriundos de goiaba

(continua)

Isolado	Comprimento (μm)		Largura (μm)		Relação (comprimento/Largura)		Formato (%)			
	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude	1	2	3	4
AND 1	14,6	11,2-18,4	4,2	3,1-2,4	3,5	2,2-4,6	14	67	19	0
AND 2	15,6	10,2-20,1	4,1	2,9-5,1	3,8	2,3-4,9	11	59	19	11
AND 3	15,7	11,6-19,4	4,6	2,7-5,6	3,4	2,2-4,8	6	72	22	0
AND 4	16,1	10,2-21,3	3,9	3,1-4,8	4,1	2,4-5,1	9	67	24	0
PR 1	13,8	10,8-17,3	3,6	2,8-4,4	3,8	2,6-4,9	12	78	10	0
PR 2	13,2	9,0-9,1	4,8	3,1-5,6	2,8	1,9-3,7	0	74	26	0
PR 3	13,7	11,9-19,4	4,2	2,9-5,2	3,3	2,2-4,2	5	82	6	7
PR 4	14,6	13,2-20,1	4,2	2,5-4,8	3,5	3,3-5,1	17	68	15	0
MIR 1	14,8	10,4-17,1	2,9	2,4-4,2	5,1	3,2-5,2	79	7	14	0
MIR 2	16,4	11,2-19,2	4,6	3,2-5,2	3,6	2,5-4,2	3	76	21	0
MIR 3	13,9	9,2-15,4	2,8	2,5-3,7	5,0	2,6-4,4	89	11	0	0
MIR 4	13,8	11,4-16,8	4,7	3,2-5,8	2,9	1,8-3,8	5	63	32	0
IB 1	14,7	11,6-19,6	3,8	3,1-4,9	3,9	2,4-4,6	12	68	12	8
IB 2	16,8	10,3-18,7	3,9	3,2-4,4	4,3	2,3-4,9	11	49	40	0
IB 3	12,9	10,2-19,1	3,5	2,8-4,6	3,7	2,1-5,2	0	74	26	0
IB 5	16,8	12,7-18,4	3,5	2,9-4,8	4,8	3,2-5,8	18	69	13	0
CAFE 1	13,5	10,9-20,1	4,1	3,2-5,3	3,3	2,7-4,7	18	62	20	0
CAFE 2	14,5	11,7-18,4	3,8	2,7-4,9	3,8	2,4-4,9	0	44	50	6
CAFE 3	14,4	9,4-21,2	2,6	3,5-5,5	5,5	2,0-3,7	92	5	3	0
CAFE 4	16,4	12,4-20,1	4,1	3,1-5,2	4,0	2,7-5,8	19	68	13	0
IT 1	14,3	11,7-18,4	4,7	3,4-5,4	3,0	2,1-4,2	11	75	14	0
IT 2	14,8	13,4-19,4	3,8	3,0-4,8	3,9	2,2-4,8	7	79	3	11
IT 4	13,7	10,4-18,4	3,5	2,8-4,7	3,9	2,4-4,7	21	78	1	0
IT 5	12,8	9,8-17,2	4,5	3,3-5,6	2,8	1,8-3,8	13	47	40	0
BAU 1	11,6	12,7-16,8	4,1	2,9-5,3	2,8	2,2-3,7	0	100	0	0
BAU 2	14,7	10,8-19,4	3,6	2,4-4,7	4,1	2,5-5,2	25	67	1	7
BAU 3	15,4	12,5-20,6	3,6	2,7-4,8	4,3	2,6-5,2	16	69	15	0
BAU 7	16,8	10,3-17,8	3,8	2,6-4,9	4,4	2,1-5,6	9	73	18	0

Tabela 4 - Comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência do formato de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum* oriundos de goiaba

Isolado	Comprimento (μm)		Largura (μm)		Relação (comprimento/Largura)		Formato (%)			
	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude	1	2	3	4
	JAU 1	11,4	10,8-19,6	4,2	3,2-5,7	2,7	2,3-3,9	10	43	47
JAU 2	12,7	9,4-17,6	4,6	3,3-5,6	2,8	2,4-3,7	0	78	22	0
JAU 3	16,4	11,9-18,6	4,1	3,2-5,2	4,0	2,1-5,1	23	67	10	0
JAU 4	14,7	9,7-18,4	4,3	3,4-5,6	3,4	2,2-4,1	12	71	14	3
CR 1	15,7	11,4-19,7	3,8	2,6-4,8	4,1	2,3-5,2	10	69	21	0
CR 3	12,4	10,7-21,3	3,9	2,7-4,7	3,2	2,8-4,4	0	82	18	0
CR 5	14,7	11,5-19,4	3,8	2,5-4,4	3,9	2,4-4,8	11	67	22	0
CR 6	14,1	11,3-18,4	3,5	2,1-4,8	4,0	3,6-5,7	11	74	15	0
TAQ 2	16,4	12,4-18,2	4,2	3,3-5,7	3,9	3,1-4,5	8	69	16	7
TAQ 3	15,2	11,6-19,4	4,1	3,4-5,5	3,7	2,1-4,7	0	59	41	0
TAQ 4	14,2	11,4-17,5	4,5	3,4-5,3	3,2	2,4-4,2	0	84	16	0
TAQ 5	13,8	10,4-17,9	4,2	2,7-4,8	3,3	2,6-4,6	15	64	21	0
MA 1	14,5	11,8-18,1	4,1	3,2-5,6	3,5	2,4-4,7	11	70	19	0
MA 2	15,6	12,4-19,4	3,8	3,1-5,1	4,1	2,7-5,2	0	76	16	8
MA 4	12,8	9,2-11,6	4,1	3,6-5,6	3,1	3,2-4,3	14	62	24	0
MA 5	16,7	11,9-20,3	3,6	2,8-4,9	4,6	3,4-5,2	9	81	10	0
PIR 1	13,1	11,2-18,4	4,3	3,2-5,8	3,0	2,8-4,2	0	57	43	0
PIR 3	13,8	10,1-16,9	4,2	3,1-5,6	3,3	2,7-4,6	11	49	40	0
PIR 2	12,7	11,5-19,4	4,3	3,4-5,9	3,0	2,4-4,1	17	83	0	0
PIR 4	16,7	12,3-18,9	3,7	3,1-4,8	4,5	3,4-4,9	12	77	11	0
BR 3	13,2	11,4-18,4	4,5	3,3-5,9	2,9	2,3-4,7	21	72	7	0
BR 4	14,8	10,5-17,9	4,9	3,6-6,1	3,0	2,7-5,2	0	68	28	4
BR 5	15,8	11,4-17,1	4,1	3,2-5,7	3,9	2,5-4,9	13	67	20	0
BR 6	14,3	10,1-18,7	4,2	2,7-4,8	3,4	3,1-5,3	24	69	7	0
CAM 1	13,5	10,9-17,4	3,7	2,7-4,4	3,6	3,1-4,8	12	83	5	0
CAM 2	14,7	11,2-18,2	3,9	2,5-4,8	3,8	3,3-4,7	0	81	19	0

2.3.3 Caracterização molecular

A quantidade e a pureza do DNA genômico obtido da extração dos 54 isolados de *Colletotrichum* foi satisfatória para a realização da PCR. As concentrações de DNA obtidos dos isolados apresentaram rendimento médio de 120,62 ng/μl com razão entre as leituras das absorbâncias 260/280 entre 1,84 e 1,92. Segundo Romano (1998), a pureza ideal deve estar entre 1,8 a 2,0. Como visto anteriormente, todas as amostras apresentaram valores entre essa faixa, indicando dessa forma, que o DNA extraído dos isolados apresentaram qualidade satisfatória para a realização da PCR.

Os resultados referentes às reações da PCR, para os isolados de *Colletotrichum*, encontram-se disponíveis na Tabela 5.

Todos os 54 isolados foram identificados molecularmente, utilizando os pares de oligonucleotídeos CaInt2/ITS4 ou CgInt/ITS4, específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente.

O par de oligonucleotídeo CaInt2 e ITS4, específico para *C. acutatum*, amplificou um fragmento de 490 pb para os isolados MIR 1, MIR 3 e CAFE 3, além do isolado padrão de *C. acutatum* (Col 35) (Tabela 5 e Figura 3).

A identificação molecular dos isolados MIR 1, MIR 3 e CAFE 3, confirmaram os dados obtidos na caracterização cultural e morfológica para esses isolados. Como foram observados nos itens 4.1 e 4.2, os isolados apresentaram colônias de coloração salmão, com o bordo branco, reverso salmão e velocidade de crescimento micelial menor quando comparado aos demais isolados. Os conídios apresentaram formato reto, fusiforme contendo os ápices afilados, variando de 13,9 a 14,8 μm de comprimento por 2,6 a 2,9 μm de largura. Todas as características anteriormente mencionadas, além da identificação molecular, encontram-se de acordo com o padrão descrito para *C. acutatum* por alguns autores (SUTTON, 1992, TOZZE JÚNIOR, 2007, VINNIERE, 2004).

Ao utilizar o par de oligonucleotídeo CgInt e ITS4, específico para *C. gloeosporioides*, verificou-se a amplificação de um fragmento de 450 pb para a maioria dos isolados (AND 1, AND 2, AND 3, AND 4, PR 1, PR 2, PR 3, PR 4, MIR 2, MIR 4, IB 1, IB 2, IB 3, IB 5, CAFE 1, CAFE 2, CAFE 4, IT 1, IT 2, IT 4, IT 5, BAU 1, BAU 2, BAU 3, BAU 7, JAU 1, JAU 2, JAU 3, JAU 4, TAQ 2, TAQ 3, TAQ 4, TAQ 5, MA 1, MA 2, MA 4, MA 5, PIR 1, PIR 2, PIR 3,

PIR 4 BR 3, BR 4, BR 5, BR 6, CR 1, CR 3, CR 5, CR 7, CAM 1, CAM 2), identificando-os, dessa forma, como sendo *C. gloeosporioides* (Tabela 5 e Figura 4).

Os isolados AND 1, AND 2, AND 3, PR 2, PR 3 PR 4, MIR 2, MIR 4, IB 2, IB 5, CAFE 1, CAFE 4, IT 1, IT 5, BAU 7, JAU 2, JAU 3, JAU 4, TAQ 2, TAQ 3, TAQ 4, TAQ 5, MA 1, MA 2, MA 4, MA 5, PIR 1, PIR 2, PIR 3, PIR 4 BR 3, BR 4, BR 5, BR 6, puderam ser identificados tanto por características culturais (cor da colônia e velocidade do crescimento micelial) e morfológicas (morfometria dos conídios), quanto por técnica molecular (PCR), como sendo *C. gloeosporioides*.

Diferentemente dos demais isolados, um grupo (AND 4, PR 1, IB 1, IB 3, CAFE 2, IT 2, IT 4, BAU 1, BAU 2, BAU 3, JAU 1, CR 1, CR 3, CR 5, CR 6, CAM 1 e CAM 2) não pôde ser identificado com base na morfometria dos seus conídios, visto que as dimensões encontradas poderiam ser atribuídas tanto para *C. gloeosporioides* quanto para *C. acutatum*. Porém, ao realizar a PCR com oligonucleotídeos específicos, os isolados foram identificados como sendo *C. gloeosporioides*. Diante desse fato, constatou-se que a morfometria de conídios não representou uma ferramenta confiável para identificação entre essas duas espécies associadas à antracnose da goiaba.

De forma semelhante, Tozze Júnior (2007) ao caracterizar isolados de *Colletotrichum* provenientes de pimentão, verificou, em alguns isolados, a predominância de conídios com formato típico ao descrito para *C. gloeosporioides*, porém com dimensões intermediárias entre *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Após realização de uma PCR, constatou-se que tais isolados pertenciam a espécie *C. acutatum*. Assim o autor também concluiu que a morfologia dos conídios não foi um critério útil para identificação específica desses isolados.

Bueno (2005), estudando isolados de *Colletotrichum* oriundos de pimenta, pimentão e jiló, notou que tais isolados apresentavam características de *C. gloeosporioides* enquanto que a identificação molecular revelava serem *C. acutatum*. Diante disso, a autora discutiu sobre a falta de consistência das características morfológicas na diferenciação entre *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Devemos levar em consideração que uma espécie fúngica é representada por populações de biótipos, e tendo em vista que estes podem não ter a mesma constituição genética, ou seja, encontrem-se em condição heterozigótica para um dado caráter, possivelmente ocorrerá a segregação de biótipos de comportamento variável, de acordo com o ambiente de cultivo da

espécie. Diante dessas influências ambientais que atuam sobre a estabilidade das características morfológicas, tais critérios nem sempre são adequados para a diferenciação confiável entre espécies de *Colletotrichum* (COUTO; MENEZES, 2004, TOZZE JÚNIOR, 2007, ANDRADE et al., 2007; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

Baseado nesses fatos, várias técnicas moleculares, ao longo das últimas décadas, têm sido utilizadas com sucesso para complementar a identificação entre as espécies. Entre as técnicas utilizadas, a PCR tem se tornado ferramenta primordial na identificação de espécies de *Colletotrichum*.

Tabela 5 - Identificação das espécies de *Colletotrichum* com oligonucleotídeos específicos

Isolado	Oligonucleotídeos		Espécie	Isolado	Oligonucleotídeos		Espécie
	CaInt2	CgInt			CaInt2	CgInt	
AND 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	JAU 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
AND 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	JAU 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
AND 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	JAU 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
AND 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	JAU 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
MIR 1	+	-	<i>C. acutatum</i>	CAM 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
MIR 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	CAM 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
MIR 3	+	-	<i>C. acutatum</i>	TAQ 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
MIR 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	TAQ 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
CAFE 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	TAQ 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
CAFE 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	TAQ 5	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
CAFE 3	+	-	<i>C. acutatum</i>	CR 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
CAFE 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	CR 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
BAU 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	CR 5	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
BAU 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	CR 6	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
BAU 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	MA 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
BAU 7	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	MA 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
PR 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	MA 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
PR 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	MA 5	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
PR 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	PIR 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
PR 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	PIR 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
IT 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	PIR 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
IT 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	PIR 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
IT 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	BR 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
IT 5	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	BR 4	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
IB 1	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	BR 5	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
IB 2	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	BR 6	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>
IB 3	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	Col 35*	+	-	<i>C. acutatum</i>
IB 5	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>	Col 48*	-	+	<i>C. gloeosporioides</i>

Col 35- isolado padrão de *C. acutatum*; Col 48- isolado padrão de *C. gloeosporioides* (TOZZE JUNIOR, 2007)

+ reação positiva; - reação negativa

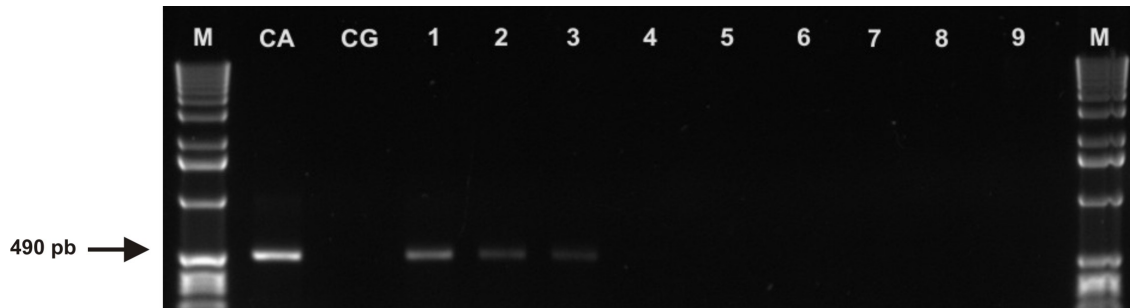


Figura 3 - Fragmentos amplificados pela PCR utilizando os oligonucleotídeos CaInt2 e ITS4 (*C. acutatum*), observados em gel de agarose 1%. Amostras: M (marcador molecular 1 kb), Col 35 (isolado padrão de *C. acutatum*), Col 48 (isolado padrão de *C. gloeosporioides*), 1 (isolado MIR 1), 2 (isolado MIR 3), 3 (isolado CAFE 3), 4 (isolado AND 1), 5 (isolado CAM 1), 6 (isolado IT 2), 7 (isolado BR 4), 8 (isolado PR 1), 9 (isolado CR 3)

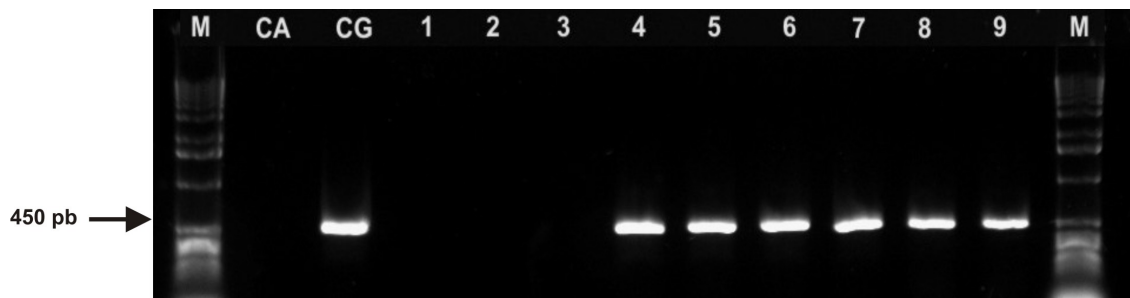


Figura 4 - Fragmentos amplificados pela PCR utilizando os oligonucleotídeos CgInt e ITS4 (*C. acutatum*), observados em gel de agarose 1%. Amostras: M (marcador molecular 1 kb), Col 35 (isolado padrão de *C. acutatum*), Col 48 (isolado padrão de *C. gloeosporioides*), 1 (isolado MIR 1), 2 (isolado MIR 3), 3 (isolado CAFE 3), 4 (isolado AND 1), 5 (isolado CAM 1), 6 (isolado IT 2), 7 (isolado BR 4), 8 (isolado PR 1), 9 (isolado CR 3)

Baseado nas características culturais, morfológicas e moleculares os isolados puderam ser identificados. A partir das identificações pôde-se verificar a distribuição das espécies no Estado de São Paulo.

Grande parte dos isolados (94%) foi identificada como sendo *C. gloeosporioides*. Essa espécie foi identificada em todas as regiões amostradas do Estado de São Paulo. Por outro lado, apenas 3 isolados (6%) foram identificados como pertencentes a *C. acutatum*. Essa espécie foi

contatada nos municípios de Mirandópolis, Andradina (região noroeste) e Cafelândia (região centro oeste).

Muito embora sejam relatadas duas espécies capazes de infectar e colonizar os frutos de goiabeira, observou-se a ocorrência predominante, no Estado de São Paulo, de *C. gloeosporioides* em relação a *C. acutatum*.

2.3.4 Caracterização patogênica

Baseando-se nas caracterizações culturais, morfológicas e moleculares, foram selecionados alguns isolados para a condução desse experimento.

Tomando-se como referência os valores médios das áreas lesionadas dos frutos, três grupos distintos de severidade puderam ser obtidos (Tabela 6).

O primeiro grupo reuniu os isolados que proporcionaram maior severidade. Compuseram esse grupo os isolados AND 1, MIR 3, PR 1 e MIR 1, cujas áreas das lesões variaram de 22 a 25,1cm². No segundo grupo foram reunidos os isolados CAFE 3, IB 1, TAQ 5, MA 2, CAFE 1, IT 4 e CR 3. Esse grupo proporcionou severidade intermediária, apresentando valores médios das áreas lesionadas variando de 9,1 a 12,8 cm². Por fim o terceiro grupo reuniu os isolados que proporcionaram menor severidade. Os isolados BAU 1, PIR 1, CAM 2, JAU 2 e BR 4 fizeram parte desse grupo e os valores médios das áreas lesionadas variaram entre 4 a 5,5 cm².

Analisando os dados das áreas lesionadas, verificou-se haver correspondência entre local de origem dos isolados e severidade da doença (Figura 6). Os isolados da região A pertencem aos municípios de Andradina, Mirandópolis e Presidente Prudente. Isolados dessa região proporcionaram os maiores valores de severidade da doença, apresentando os maiores valores de áreas lesionadas nos frutos. Na região B, foram obtidos os isolados dos municípios de Cafelândia, Ibirá, Taquaritinga, Monte Alto, Itajú e Cândido Rodrigues. Isolados dessa região proporcionaram severidade intermediária da doença nos frutos. Os isolados da região C, provenientes dos municípios de Bauru, Piracicaba, Campinas, e Jaú, proporcionaram os menores valores de severidade da doença, apresentando assim baixa severidade da doença.

Os valores médios das áreas lesionadas dos frutos não permitiram verificar diferenças que pudessem separar e agrupar os isolados de *C. acutatum* dos isolados de *C. gloeosporioides*.

Peres (2002) ao caracterizar isolados de *Colletotrichum* afetando diferentes fruteiras, notou que goiabas lesionadas por *C. gloeosporioides* apresentaram maior diâmetro da lesão quando comparado às lesionadas por *C. acutatum*. Contudo não houve diferenças estatísticas entre os valores obtidos. Entretanto, Soares (2008), ao estudar a colonização de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em goiabas “kumagai”, também verificou que as lesões causadas tanto por *C. acutatum* quanto por *C. gloeosporioides* não diferiram estatisticamente entre si, apresentando comportamentos semelhantes quanto à severidade da doença.

Foi observado ainda que os isolados de *C. acutatum* promoveram o surgimento de lesões claras contendo massa conidial salmão e mais abundante na superfície dos frutos, ao passo que os isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram lesões mais escuras, contendo esporulação mais clara e menos abundante na superfície do fruto (Figura 5).

O período de incubação variou de 4 a 8 dias, enquanto o período de latência ocorreu entre 5 e 11 dias (Tabela 6). Os isolados de *C. acutatum* apresentaram os menores períodos de incubação e latência, enquanto que os maiores períodos foram constatados para os isolados de *C. gloeosporioides*.

Para determinar a agressividade de um organismo, pode-se utilizar seu período de latência, que é definido como o período decorrido entre a inoculação e o aparecimento de estruturas reprodutivas do patógeno. Esse período corresponde ao tempo utilizado pelo patógeno nos processos de infecção, colonização e reprodução. Em termos epidemiológicos esse período representa o tempo entre gerações da espécie patogênica. Assim quanto maior o tempo decorrido entre a inoculação e a reprodução, menor o número de gerações produzidas por ciclo do hospedeiro. O raciocínio inverso também é válido (AMORIM, 1995).

Como os isolados de *C. acutatum* apresentaram menor período de latência, tudo indica que maior será o número de gerações do patógeno por ciclo do hospedeiro e maior será a velocidade da epidemia, quando comparados aos isolados de *C. gloeosporioides*.

Em relação à esporulação, os isolados de *C. acutatum* produziram uma quantidade de esporos superior a de *C. gloeosporioides*, variando entre e $35,8 \times 10^6$ a $37,3 \times 10^6$ conídios/cm².

Diante dos fatos acima citados, pode-se concluir que os isolados de *C. acutatum*, de modo geral, apresentaram maior agressividade quando comparados aos isolados de *C. gloeosporioides*.

Resultado semelhante foi obtido por Tozze Júnior (2007). Esse autor constatou que isolados de *C. acutatum*, provenientes de pimentão, foram mais agressivos, fato evidenciado pelos curtos períodos de latência, alta esporulação, e capacidade de promover sintomas tanto em frutos maduros como nos verdes. Contudo o autor discutiu que a alta agressividade poderia ser responsável pela predominância da espécie nos campos produtores da cultura no país. Fato oposto foi verificado neste trabalho. Apesar dos isolados de *C. acutatum* serem mais agressivos, houve predominância de *C. gloeosporioides* nas regiões amostradas.

Tabela 6 - Área média da lesão (cm²), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos x 10⁶)/cm² da lesão]

Isolado	Espécie	Área da lesão (cm ²)	PI	PL	Esporulação (10 ⁶)
AND 1	<i>C. gloeosporioides</i>	25,1 a*	6	7	19,9 ab*
MIR 3	<i>C. acutatum</i>	24,1 a	4	5	37,3 a
PR 1	<i>C. gloeosporioides</i>	22,3 a	6	7	14,7 bc
MIR 1	<i>C. acutatum</i>	22,0 a	5	6	36,5 a
CAFE 3	<i>C. acutatum</i>	12,8 b	5	6	35,8 a
IB 1	<i>C. gloeosporioides</i>	12,2 b	7	9	10,3 bcd
TAQ 5	<i>C. gloeosporioides</i>	11,9 b	6	7	12,5 bc
MA 2	<i>C. gloeosporioides</i>	10,4 b	6	8	9,1 bcde
CAFE 1	<i>C. gloeosporioides</i>	10,0 b	7	8	7,3 bcdef
IT 4	<i>C. gloeosporioides</i>	9,7 b	7	8	6,8 cdef
CR 3	<i>C. gloeosporioides</i>	9,1 b	6	8	5,6 cdef
BAU 1	<i>C. gloeosporioides</i>	5,5 c	6	8	3,3 cdef
PIR 1	<i>C. gloeosporioides</i>	5,1 c	7	8	3,8 cdef
CAM 2	<i>C. gloeosporioides</i>	4,3 c	7	9	1,2 def
JAU 2	<i>C. gloeosporioides</i>	4,2 c	7	11	0,3 f
BR 4	<i>C. gloeosporioides</i>	4,0 c	8	11	0,6 ef
CV (%)		11,5		35,7	

* Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de tukey ao nível de 5% de significância.

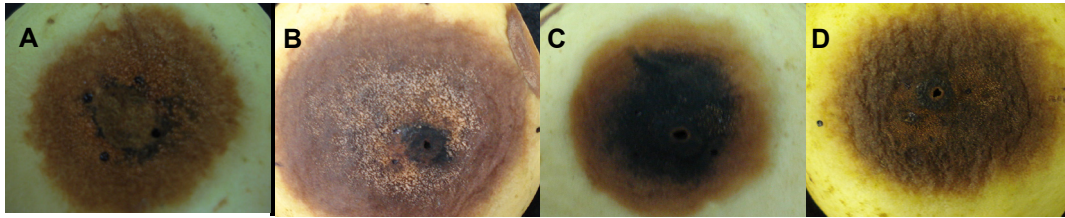


Figura 5 - Lesões promovidas por diferentes espécies de *Colletotrichum* em goiabas, após 14 dias da inoculação: *C. acutatum* - MIR 1 (A) e MIR 3 (B), *C. gloeosporioides* - JAU 1 (C) e BR 4 (D)



Figura 6 - Agrupamento dos isolados de *Colletotrichum* em função da severidade da doença em frutos de goiabeira

2.3.5 Atividade enzimática

Todos isolados apresentaram atividade enzimática hidrolítica extracelular para degradação de amido, celulose, proteínas, lipídios e pectina. Houve diferença estatística na produção de enzimas entre isolados, os quais foram agrupados de acordo com a área de degradação dos substratos, nos respectivos meios específicos (Tabela 7).

Lima Filho, Oliveira e Menezes (2003) observaram que os isolados de *Colletotrichum* de diferentes fruteiras, apresentaram atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica, que

variaram estatisticamente entre os isolados. Couto, Menezes e Coelho (2002) obtiveram resultados semelhantes com *C. musae* da banana. Assis (2001) observou diferença entre isolados de *C. gloeosporioides*, da manga, quanto à atividade amilolítica e proteolítica, mas não para a celulolítica.

Em relação à atividade amilolítica, os isolados puderam ser diferenciados em seis grupos. Os isolados de Andradina, Presidente Prudente e Mirandópolis foram bons produtores de amilases, apresentando as maiores áreas de degradação do amido. Por outro lado os isolados de Brotas, Jaú e Campinas foram fracos produtores de amilases, proporcionando as menores áreas de degradação de amido. Não foi possível distinguir as espécies baseadas na sua atividade aminolítica.

De acordo com Dianese (1990), as amilases são comuns em fungos, permitindo a hidrólise de amido, mas, pouco se sabe sobre a sua importância na patogênese. Fungos podem utilizar o amido como fonte de energia para o crescimento e esporulação (GRIFFIN, 1994). No entanto, a produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida (NWUFO; FAJOLA, 1988).

Considerando a atividade pectinolítica, os isolados foram diferenciados em 13 grupos. Os isolados de Andradina e Brotas apresentaram-se, respectivamente, como sendo bons e fracos produtores de pectinase. Também não foi possível reunir os isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em grupos diferentes.

Quanto à atividade lipolítica, os isolados foram reunidos em oito grupos distintos. Houve grande variação na produção de lipase pelos isolados. Os isolados de Andradina e o isolado MIR 3 foram os maiores produtores de lipases, ao passo que os isolados BR 4, BR 5, BR 6, JAU 3 e JAU 4 foram os piores produtores de lipases. Não houve diferenças significativas que pudessem diferenciar *C. acutatum* de *C. gloeosporioides*, baseados na produção de lipases.

De acordo com Hankin e Anagnostakis (1975), o halo opaco, que surge com a degradação de lipídios no meio de cultura, é proveniente da formação de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da enzima ou pela completa degradação dos sais lipídicos em meios contendo sorbitol monolaurato (Tween 20) como substrato lipídico. Segundo Kolattukudy (1985), existem evidências de que a cutinase, uma lipase capaz de degradar a cutina, esteja diretamente envolvida na penetração do fungo pela cutícula, desempenhando papel importante na patogenicidade.

Para a atividade proteolítica, os isolados se diferenciaram em seis grupos. Os isolados de Monte Alto (MA) produziram maior quantidade de proteases, enquanto que os isolados de Cândido Rodrigues (CR) produziram quantidade menor.

Conforme Hancock e Millar (1965), a atividade patogênica de alguns fungos está diretamente relacionada com sua capacidade de produzir enzimas degradadoras da parede celular. A patogenicidade de *C. musae* em frutos de caju, manga e mamão, poderia estar correlacionado com a alta produção de protease demonstrada por este fungo, sendo possível diferenciá-lo dos demais isolados testados.

Por fim, quanto à atividade celulolítica, detectada pela presença de halo claro em torno das colônias, destacaram-se os isolados de *C. acutatum* (MIR 1, MIR 3 e CAFE 3), que apresentaram maior atividade celulolítica, quando comparados com os demais isolados de *C. gloeosporioides*. Este fato pode ser de grande valia na taxonomia química de fungos, tendo em vista que a maior capacidade na produção de celulase foi mais evidente nos isolados de *C. acutatum*.

Ao analisar os dados da caracterização enzimática e patogênica, observou-se correspondência entre os dados analisados. Diante desse fato, os dados foram correlacionados por meio dos coeficientes de Pearson, utilizando-se os resultados dos isolados submetidos à caracterização patogênica (AND 1, MIR 3, PR 1, MIR 1, CAFE 3, IB 1, TAQ 5, MA 2, CAFE 1, IT 4, CR 3, BAU 1, PIR 1, CAM 2, JAU 2, BR 4).

A área de degradação do amido, lipídio e pectina correlacionaram positivamente com a agressividade, cujos respectivos coeficientes de correlação (r) foram de 0,95798; 0,99177 e 0,93566. Contudo, as áreas de degradação da celulose e proteína não apresentaram boa correlação com a agressividade, apresentando r de 0,54093 e 0,23867, respectivamente (Figura 7).

Os ajustes das equações de regressão para os isolados de *Colletotrichum* foram significativos, demonstrando o efeito linear da área do halo de degradação de amido, lipídio e pectina sobre a área lesionada dos frutos (Figura 7). À medida que houve incremento da área do halo de degradação de amido, lipídio e pectina ocorreu o aumento da área lesionada dos frutos.

De maneira semelhante, Marchi, Borges e Mizubuti (2006) também encontraram correlação positiva, $r = 0,963$ entre a severidade da doença e a atividade a pectinolítica de isolados de *Alternaria solani* em tomateiro. Para isso dos 17 isolados do fungo que produziram

halos de degradação de amido, 9 foram coletados de batateira, 6 de tomateiro e 2 de plantas de berinjela. Os isolados de batateira apresentaram maior habilidade para hidrolisar amido do que os isolados de tomateiro e berinjela. A maior produção de enzimas amilolíticas pelos isolados de batateira, promoveram maiores severidades nas plantas de batateira. Tais constatações podem ser indicativos do possível envolvimento de enzimas amilases na interação *A. solani*-batateira.

Da mesma forma, Couto, Menezes e Coelho (2002) também encontraram correlação positiva, r (Pearson) = 0,8072, entre a atividade amilolítica e o tamanho das lesões causadas pelos isolados de *C. musae*. Os isolados que produziram maiores quantidades de enzimas amilolíticas foram os que promoveram maiores lesões em bananas.

Por outro lado, Almeida e Coêlho (2007), verificaram que os halos de degradação de amido, lipídio, proteína e celulose, proporcionados por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, não se correlacionaram com agressividade em frutos de maracujazeiro, cujos respectivos coeficientes de correlação (r) foram: 0,271, 0,266, 0,292, 0,210, e 0,301. Como os valores de r foram baixos, não foi possível desenvolver modelos matemáticos que explicassem o tamanho de lesão nos frutos, em função do diâmetro do halo de degradação dos substratos em cada um dos meios específicos. Os autores sugeriram ainda que o alto coeficiente de variação (48%), obtidos da severidade dos frutos, pode ter contribuído para essa correlação negativa.

Tabela 7 - Atividade amilolítica, pectinolítica, lipolítica, proteolítica e celulolítica dos isolados de *Colletotrichum*, expressa pelo halo da degradação dos substratos (cm²)

(continua)

Isolado	Atividade				
	Amilolítica	Pectinolítica	Lipolítica	Proteolítica	Celulolítica
AND 1	17,13 a *	3,58 a	25,25 a	13,50 b	1,45 c
AND 2	17,00 a	3,53 a	24,25 a	13,75 b	1,40 c
AND 3	16,75 a	3,58 a	25,00 a	13,25 c	1,50 c
AND 4	16,88 a	3,63 a	24,75 a	13,75 b	1,33 d
PR 1	16,70 a	3,20 b	23,75 b	13,75 b	1,35 d
PR 2	17,00 a	3,13 c	23,25 b	13,25 c	1,35 d
PR 3	16,50 a	3,30 b	23,75 b	13,75 b	1,53 c
PR 4	16,75 a	3,23 b	23,25 b	13,25 c	1,50 c
MIR 1	16,00 a	3,08 c	23,00 b	13,00 c	2,50 a
MIR 2	16,00 a	3,15 c	22,75 b	12,00 d	1,68 b
MIR 3	17,00 a	3,35 b	24,25 a	12,00 d	2,73 a
MIR 4	16,75 a	3,00 c	22,75 b	11,50 e	1,60 c
IB 1	14,00 b	2,50 e	17,50 d	13,25 c	1,40 c
IB 2	13,88 b	2,38 f	16,75 d	12,75 c	1,50 c
IB 3	13,75 b	2,53 e	17,00 d	13,50 b	1,53 c
IB 5	14,00 b	2,48 e	16,75 d	13,50 b	1,60 c
CAFE 1	12,80 c	2,68 d	16,00 e	12,75 c	1,50 c
CAFE 2	13,00 c	2,73 d	15,67 e	12,75 c	1,40 c
CAFE 3	14,75 b	2,75 d	18,50 c	13,75 b	2,40 a
CAFE 4	12,75 c	2,73 d	16,00 e	12,13 d	1,43 c
IT 1	11,75 d	1,93 h	15,50 e	8,00 g	1,55 c
IT 2	12,00 d	1,95 h	15,75 e	8,50 g	1,70 b
IT 4	11,75 d	2,05 g	15,50 e	8,25 g	1,60 b
IT 5	12,00 d	2,00 g	15,00 e	8,00 g	1,70 b
BAU 1	9,58 e	1,25 j	13,50 f	11,25 e	1,60 b
BAU 2	9,50 e	1,25 j	13,00 f	11,00 e	1,70 b
BAU 3	9,50 e	1,28 j	13,38 f	11,25 e	1,58 b
BAU 7	9,60 e	1,23 j	13,25 f	11,25 e	1,68 b

Tabela 7 - Atividade amilolítica, pectinolítica, lipolítica, proteolítica e celulolítica dos isolados de *Colletotrichum*, expressa pelo halo da degradação dos substratos (cm²)

Isolado	Atividade				
	Amilolítica	Pectinolítica	Lipolítica	Proteolítica	Celulolítica
JAU 1	8,53 f	0,80 m	13,50 f	11,50 e	0,95 e
JAU 2	8,58 f	0,80 m	11,25 g	12,25 e	1,00 e
JAU 3	8,55 f	0,68 m	11,00 h	11,25 e	0,90 e
JAU 4	8,65 f	0,60 m	11,00 h	11,00 e	0,78 f
CR 1	11,33 d	1,83 i	15,00 e	10,25 f	1,60 b
CR 3	11,38 d	1,83 i	15,50 e	10,25 f	1,63 b
CR 5	11,30 d	1,78 i	15,25 e	10,00 f	1,73 b
CR 6	11,20 d	1,85 i	15,25 e	9,75 f	1,48 c
TAQ 2	14,00 b	2,50 e	15,88 e	13,50 b	1,55 c
TAQ 3	13,63 b	2,43 e	16,50 d	13,75 b	1,68 b
TAQ 4	13,50 b	2,55 e	16,75 d	13,75 b	1,65 b
TAQ 5	13,88 b	2,50 e	16,75 d	14,00 b	1,30 d
MA 1	13,00 c	2,28 f	16,00 e	15,25 a	1,53 c
MA 2	13,00 c	2,33 f	16,25 e	15,25 a	1,58 b
MA 4	13,50 b	2,28 f	15,63 e	15,00 a	1,68 b
MA 5	13,00 c	2,43 e	15,50 e	15,00 a	1,65 b
PIR 1	9,18 e	1,10 l	13,25 f	13,00 c	1,53 c
PIR 2	9,25 e	1,10 l	13,00 f	12,50 d	1,50 c
PIR 3	9,18 e	1,13 l	13,25 f	13,00 c	1,45 c
PIR 4	9,18 e	1,18 j	13,50 f	12,88 c	1,40 c
BR 3	8,48 f	0,60 n	13,50 f	11,75 e	1,53 c
BR 4	8,48 f	0,50 n	10,50 h	12,00 d	1,25 d
BR 5	8,43 f	0,58 n	10,25 h	12,00 d	1,50 c
BR 6	8,55 f	0,53 n	10,25 h	11,75 e	1,30 d
CAM 1	8,63 f	1,10 l	11,75 g	12,75 c	1,25 d
CAM 2	8,83 f	1,20 j	12,00 g	13,00 c	1,30 d
CV (%)	5,2	4,5	3,9	5,4	6,2

*Média resultante de quatro repetições; valores acompanhados com mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (p=0,05).

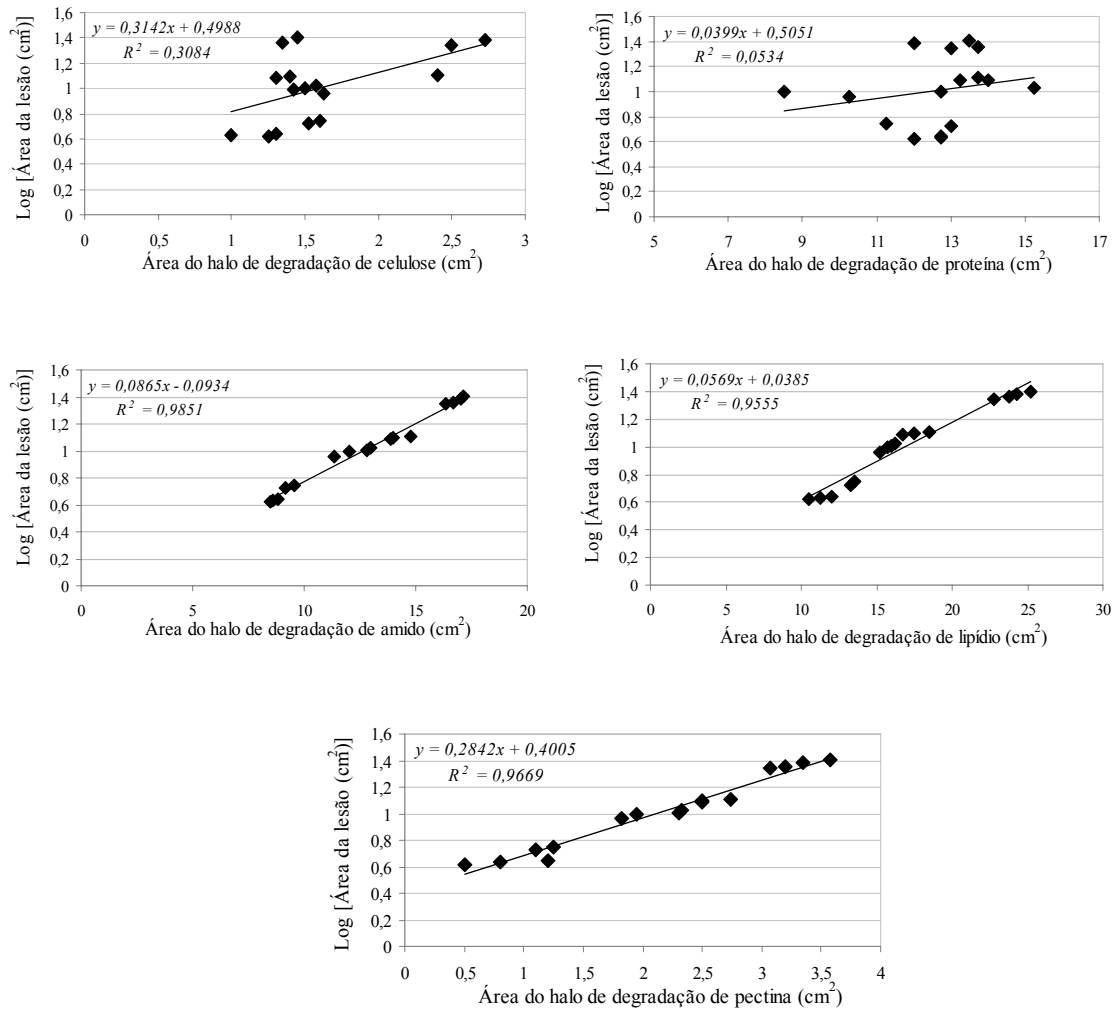


Figura 7- Relação entre a atividade enzimática de *Colletotrichum*, estimada pela área do halo de degradação dos substratos das enzimas (cm²), e a severidade da doença em goiabas (cm²)

3 CONCLUSÕES

- As caracterizações culturais e morfológicas, não proporcionam resultados confiáveis para a identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiabeira.
- *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* foram constatado como sendo os agentes causais da antracnose da goiaba nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo.
- *Colletotrichum gloeosporioides* é a espécie mais distribuída e frequente, associadas à antracnose, nas principais regiões produtoras de goiaba do Estado de São Paulo.
- *Colletotrichum acutatum* diferencia-se de *Colletotrichum gloeosporioides* por proporcionar menores períodos de incubação e latência, além de maior esporulação em frutos de goiaba.
- É possível diferenciar *Colletotrichum acutatum* de *Colletotrichum gloeosporioides* pela maior atividade celulolítica *in vitro* do primeiro.
- A severidade da antracnose em goiabas está correlacionada com as atividades *in vitro* da amilase, lipase e pectinase.

REFERÊNCIAS

ADASKAVEG, J.E.; FORSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed). ***Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000. p. 317-336.

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. 579-587, 2003.

AINSWORTH, G.C. **Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi**. 6th ed. Surrey: Kew, 1971. 663 p.

ALMEIDA, L.C.; COELHO, R.S.B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 318-328, 2007.

AMORIM, L. Colonização e reprodução. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, cap. 16, p. 309-324.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

ARX, J.A. Von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. **Phytopathologische Zeitschrift**. Berlin, v. 29, n. 4, p. 413-468, 1957.

ASSIS, T.C. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose da mangueira, quanto à utilização de carboidratos, patogenicidade, produção de enzimas e análise de RAPD**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2001.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.

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

BINYAMINI, J.P.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 62, p. 592-594, 1972.

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. **Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas**. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

CHOODBURY, M.M. **Goiaba: pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 2001. 45 p. (Frutas do Brasil, 19).

COURSEY, D.G. Post-harvest losses in perishable foods of the developing world. In: MORRIS, L. (Ed.). **Post-harvest physiology and crop preservation**. New York: Plenum, 1983. p. 485-513.

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

COUTO, E.F.; MENEZES, M.; COÊLHO, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 260-266, 2002.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 1, p. 19-21, 1983.

DIANESE, J.C. **Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta-patógeno**. Brasília: Ed. UnB, 1990. 139 p.

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

DURIGAN, J.F. Colheita, conservação e embalagens. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA GOIABEIRA, 1995, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 149-158.

FAVERET, P.F., ORNOND, J.; G.P., PAULA, S.R. L. Oportunidade de negócios para frutas In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza. **Fruticultura: agronegócio do 3º milênio: trabalhos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. 1 CD-ROM.

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. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 89-95, 2001.

_____. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 4, p. 325-330, 2002.

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Goiaba. In _____. **Agrianual 2008: anuário de agricultura brasileira**. São Paulo, 2008. p. 335-338.

FRANCISCO, V.L.F.S.; BAPTISTELLA, C.S.L.; AMARO, A.A. **A cultura da goiaba em São Paulo**. 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>> Acesso em: 23 ago. 2009.

FREEMAN, S.; KATAN, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 5, p. 516-521, 1997.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R.J. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 501-504, 1995.

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

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.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 23, n. 1, p. 4-10, 1997.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1994. 457 p.

GUERBER, J.C.; CORRELL, J. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. **Mycologia**. Lancaster, v. 93, p. 216-229, 2001.

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

HANCOCK, J.G.; MILLAR, R.L. Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern anthracnose, springs black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfalfa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, p. 356-360, 1965.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 67, p. 597-607, 1975.

HOWARD, C.M.; ALBREGTS, E.E. Anthracnose of strawberry fruit caused by *Glomerella cingulata* in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.68, p. 824-825, 1984.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Estatísticas**. Disponível em:
<http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> Acesso em: 01 ago. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática produção agrícola**. Disponível em:
<www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric>. Acesso em: 10 maio 2009.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEEGER, M.J.; PUMBLEY, R.A. *Colletotrichum* species on tropical fruits. **Plant Pathology**, London, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

JOHNSON, G.I.; COATES, L.M.. Postharvest disease and pest control in tropical fruit. In: CHAMP, B.R.; HIGHLEY, E. (Ed.). **Postharvest technology for agricultural products in Vietnam**. Camberra: ACIAR, 1995. p. 100-126.

JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, H. Controle das doenças da goiabeira In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed.) **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. v. 2, p. 1247-1277.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.; PEREIRA, M.; LIMA, M.M.; CHAVES, R.C. **Doenças da goiabeira no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 31 p. (Circular Técnica, 15).

KADER, A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. 3rd ed. Riverside: UC Regents, 2002. 535 p.

KAGIWATA, T. An anthracnose of passion fruit caused by *Glomerella cingulata*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 31, p. 90-100, 1986.

KOLATTUKUDY, P.E. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 223- 250, 1985.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER, F.W.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p. 659-664, 2001.

LIM, T.K.; MANICOM, B.Q. Diseases of guava. In: PLOETZ, R.C. **Diseases of tropical fruit crops**. Wallingford: University of Florida, 2003. p. 275 -289.

LIMA FILHO, R.M.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 620-625, 2003.

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

MANNERS, J.M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, 1992. p. 250- 268.

MARCHI, C.E.; BORGES, M.F.; MIZUBUTI, E.S.G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 23, n. 4, p. 345-352, 2006.

MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização patogênica, isoenzimática e sensibilidade a benomyl de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de hortaliças solanáceas. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27., 2004, Campinas. **Resumos...** Botucatu: Grupo Paulista de Fitopatologia, 2004. Resumo 73.

MELLO, M.B.A.; MARTINS, B.A.B.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização cultural e sensibilidade a benomyl de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de hortaliças solanáceas. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 26., 2003, Araras. **Resumos...** Botucatu: Grupo Paulista de Fitopatologia, 2003. Resumo 56.

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

MENEZES, M.; HANLIN, R.T. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from northeast Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 228-236, 1996.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98. n. 1/3, p. 137-144, 1992.

MORAES, S.R.G. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros**. 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N. STAPPEN, J.V.; MAREITE, H. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. **Plant Pathology**, London, v. 47, p. 641-648, 1998.

NWUFO, M.I.; FAJOLA, A.O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corn rots of *Colocasia esculenta*. **Acta Microbiologica Hungarica**, v. 35, p. 371-378, 1988.

PEREIRA, F.M. **Cultura da goiabeira**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 47 p.

PEREIRA, F.M.; MARTINEZ JÚNIOR, M. **Goiabas para industrialização**. Jaboticabal: Ed. Legis Summa, 1986. 142 p.

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

PICCININ, E; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 401-409.

PONTE, J.J. **Clínica de doenças de plantas**. Fortaleza: Edições UFC, 1996. 872 p.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. ***Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. St. Paul: APS Press, 2000. 393 p.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 163-177.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSE, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGARTNER, J. G.; SILVA, J.R. da; NAKAMURA, K.I.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA, 1996. 64 p.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em: <http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex>. Acesso em: 18 jun. 2009.

SEPIAH, PLOETZ, R.C.; COOKE, A.W. Disease of carambola. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Homestead: CABI Publ., 2003. chap. 6, p.145-162.

SHABI, E.; KATAN, T.; GERA, H.; ELISHA, S. Taxonomic determination of pathogenic *Colletotrichum gloeosporioides* of almond, anemone and avocado according to fungicidesensitivity. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 21, p. 130-131, 1994.

SHI, Y.; CORRELL, J. C.; GUERBER, J. C.; ROM, C. R. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 692-696, 1996.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 807-813, 1997.

SILVEIRA, N.S.S.; MICHEREFF, D.J.; SILVA, I.L.S.S.; OLIVEIRA, S.M.A. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. **Caatinga**, Mossoró, v. 18, n. 5, p. 283-299, 2005.

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

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

SOARES, A.R. **Infecção e colonização de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

SOUSA, A.C.B. **Análise da diversidade genética através de marcadores moleculares e características citomorfológicas em *Colletotrichum gloeosporioides***. 2004. 85 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 265-281, 1992.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 650-655, 1996.

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

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

TEIXEIRA, H. **Variabilidade de *Acremonium strictum* e sua transmissibilidade e efeitos em sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 127 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

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

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. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27., 2004, Campinas.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

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

VILAS BOAS, E.V.B. Frutos climatéricos e não-climatéricos: implicações na pós-colheita. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS: PATOLOGIA PÓS-COLHEITA DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2., 2002, Lavras. **Palestras expandidas...** Lavras: UFLA; FAEPE, 2002. p. 9-23.

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**, Uppsala, v. 917, 2004. 72 p. Disponível em: <http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902-1__fulltext.pdf>. Acesso em: 12 set. 2009.

WALLER, J.M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum***: biology, pathology and control. Oxon: CAB Int., 1992. p. 167-185.

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

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](#)