

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**

LOURDES REGINA LOPES BATISTA

Caracterização de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose nas culturas do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims *f. flavicarpa* Deg) e da romãzeira (*Punica granatum* L.) na região Nordeste do Brasil.

RIO LARGO

2016

LOURDES REGINA LOPES BATISTA

Caracterização de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose nas culturas do maracujazeiro (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Sims) e da romãzeira (*Punica granatum* L.) na região Nordeste do Brasil.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iraildes Pereira Assunção

RIO LARGO

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

B333c Batista, Lourdes Regina Lopes.
Caracterização de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose nas culturas do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* Deg) e da romazeira (*Punica granatum* L.) na região nordeste do Brasil / Lourdes Regina Lopes Batista. – 2016.
84 f. : il.

Orientadora: Iraildes Pereira Assunção.
Tese (doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2016.

Bibliografia: f. 74-84.

1. *Passiflora edulis*. 2. Maracujá. 3. *Punica granatum*. 4. Romã. 5. Filogenia.
I. Título.

CDU: 634.776.3+634.64

Folha de Aprovação

LOURDES REGINA LOPES BATISTA

Caracterização de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose na cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) na região Nordeste do Brasil.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas e Aprovada em 27 de Abril de 2016.




Prof.ª Dr.ª Iraildes Pereira Assunção, Universidade Federal de Alagoas.
(Orientadora)

Banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª Edna Peixoto da Rocha Amorim, Universidade Federal de Alagoas.



Prof.ª Dr.ª Sarah Jaqueline Cavalcanti da Silva, Universidade Federal de Alagoas.



Dr.ª Liliene Dias do Nascimento Hilário.

Aos meus avós Aminadab Pereira Lopes e Nely Eleuterio Lopes (in Memoriam),

Com todo meu amor

Aos meus pais Pedro Iran Batista e Maria de Fatima Lopes Batista,

Por todo apoio, incentivo e carinho

Meu irmão Pedro Iran Batista Junior,

Sempre confiou em mim

Ao meu noivo Giordano Bruno Medeiros Gonzaga,

Pelo carinho, amor e incentivo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar, iluminar e me dar forças para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A prof^a. Dr^a. Iraildes Assunção, minha orientadora, não só pela importância que teve na condução do trabalho, mas também como conselheira em momentos difíceis.

Aos meus avós, Aminadab e Nocy (in Memoriam), que sem o amor incondicional que me foi oferecido durante toda a minha vida, eu não teria forças para chegar até aqui.

Aos meus amados pais Pedro Iran e Maria de Fatima e irmão Pedro Junior, por toda confiança, apoio e carinho, não só durante esta jornada acadêmica, como também por toda minha vida.

Ao meu amado tio Marcos Lopes, que sempre atuou como um pai, e esteve presente em toda minha trajetória acadêmica, com apoio, conselhos e consolo.

Ao meu amor Giordano Bruno com toda minha gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio neste trabalho.

Aos meus grandes e amados amigos Rodrigo Lamenha, Joelmir José e Eumenes Farias, que me dizem as verdades com frases abertas e são os mais certos das horas incertas.

A prof^a. Dr^a. Edna Peixoto, não só por ser minha fonte de inspiração durante toda trajetória acadêmica, como também pelos valiosos ensinamentos na realização deste trabalho;

A prof^a. Dr^a. Sarah Cavalcanti, pessoa extraordinária, sempre disposta a esclarecer dúvidas com paciência e apoio.

Aos companheiros do Laboratório de Fitopatologia Molecular, principalmente a Janaine Rossane, Frederico Feijó, Aline Marques, Jussara, Mayra Ferro, Jaqueline e Adso Levi por terem sido meus companheiros do começo ao fim deste trabalho, compartilhando ensinamentos, esclarecendo dúvidas e ajudando em todas as etapas desta pesquisa;

Aos meus companheiros de curso Rosangela Lima, Josemildo Verçosa e Emerson Santos, por todo apoio e excelente convivência;

A CAPES e FAPEAL pela concessão da bolsa.

RESUMO

A antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, destaca-se como uma das principais doenças de frutíferas, proporcionando grandes prejuízos na produção mundial. O objetivo desse trabalho foi a identificação das espécies do gênero *Colletotrichum* através da caracterização molecular e morfocultural em frutos de maracujá e romã. Foram obtidos quarenta isolados em frutos de maracujá nos estados de Alagoas e Sergipe, e dez isolados em frutos de romã nos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco. Inicialmente foi realizada a caracterização molecular dos obtidos com base nas sequências do gene gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), com o intuito de avaliar a diversidade genética das espécies presentes nestas culturas. A identificação dos isolados foi confirmada com análise multilocus dos genes GAPDH, β -tubulina (TUB2) e da região ITS-rDNA. A caracterização cultural foi avaliada mediante a coloração e a disposição das colônias, como também pela mensuração do crescimento micelial dos isolados a 25°C. Para caracterização morfológica, foram mensurados comprimento e largura de conídios e apressórios. Foram identificadas cinco espécies de *Colletotrichum* responsáveis por causar antracnose no maracujazeiro amarelo nos estados de Alagoas e Sergipe: *Colletotrichum* sp., *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, e *C. theobromicola*, e três espécies de *Colletotrichum* que afetam a romãzeira nos estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia: *C. theobromicola*, *C. fructicola* e *C. tropicale*. Estas espécies apresentaram maior crescimento micelial em meio BDA sintético quando comparadas aos meios V8, CA e CMA. E o teste de patogenicidade cruzada revelou que as espécies identificadas neste estudo causam lesões em frutos de mamão, tomate, manga e pimentão.

Palavras – chave: *Passiflora edulis*, *Punica granatum* L., filogenia

ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum* fungi of the genus, stands out as one of the major diseases of fruit, providing great losses in world production. The aim of this study was to identify the species of the genus *Colletotrichum* through molecular characterization and Morphocultural in fruits of passion fruit and pomegranate. Were obtained forty isolated on passion fruit in the states of Alagoas and Sergipe, and ten isolated in pomegranate fruits in the states of Alagoas, Bahia and Pernambuco. Initially it performed a molecular characterization of obtained based on the sequences of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH), in order to assess the genetic diversity of species present in these cultures. The identification of the isolates was confirmed with multilocus analysis of GAPDH genes, β -tubulin (TUB2) and ITS-rDNA region. The cultural characteristics was evaluated by the color and layout of the colonies, as well as the measurement of their mycelial growth at 25 ° C. For morphological characterization, they were measured length and width of conidia and appressoria. five species of *Colletotrichum* responsible have been identified to cause anthracnose in yellow passion fruit in the states of Alagoas and Sergipe: *Colletotrichum* sp., *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. fructicola*, and *C. theobromicola*, and three species of *Colletotrichum* affecting the rhombus states of Alagoas, Pernambuco and Bahia: *C. theobromicola*, *C. tropicale* and *C. fructicola*. These species had higher mycelial growth in synthetic medium BDA compared to the V8 means, CA and CMA. And the cross pathogenicity test showed that the species identified in this study cause lesions in papaya fruits, tomato, mango and chili.

Keywords: *Passiflora edulis*, *Punica granatum* L., filogenia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sintomas de antracnose em frutos (A) e folhas de maracujazeiro amarelo (B) e frutos de romãzeira (C).....	31
Figura 2. Frutos de maracujá apresentando sintomas de antracnose após inoculação com disco de inoculo de <i>Colletotrichum</i> spp.....	43
Figura 3. Resultado do teste de patogenicidade mostrando as lesões causadas por <i>Colletotrichum</i> nos frutos. Isolados: R01 (A), R02 (B), R04 (C), R05 (D), R06 (E), R07 (F), R08 (G), R09 (H), R10 (I) e R04 (J).....	43
Figura 4. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com os isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos de maracujazeiro amarelo, pertencentes a três complexos, usando o gene GAPDH.....	45
Figura 5. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de <i>Colletotrichum</i> oriundos de maracujá amarelo do complexo <i>C. gloeosporioides</i> , usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS.....	47
Figura 6. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de <i>Colletotrichum</i> oriundos de maracujá amarelo do complexo <i>C. brevisporum</i> , usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS.	48
Figura 7. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com os isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos de frutos de romã usando o gene GAPDH.	50
Figura 8. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos de frutos de romã do complexo <i>C. gloeosporioides</i> , usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS.	52
Figura 9. Aspecto das colônias dos quatro grupos de isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos em maracujazeiro. Placas 1- Grupo I espécie <i>Colletotrichum</i> sp.(A-Frente, B-Verso); 2- Grupo II espécie <i>C. brevisporum</i> (A-Frente, B- Verso); 3- Grupo III espécie <i>C. theobromicola</i> (A-Frente, B- Verso); 4- Grupo IV espécie <i>C. fructicola</i> e <i>C. cliviae</i> (A-Frente, B- Verso).....	53
Figura 10. Aspecto das colônias dos quatro grupos de isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos em romazeira. Placas 1- Grupo I espécie <i>C. fructicola</i> (A-Frente, B- Verso); 2- Grupo II espécie <i>C. theobromicola</i> . (A-Frente, B- Verso); 3- Grupo III espécie C. tropicale (A-Frente, B- Verso).	56
Figura 11. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos	

semelhantes à espécie <i>C. brevisporum</i> . A-B: apressórios e conídios.	59
Figura 12. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>C. theobromicola</i> . A: conídios e B:apressórios.....	59
Figura 13. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>C. fructicola</i> . B:conídios e A:apressórios.....	60
Figura 14. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>C. cliviae</i> . A: apressórios e B:conídios.	61
Figura 15. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>Colletotrichum</i> sp.. A: apressórios e B:conídios.	61
Figura 16. Formato dos conídios e apressórios observado nos isolados. Conídios semelhantes às espécies de <i>C. fructicola</i> (A) e <i>C. theobromicola</i> (B). Apressórios: clavado (C), irregular (D) e globoso (E).....	63
Figura 17. Médias do crescimento micelial (cm) de espécies de <i>Colletotrichum</i> , em quatro diferentes meios de cultivo, durante sete dias de avaliação.	64
Figura 18. Aspecto das colônias da espécie <i>Colletotrichum</i> sp. em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).....	64
Figura 19. Aspecto das colônias da espécie <i>C. cliviae</i> em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).	65
Figura 20. Aspecto das colônias da espécie <i>C. brevisporum</i> em meios: BDA sintético (frente 1- A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).	65
Figura 21. Aspecto das colônias da espécie <i>C. fructicola</i> em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).	66
Figura 22. Aspecto das colônias da espécie <i>C. theobromicola</i> em meios: BDA sintético (frente 1- A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).....	66
Figura 23. Aspecto das colônias da espécie <i>C. fructicola</i> , isolada de frutos de romã, em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).....	67
Figura 24. Aspecto das colônias da espécie <i>C. theobromicola</i> , isolada de frutos de romã, em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-	

B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).....67

Figura 25. Aspecto das colônias da espécie *C. tropicale*, isolada de frutos de romã, em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D)..... 68

Figura 26. Frutos inoculados com espécies de *Colletotrichum* obtidas de maracujazeiro e romãzeira. (A) Mamão (*Carica papaya* L.), (B) pimentão (*Capsicum Anuum* L.), (C) manga (*Mangifera indica* L.), (D) tomate (*Solanum lycopersicum* L.): 1- *C. fructicola* (isolada romã); 2- *C. theobromicola* (romã); 3- *C. tropicale*; 4- *C. cliviae*; 5- *C. brevisporum*; 6- *Colletotrichum* sp.; 7- *C. fructicola* (isolada de maracujá); 8- *C. theobromicola* (isolado de maracujá). 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedência e ano de coleta dos frutos e folhas de maracujazeiro amarelo e frutos de romãzeira usados para identificação e caracterização de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. associados à antracnose.	32
Tabela 2. Primers utilizados no estudo.	35
Tabela 3. Isolados incluídos nas análises de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank..	37
Tabela 4. Descrição dos isolados usados para identificação e caracterização de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. associados à antracnose em romã e maracujá.	42
Tabela 5. Diversidade dos aspectos culturais dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. de maracujá.	53
Tabela 6. Taxa de Crescimento Micelial (TCM), grupo de coloração e topografia da colônia de espécies de <i>Colletotrichum</i> oriundos de maracujá.	54
Tabela 7. Diversidade dos aspectos culturais dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. de romã.....	56
Tabela 8. Taxa de Crescimento Micelial (TCM), grupo de coloração e topografia da colônia de espécies de <i>Colletotrichum</i> oriundos de romã.....	57
Tabela 9. Médias de comprimento e largura de conídios e apressórios de isolados de <i>Colletotrichum</i>	58
Tabela 10. Média do diâmetro das lesões (cm) causada pela infecção cruzada em frutos de mamão (<i>Carica papaya</i> L.), tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), manga (<i>Mangifera indica</i> L.) e pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.), de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de frutos.....	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. A cultura do maracujazeiro.....	18
2.1.1. Aspectos botânicos do maracujazeiro	19
2.1.2. Importância econômica do maracujazeiro	20
2.2. A cultura da romãzeira	21
2.2.1. Aspectos botânicos da romãzeira	22
2.2.2. Importância econômica da romãzeira	22
2.3. Aspectos fitossanitários do maracujá e romã	23
2.4. Antracnose.....	24
2.5. O gênero <i>Colletotrichum</i>	26
2.6. Identificação de espécies de <i>Colletotrichum</i>	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Amostragem, obtenção e preservação dos isolados	31
3.2. Teste de patogenicidade e reisolamento	33
3.3. Caracterização molecular.....	33
3.3.1. Amplificação, Purificação e sequenciamento do DNA	34
3.3.2. Análises Filogenéticas.....	35
3.4. Estudo Morfocultural das Espécies de <i>Colletotrichum</i>	38
3.5. Patogenicidade de <i>Colletotrichum</i> spp. em diferentes hospedeiros.....	39
3.6. Estudo Morfofisiológica das Espécies de <i>Colletotrichum</i>	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Identificação dos isolados	42
4.2. Teste de patogenicidade	42

4.3. Caracterização da molecular	44
4.3.1. Maracujá	44
4.3.2. Romã	49
4.4. Caracterização cultural.....	53
4.4.1. Maracujá	53
4.4.2. Romã	55
4.5. Caracterização morfológica.....	57
4.5.1. Maracujá	57
4.5.2. Romã	62
4.6. Caracterização morfofisiológica	63
4.7. Patogenicidade de <i>Colletotrichum</i> spp. em diferentes hospedeiros.....	68
5. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	74

1.INTRODUÇÃO

Atualmente, a produção global de frutas conta com mais de 800 milhões de toneladas e o Brasil é o terceiro colocado no ranking de produção, ficando atrás apenas da China e Índia. O Brasil por ser um país com diversificados tipos de climas, proporciona ampla variedade de produção de frutícolas em todas as regiões, além disso, o alto investimento em eficientes sistemas de cultivo, impulsiona as cadeias produtivas exportadoras, assim como a ampliação de oferta de frutas para população nacional. Dessa forma, a fruticultura brasileira vive um bom momento de representatividade econômica, com volume de colheita de aproximadamente 40 milhões de toneladas anuais de frutas (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2015).

Dentre as principais frutas produzidas no Brasil, destaca-se o maracujá, fruta tropical originária da América do Sul, com qualidade nutricional, rica em sais minerais e vitaminas e com bom rendimento econômico (AGRIANUAL, 2002; GANGA et al., 2004; MELETTI,2011). É produzida em todo território nacional, principalmente na região Nordeste, com produção de 622.036 toneladas, com destaque para os estados da Bahia, com produção de 355.020 toneladas, Ceará com 213.902 toneladas e Sergipe 32.289 toneladas produzidas. Alagoas ocupa o décimo nono lugar em produção nacional e o sexto lugar em relação ao nordeste do país, com produção de 2.904 toneladas. A região Sudeste produz 114.954 toneladas, sendo a maior produtividade nos estados do Espírito Santo com 47.993 toneladas, e Minas Gerais com 33.106 toneladas produzidas, enquanto as regiões Norte, Sul e Centro-Oeste contribuem com produções de 53.637 toneladas, 29.642 t e 17.975 t, respectivamente (IBGE,2014).

A produção do fruto em sua maioria é oriunda de pequenos produtores, com área de cultivo de aproximadamente 3 ha, e é destinada ao consumo na forma *in natura*, como também é utilizado na indústria alimentícia na fabricação de sorvetes, sucos, doces e geleias, e pela indústria farmacêutica como anti-espasmódicas, anti-helmínticos e sedativos (DHAWAN, K. et al., 2004).

Além de pomares com frutas tradicionalmente cultivadas como manga, laranja, coco, abacaxi, maracujá, banana dentre outras, empresas brasileiras de pesquisa estão desenvolvendo estudos com introdução de frutas típicas de clima temperado que apresentam propriedades para bom desenvolvimento na região do semiárido brasileiro, com o intuito de implantar e estabelecer a cultura como nova

fonte de investimento para pequenos, médios e grandes produtores, como exemplo a romã (*Punica granatum* L.) (CARDOSO et al.,2011).

A romã é uma fruta originária do Oriente Médio e difundida mundialmente (ERCISLI et al. 2007; MOREIRA et al.,2015). É comercializada na forma *in natura*, porém a maior demanda da produtividade está voltada as indústrias farmacêutica e nutracêuticas, devido a presença de flavonoides (compostos fenólicos) com propriedades farmacológicas (NODA et al. 2002).

Embora o maracujazeiro e a romãzeira possuam boa adaptabilidade a condições edafoclimáticas adversas, ambas as culturas apresentam drástica redução de produtividade devido a problemas fitossanitários (TOMAZ, 2012). E apesar de haver poucos relatos publicados sobre os prejuízos causados por fitopatógenos a cultura da romã, sabe-se que esta é susceptível aos mesmos (CARDOSO et al.,2011).

Dentre as doenças que afetam as culturas do maracujá e da romã, está a antracnose, uma doença causada por espécies de fungo do gênero *Colletotrichum* (ALMEIDA; COELHO, 2007; CARDOSO et al., 2011). Trata-se de uma doença que provoca grandes prejuízos na produção, tanto em campo como em pós-colheita, e apresenta sintomas típicos com lesões necróticas, arredondadas com centro deprimido, podendo ocorrer apodrecimento dos frutos (BAILEY et al., 1992; SILVA et al., 2006). A ação destes patógenos é mais expressiva em plantios adultos, principalmente se a fase fenológica de maturidade coincidir com épocas quentes e chuvosas (JUNQUEIRA et al., 2005).

Diversas espécies de fungos são identificadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Contudo, a identificação apenas com esses métodos apresenta dificuldades devido à grande diversidade fenotípica em função das condições do ambiente (CAI et al., 2009; ANDRADE et al., 2007). Assim, técnicas moleculares com utilização de marcadores filogenéticos são utilizadas em conjunto com métodos morfológicos e culturais. A análise destes genes associados a caracterização morfocultural, permite maior segurança na identificação de espécies de *Colletotrichum*.

Diante dos prejuízos causados pela antracnose na cultura do maracujazeiro e da romãzeira, o objetivo deste trabalho foi identificar espécies do gênero *Colletotrichum* associadas à estas culturas através da caracterização molecular e morfocultural em diferentes estados do nordeste brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.A cultura do maracujazeiro

O maracujazeiro (*Passiflora spp.*) é uma planta difundida mundialmente, que pertence à família Passifloraceae, composta por 18 gêneros sendo o gênero *Passiflora* o que apresenta maior número de espécies, estimado em mais de 500 espécies (VANDERPLANK, 1996; LOPES, 1991; CROCHEMORE et al., 2002).

Dentre as espécies deste gênero que produzem frutos comestíveis estão a *Passiflora edulis Sims* (maracujá roxo), *P. edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg. (maracujá-amarelo), *P. alata* Curtis (maracujá-doce, maracujá-açu), *P. maliformis* Linn. (maracujá cabaça doce, maracujá maçã, maracujá de osso), *P. setácea* (maracujazeiro-sururuca, maracujazeiro-do-sono, maracujazeiro-de-veado), *P. nítida* Kunth (maracujá-suspiro, maracujá-do-cerrado), *P. cincinnata* Mast., (maracujá-do-mato) e *P. quadrangularis* L. (maracujá-de-quilo, maracujá-gigante, badea), porém, as espécies *P. edulis Sims* (maracujá roxo) e *P. edulis Sims* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo), são as mais utilizadas em plantios comerciais devido a qualidade dos frutos para consumo (MARTIN & NAKASONE, 1970; MANICA, 1981; OLIVEIRA et al., 1994; ARAÚJO, 2007).

E apesar de vários ciclos de retração e expansão que cultura sofreu desde da sua implantação comercial, devido a dificuldades de comercialização e principalmente por problemas fitossanitários, atualmente a cultura do maracujá vive um bom momento de representatividade, na fruticultura mundial, devido a sua adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas, rápido retorno de investimento e produtividade durante a maior parte do ano (MELETTI et al., 2010).

A produção mundial de maracujá é de aproximadamente 640.000 toneladas, distribuída em onze países: Brasil, Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka, Austrália, Quênia, Colômbia, Equador, Venezuela, Costa Rica. O Brasil é o principal produtor, com cerca de 70% da produtividade mundial. Em segundo lugar encontra-se o Equador, com pouco mais de 13%, seguido pela Colômbia com 5% do total da produção da fruta (FURLANETO et al., 2010). No Brasil o maracujazeiro é cultivado em todas as regiões, principalmente na região Nordeste, que é a maior produtora, responsável por cerca de 74% do total da

produção do país (IBGE, 2014). Alagoas ocupa o sexto lugar da produção nacional, com cerca de 2.904 toneladas produzidas, sendo Maragogi o principal município produtor com 2.029 toneladas, seguido pelo município de Coruripe com produção de 980 toneladas (IBGE, 2015).

2.1.1. Aspectos botânicos do maracujazeiro

O maracujazeiro é uma planta trepadeira, perene, de rápido crescimento e frutificação precoce, pode atingir 5 a 10 m de comprimento (RUGGIERO et al., 2000). O caule é circular, lenhoso na base e herbáceo no ápice, de onde surgem as gemas vegetativas, das quais, cada uma dará origem a uma folha, uma gavinha e uma flor (URASHIMA, 1985; MELETTI, 2005). Em pomares comerciais, apresenta duração entre um a seis anos de vida (KUDO, 2004).

O sistema radicular é composto por raízes grandes do tipo pivotante ou axial, e apresenta maior concentração na profundidade entre 0 e 45cm do solo. A raiz central e as médias, são responsáveis pela sustentação da planta, enquanto as pequenas têm a função de absorção de água e nutrientes (SILVA; SÃO JOSÉ, 1994; KUDO, 2004).

O maracujá possui polimorfismo foliar, onde se pode observar as seguintes formas: lobada, digitada, elíptica, ovada, serreada, lisa, glandulosa e subcoreácea (CERVI, 1997). As folhas iniciais são ovadas e sem lobos. Em sua base, encontram-se brácteas foliáceas, que são folhas modificadas e possuem a função de atrair animais polinizadores. Sob estresse, as folhas do maracujazeiro tendem a cair e voltam a brotar no início do ciclo seguinte da cultura (LEITÃO FILHO e ARANHA, 1974). Também possuem gavinhas, apêndice filamentosos, que apresenta movimento chamado de tigmotropismo, e conseguem se enrolar a suportes para manterem-se fixas (SOARES, 1993).

As flores do maracujá-amarelo são hermafroditas, crescem isoladamente a partir da quinta axila das folhas dos ramos novos. São diclamídeas, apresentando um cálice tubuloso, constituído por cinco sépalas oblongas e esverdeadas e uma corola formada por cinco pétalas oblongas. A corola é seguida por uma corona, que é constituída por cinco séries de filamentos, e na sua base está localizado o opérculo, que protege a câmara nectarífera. Na parte central da flor apresenta-se um tubo andrógino, em cuja base se localiza o

ovário. Em sua parte inferior, se inserem cinco filetes terminados por anteras bem desenvolvidas, em cuja parte superior desenvolvem-se os estigmas. O pólen apresenta coloração creme e é pesado, o que desfavorece a polinização pelo vento (BRUCKNER et al., 2005).

O fruto é classificado como uma baga de forma ovóide ou globosa, com variabilidade no tamanho e no peso, e de coloração amarela quando maduros. A parte externa é formada pelo pericarpo e a interna constitui a polpa. As sementes são de coloração pardo escura e são revestidas pelos arilos, de onde é extraído o suco (MARTINS, 2006).

2.1.2.Importância econômica do maracujazeiro

No Brasil, durante muitos anos, o maracujá era considerado apenas como uma fruta de pomar doméstico, sendo seu valor comercial descoberto no final da década de 60, quando cafeicultores, após um período de baixa na cafeicultura, implantaram pomares de maracujá visando a possibilidade de rápido retorno financeiro oferecidos pela cultura. Assim, o maracujazeiro apresentou-se como uma opção economicamente viável, principalmente ao pequeno proprietário de agricultura familiar, devido à alta rentabilidade do fruto, e a partir da década de 90 ocorreu significativa ampliação da área cultivada com maracujá no País, com crescimento de área cultivada em torno de 75%, em apenas seis anos, o que tornou o maracujá uma cultura de expressão econômica (MELETTI, 2011).

A ascensão dos pomares de maracujá se deu na década de 90, com ampliação de 75% de produtividade em seis anos, passando de uma produção de 25 mil hectares em 1990, para 44 mil hectares em 1996. Nesse período, a valorização da cultura era pelo preço da fruta fresca, porém, com a dificuldade de comercialização devido à alta demanda e também por problemas fitossanitários, mudou-se o hábito de consumo e 70% da produção passou a ser destinada para indústria de sucos. Atualmente essa situação se inverteu e 60% da produção de maracujá são destinadas ao consumo in natura, sendo o restante destinado às agroindústrias de processamento (MELETTI, 2011).

O maracujá é uma das poucas frutíferas que possuem todas as partes da planta comercializável. Além de consumido in natura, o fruto também é utilizado na fabricação de polpa, geleia e néctar. Suas sementes, folhas e raízes são

utilizadas pela indústria farmacêutica como antiespasmódicos; anti-helmínticos e sedativos. E suas flores utilizadas pelo mercado da ornamentação (FALEIRO et al., 2005).

Nos últimos 30 anos o cultivo do maracujá vem se destacando por ser uma frutífera tropical que pode ser cultivada em pequenas áreas, oferece rápido retorno econômico, e produzir frutos na maior parte do ano, o que torna a cultura uma ótima opção para pequenos produtores (CRISÓSTOMO; NAUMOV, 2009).

Segundo Costa et al. (2005), além da importância econômica da cultura, também há sua representatividade social, onde cada hectare implantado, gera em torno de seis empregos, sendo dois diretos e quatro indiretos, assim o pequeno produtor garante a fonte de renda familiar.

2.2. A cultura da romãzeira

A romã (*Punica granatum* L.), também conhecida por granada; milagreira; miligrã, pertence à família *Punicaceae*, é um arbusto lenhoso, ramificado, que mede cerca de 2 a 5 m de altura, vive de 60 a 100 anos e multiplica-se por sementes, enxertia e mergulhia (GONSALVES, 2002). Seus frutos esféricos e com bastante sementes, são não-climatérico, ou seja, não atinge maturidade após colhida, sendo a época ideal para colheita entre 4 e 6 meses após a floração, que varia conforme variedade utilizada (SERRANO, 2012).

A fruta é rica em compostos fenólicos como: antocianinas, ácidos fenólicos e taninos, classe de compostos químicos benéficos a saúde (JARDINI; FILHO, 2007), como também possui alta concentração de flavonoides e polifenóis, os quais apresentam atividades antioxidante, antiviral e antitumoral (TYAGI, 2012).

Devido a estas propriedades funcionais, atualmente a cultura da romã apresenta um grande apelo comercial mundial, e seu cultivo é distribuído em todos os continentes do globo, em países como Espanha, Estados Unidos, Irã, Turquia, Índia, Israel, China e países da costa norte da África, entre outros (SÁNCHEZ; BARRACHINA, 2013).

No Brasil a cultura da romãzeira despertou o interesse de produtores da região do semiárido brasileiro devido a sua adaptabilidade ao clima da região, como também, pelas propriedades que a fruta apresenta, como a elevada

concentração de substâncias bioativas (SANTIAGO, 2010). Há variedades de romã cultivadas nos Estado de São Paulo, Pernambuco, Bahia, Paraíba e Ceará com destaque para este último, pois é um dos principais fornecedores da fruta para o território nacional com cultivo orgânico, possui área cultivada sob manejo no sistema de Agricultura biodinâmica, certificada pela Associação de Certificação Instituto Biodinâmico (IBD) (SILVA et al., 2011).

2.2.1. Aspectos botânicos da romãzeira

A romãzeira apresenta folhas pequenas membranosas, opostas e fasciculadas, brilhantes, alternadas e obtusas. Suas flores são vermelho-alaranjadas dispostas nas extremidades dos ramos, emergem agrupadas em florescências nas extremidades e possuem um cálice tubular e suculento originando frutos esféricos, com muitas sementes angulosas (LORENZI; SOUZA, 2001). Seus frutos são de forma arredondada, formado por uma baga globosa, de casca coriácea, amarela ou avermelhada manchada de escuro, com inúmeras sementes angulosas, cobertas por tegumento espesso, polposo, de sabor doce ligeiramente ácido (GOMES, 2007).

2.2.2. Importância econômica da romãzeira

Além do consumo in natura, a romãzeira é utilizada comercialmente pela indústria alimentícia na fabricação de sucos, vinhos, geleias, biscoitos e doces; pelo setor cosmético com vários produtos formulados a base da fruta como sabonetes, hidratantes, cremes rejuvenescedores dentre outros (JAISWAL, DERMARDEROSIAN; PORTER, 2010).

Entretanto, a principal utilização da planta é pelo setor farmacêutico, área pela qual a romãzeira é mundialmente conhecida por suas características antioxidantes. A polpa, semente e casca são utilizadas para a produção de extratos antifúngicos (NAVARRO et al., 1996; PEREZ; SUARES, 1997; VASCONCELOS et al., 2003), antibacterianos (NAVARRO et al., 1996; PEREIRA et al., 2001; MACHADO et al., 2002; BRAGA et al., 2005), anti-helmínticos (HUKKERL et al., 1993), hipoglicêmicos (PEREIRA et al., 1997; DAS et al., 1999), antidiarreia (DAS et al., 1999), prevenção do câncer (KIM et al., 2002;

HORA et al,2003; KOHNO et al., 2004), antiviróticas (MOUHAJIR et al., 2001; JASSIM e NAJI, 2003; LI et al., 2004; NEURATH et al., 2004), aumento da imunidade (ROSS et al., 2001) e atividade estrogênica (MORI-OKAMOTO et al., 2004; VAN ELSWIJK et al., 2004).

Popularmente os preparos obtidos da flor, fruto e casca da árvore da romã são usados para tratar vários problemas de saúde. O suco é usado no combate a úlceras na boca e genitálias, dores de ouvido, disenteria e lepra. As flores possuem função adstringente e hemostática, além de serem utilizadas para o tratamento de bronquite e diabetes mellitus (LANGLEY, 2000). No México, é usada para diarreia, aftas, parasitismo, abscessos, tosse, angina, inflamação urinária e injúrias da pele (NAVARRO et al., 1996).

2.3. Aspectos fitossanitários do maracujá e romã

Vários problemas fitossanitários afetam tanto a cultura do maracujazeiro, como a da romãzeira, desde a fase de formação de mudas até a pós-colheita, onde diversos microrganismos provocam danos, que afeta raízes, caules, folhas, flores e frutos.

Dentre as principais doenças que afetam a cultura do maracujazeiro, encontra-se a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (PEREIRA) GONÇALVES e ROSATO,2002), cujo os sintomas apresentam-se nas folhas com pequenas lesões encharcadas e translúcidas, as quais evoluem e necrosam (VIANA et al., 2003; ISHIDA; VIEIRA, 2009), e os frutos apresentam podridão – mole com anasarca (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2001; ISHIDA ; VIANA, 2009). Entre as várias viroses, a de maior importância é o endurecimento dos frutos, que pode ser causada por dois potyvirus, o *Passion fruit woodiness vírus* (PWV) e *Cawpea aphid-borne mosaic vírus* (CABMV), cujo sintomas nas folhas são de mosaico, bolhosidade, enrolamento e clareamento das nervuras e nos frutos causa redução no volume da polpa dos frutos (SANTANA et al., 2008). Entre as doenças de origem fúngicas encontra-se a murcha do maracujazeiro (*Fusarium oxysporum* Schelecht. f. sp. *passiflora* Purss) (AGRIOS, 2004); a Verrugose ou cladosporiose (*Cladosporium herbarum* Pers.), cujo sintomas nas folhas são manchas circulares, as quais, sofrem necrose e caem, já os ramos, gavinhas e frutos apresentam lesões circulares com aspecto de “verrugas”; e a antracnose

(*Colletotrichum* spp.), que induz sintomas nas folhas de manchas foliares inicialmente pequenas e oleosas, e depois escuras de formato irregular com centro necrótico e acinzentado; em ramos e gavinhas, as manchas são de coloração pardo-escura, que posteriormente transformam-se em cancrios, expondo o lenho e causando a morte dos ponteiros; nos frutos, são pequenas e oleosas, depois se tornam circulares, escuras e deprimidas. A antracnose é uma das principais doenças que atinge a cultura do maracujazeiro (VIANA et al., 2003).

Em relação a cultura da romãzeira há poucos relatos sobre os problemas fitossanitários. Porém dentre os problemas causados por fitopatógenos descritos na literatura, a principal doença relatada é a antracnose, cujo os sintomas podem aparecer em toda parte aérea da planta, apresentando lesões escuras e deprimidas no centro (CARDOSO et al., 2001).

2.4. Antracnose

A antracnose é uma importante doença comumente encontrada nas regiões produtoras de frutas, que afeta a parte aérea das plantas e ocorre principalmente em frutos maduros, o que a classifica como importante doença de pós colheita. Em condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença, temperatura elevada e alta umidade, o controle torna-se difícil, e o problema agrava-se ainda mais, caso haja ocorrência associada a outras doenças, como por exemplo a mancha bacteriana (FISCHER et al., 2005).

A antracnose é causada por espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, que apresentam ampla disseminação, devido à alta gama de hospedeiros e distribuição cosmopolita, que ocasiona severa redução na produtividade, o que a torna uma doença economicamente importante para a agricultura mundial. A disseminação destes fungos é realizada pelo vento, água, animais e ferramentas, e o patógeno sobrevive em frutos infectados ou mumificados, restos de cultura, folhas infectadas caídas ou em outras plantas hospedeiras vizinhas aos pomares. Como os propágulos desse fungo são disseminados por respingos de água, a ação do patógeno é favorecida sob alta umidade, com chuvas abundantes e a temperatura média de 27°C, que influenciam produção dos esporos (KIMATI et al., 2005). Em períodos de temperaturas mais baixas, a importância da doença diminui, sendo pequena a sua incidência nos meses de

inverno, mesmo que ocorram chuvas abundantes (RUGGIERO et al., 1996).

Os danos causados pela antracnose podem ser observados desde a primeira safra, com redução direta da qualidade e quantidade dos frutos, contudo, o prejuízo torna-se mais expressivos em pomares maduros onde já foram realizados a primeira colheita, apresentando secas de galhos e morte de plantas (JUNQUEIRA et al., 2005). Os prejuízos também são classificados de forma indireta através do aumento dos custos de produção e de pós-colheita onde o desenvolvimento da doença não foi identificado durante o cultivo (SKIPP et al., 1995).

No maracujazeiro e romãzeira, os sintomas podem ser observados em todos os órgãos aéreos da planta como folhas, botões florais, gavinhas, ramos e frutos. Nas folhas, são produzidas manchas inicialmente pequenas, com aspecto oleoso, adquirindo posteriormente cor escura, de formato irregular. Na parte central das manchas, os tecidos tornam-se acinzentados, podendo ocorrer fendilhamento. Sob condições ambientais favoráveis, surgem várias lesões no limbo foliar, provocando coalescência e ocupando grandes áreas e causando queda de folhas (VIANA et al., 2003).

Em ramos e gavinhas as manchas apresentam coloração pardo- escura e transformam-se em cancrios que, dependendo da intensidade ocasionam morte dos ponteiros e secamento parcial da planta (VIANA et al., 2003).

Nos frutos, a doença é mais severa quando estes são desenvolvidos durante o período chuvoso, e caracteriza-se pela presença de lesões marrons deprimidas com halo esverdeado. Sob condições de armazenamento, as lesões adquirem coloração marrom e aumento de tamanho. Com o tempo, as lesões coalescem, tomando toda a superfície do fruto. Sob alta umidade, observa-se ao centro das lesões, frutificações do fungo de cor rosa e pontuações escuras dispostas na forma de anéis concêntricos (JUNQUEIRA et al., 2003)

O controle da doença se faz através de medidas integradas de manejo, com utilização de manejo cultural como emprego de mudas sadias; adubações equilibradas; poda de limpeza e remoção de restos da cultura, e manejo químico com fungicidas registrados para cultura com formulações à base de cobre, triazol, benzimidazol e estrobilurina (VIANA et al., 2003).

Atualmente, para o controle químico da antracnose, existem oito produtos

registrados no Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2010). Os fungicidas utilizados pertencem aos grupos dos benzimidazóis, cúpricos, ditiocarbamatos, chlorotalonil e tebuconazole, sendo os fungicidas prochloraz e imazalil os que apresentaram melhores resultados de controle (KIMATI et al., 2005).

Quanto ao controle genético, até o momento, não há registros de cultivares de maracujazeiro e romãzeira resistentes à antracnose, entretanto, estudos realizados por Junqueira et al. (2003), mostraram que o genótipo de maracujazeiro Roxo-Australiano se apresentou resistente à antracnose na pós-colheita.

2.5. O gênero *Colletotrichum*

As espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, são importantes patógenos causadores de doenças em planta em todo o globo. Apresentam ampla distribuição geográfica e vasta gama de hospedeiro, sendo responsáveis por redução de rendimento econômico nas principais plantas de interesse agrônomo, como leguminosas: feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007) e soja (*Glycine max* L. Merrill) (COSTA et al., 2009); hortaliças: pimentão (*Capsicum annum* L.), pimenta (*Capsicum* spp.) e jiló (*Solanum aethiopicum* L.) (BONETT et al., 2010); frutíferas: mamão (*Carica papaya* L.) (CIA, 2005), abacate (*Persea americana* Mill.), e diversas culturas anuais como: milho (*Zea mays* L.) (COSTA et al., 2010), café (*Coffea arabica* L.) (LINS; ALVES; ABREU, 2007; SILVA et al., 2012) e perenes: pupunha (*Bactris speciosa* (Mart.) H. Karst.) (VIDA et al., 2006). Devido a sua importância econômica e concepção científica, é o oitavo mais importante gênero de fungos fitopatogênicos do mundo (DEAN et al., 2012).

Este gênero pertence ao grupo dos fungos Anamórficos, classe Sordariomycetes, ordem Incertae sedis e família Glomerellaceae (DICTIONARY OF THE FUNGI, 2008), e caracteriza-se por apresentar micélio septado, conídios hialinos e unicelulares, reprodução assexuada por meio dos conídios que são produzidos em conidióforos do tipo acérvulos (PUTZKE, J.; PUTZKE, M., 2002) e formação apressórios, que são estruturas que possibilitam a penetração do fungo no hospedeiro (MENEZES, 2006). A fase teleomórfica destes fungos pertencem ao gênero *Glomerella* sp. (KIRK et al., 2001).

Foi inicialmente descrito por Tode em 1790, com a denominação de *Vermicularia* Tode, porém, em 1831, Corda o reclassificou com a denominação de *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella* Spauld.; H. Schrenk.), sendo caracterizado por frutificações setosas, denominadas acérvulos, nas quais conídios hialinos são produzidos em massa alaranjada ou creme. Entretanto, Von Arx em 1957, concluiu que espécies fúngicas incluídas nos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium*, pertenciam ao mesmo gênero, e então decidiu classifica-los todos no mesmo gênero *Colletotrichum* (MENEZES, 2006).

Desde de então, as técnicas de identificação de fitopatógenos foram evoluindo ao longo dos anos, o gênero *Colletotrichum* passou por várias reclassificações, de 11 espécies que foram estimadas por Arx em 1957, passando a 40 espécies por Sutton (1992), a 60 pelo Dictionary of the Fungi (KIRK et al., 2008), 66 espécies sugeridas no ano de 2009 por Hyde et al. De acordo com Index Fungorum (2011), há 706 espécies, variedades e formae speciales (INDEX FUNGORUM, 2011).

Cannon et al., (2012), ao realizarem estudos moleculares com análises multilocus sobre a situação atual das espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, revelaram 119 espécies distribuídas em nove complexo: *gloeosporioides*, *boninense*, *acutatum*, *graminicola*, *spaethianum*, *destructivum*, *demantium*, *truncatum* e *orbiculare*.

Segundo Weir et al., (2012), o complexo *gloeosporioides* é composto por 35 espécies: *C. aeschynomenes* B. Weir ; P.R. Johnst, *C. alatae* B. Weir ; P.R. Johnst, *C. alienum* B. Weir ; P.R. Johnst, *C. aotearoa* B. Weir ; P.R. Johnst., *C. asianum* Prihastuti, L. Cai ; K.D. Hyde, *C. boehmeriae* Sawada, Hakubutsu Gakkwai Kwaihō, *C. camelliae* Masee, *C. caricae* F. Stevens ; J.G. Hall, Z. Pflanzenkrankh, *C. clidemiae* B. Weir ; P.R. Johnst., *C. coffeanum* F. Noak, Z. Pflanzenkrankh, *C. cordylines* Pollacci, *C. crassipes* (Speg.) Arx, Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch, *C. cordylinicola* Phoulivong, L. Cai; K.D. Hyde, *C. dracaenae* Allesch., Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz, *C. fragariae* A.N. Brooks, *C. fructicola* Prihastuti, L. Cai ; K.D. Hyde, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz.; Sacc., *C. gossypii* Southw., *C. horii* B. Weir ; P.R. Johnst., *C. ignotum* E.I Rojas, S.A. Rehner ; Samuels, *C. jasmini-sambac* Wikee, K.D. Hyde, L. Cai ; McKenzie, *C. kahawae* J.M. Waller ; Bridge subsp. *kahawae*,

C. hymenocallidis Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde ; L. Cai, *C. kahawae* subsp. *ciggaro* B. Weir ; P.R. Johnst., *C. manihotis* Henn., *C. musae* (Berk. ; M.A. Curtis) Arx, Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch., *C. psidii* Curzi, *C. nupharicola* D.A. Johnson, Carris ; J.D. Rogers, *C. queenslandicum* B. Weir ; P.R. Johnst., *C. salsolae* B. Weir ; P.R. Johnst., *C. siamense* Prihastuti, L. Cai ; K.D. Hyde, *C. theobromicola* Delacr., *C. ti* B. Weir ; P.R. Johnst., *C. tropicale* E.I. Rojas, S.A. Rehner ; Samuels, *C. xanthorrhoeae* R.G. Shivas, Bathgate ; Podger.

O complexo boninense relatado por Damm et al. (2012) é composto por 17 espécies; *C. annellatum* Damm, P.F. Cannon; Crous, *C. beeveri* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst.; B. Weir, *C. boninense* Moriwaki, Toy. Sato ; Tsukib., *C. brasiliense* Damm, P.F. Cannon, Crous ; Massola, *C. brassicicola* Damm, P.F. Cannon ; Crous, *C. colombiense* Damm, P.F. Cannon ; Crous, *C. constrictum* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. ; B. Weir, *C. cymbidiicola* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. ; B. Weir, *C. dacrycarpi* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. ; B. Weir, *C. hippeastri* Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde ; L. Cai, *C. karstii* Y.L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde ; L. Cai, *C. novae-zelandiae* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. ; B. Weir, *Concedi* Damm, P.F. Cannon ; Crous, *C. parsonsiae* Damm, P.F. Cannon, Crous, P. R. Johnst. ; B. Weir, *C. petchii* Damm, P.F. Cannon ; Crous, *C. phyllanthi* (H. Surendranath Pai) Damm, P.F. Cannon ; Crous, *C. torulosum* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. ; B. Weir.

Noireung et al. (2012), ao revelarem novas espécies de *Colletotrichum* pela análise Morfologia e Molecular, agregaram o complexo *brevisporum* aos clados do gênero. Este complexo é formado por 4 espécies; *C. brevisporum* S. Phoulivong, P. Noireung, L. Cai; K.D. Hyde, *C. tropicicola* S. Phoulivong, P. Noireung, L. Cai; K.D. Hyde, *C. thailandicum* S. Phoulivong, P. Noireung, L. Cai; K.D. Hyde e *C. cliviae* Y.L. Yang, Z.Y. Liu, L. Cai, K.D. Hyde, Z.N. Yu, E.H.C. Mckenzie.

As espécies do gênero *Colletotrichum* apresentam grande variabilidade e inespecificidade em relação aos hospedeiros, diferentes espécies deste gênero podem infectar diferentes partes da mesma planta hospedeira, como também, vários hospedeiros podem ser infectados por uma única espécie de gênero (MENEZES, 2006).

A coloração das colônias deste gênero apresenta tonalidades variadas de

branco a cinza escuro, e micélio aéreo, com presença de escleródios em algumas espécies. Os conídios encontram-se em ramificações do micélio, mas geralmente são agregados em acérvulos, que possuem tamanho e forma variados dentro de uma mesma espécie, em geral, possuem formato de pústulas e diâmetro de 40 µm a 1 mm (SUTTON, 1992).

Os apressórios apresentam diferentes formatos; clavado, ovalados, com comprimento de 6-20 µm e largura de 4-12 µm. São formados na extremidade do tubo germinativo do conídio, e também podem ser produzidos na extremidade de hifas do micélio. Sua coloração castanha, devido a síntese de proteínas requerida para a produção de melanina durante a formação da estrutura, é o que o torna infectivo. No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido, são resistentes as condições adversas do ambiente, atuando como órgão de sobrevivência (MENEZES,2006).

2.6 Identificação de espécies de *Colletotrichum*

Durante muito tempo, a identificação das espécies de *Colletotrichum* foi feita tradicionalmente apenas por meio das características morfológicas, culturais e patogênicas, onde são analisados caracteres como morfologia e morfometria de conídios, coloração da colônia, taxa de crescimento micelial, patogenicidade e presença de peritécio (MENEZES, 2002). Contudo, muitas vezes, devido à grande variabilidade desse fungo em diferentes condições ambientais, geravam confusões de interpretações o que dificultava a identificação (FIRMINO et al., 2014).

Dessa forma, os métodos tradicionais atualmente são utilizados em conjunto com técnicas moleculares, como por exemplo a reação em cadeia da polimerase (PCR), que se baseia na amplificação de sequências específicas de DNA. Técnicas moleculares contribuem para o maior esclarecimento taxonômico porque permite acessar a variabilidade intraespecífica e interespecífica (TEIXEIRA, VIEIRA, MACHADO, 2004).

O cluster gênico por apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, permitiu uma melhor compreensão da taxonomia fúngica. O

cluster é formado pelos genes 18S, 5,8S e o 28S, que são separados por duas regiões denominadas ITS1 e ITS2. A região 18S, porção mais conservada rDNA eucariótico, é utilizada apenas para comparação de organismos distintos, enquanto a região 28S é mais variável, sendo apropriada para a comparação de diferentes gêneros. Para estudos filogenéticos do gênero *Colletotrichum* a região ITS (Internal Transcribed Spacer) 5,8S é a mais amplamente sequenciada, com utilização de primers baseado nessa região (FUNGARO, 2000).

Porém, estudos mostraram que essa região possui limitações para identificação de algumas espécies, e a utilização de genes mais informativos tornou-se necessário (SILVA et al., 2011).

Dessa forma, para melhor compreender a variabilidade genética da espécie *Colletotrichum*, além da região ITS, utiliza-se vários marcadores filogenéticos como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actina (ACT), chitin synthase (CHS-1), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), histamina (HIS3), glutamine synthetase (GS) e superóxido-dismutase de manganês (SOD) (CANNON et al., 2012).

Atualmente, para identificação de *Colletotrichum* é utilizada a análise multilocus (CHS-1, ACT, TUB2 e ITS), que consiste no agrupamento de espécies geneticamente próximas entre si, que avaliam de acordo com a capacidade do gene em separar os grupos, sendo os que apresentam os maiores valores de separabilidade os melhores candidatos na identificação de espécies do gênero (CAI et al., 2009).

O gene GAPDH é utilizado como medida inicial para avaliação da diversidade de espécie do gênero *Colletotrichum* e utilização em combinação com outros genes para distinguir de forma segura a maioria dos táxons (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

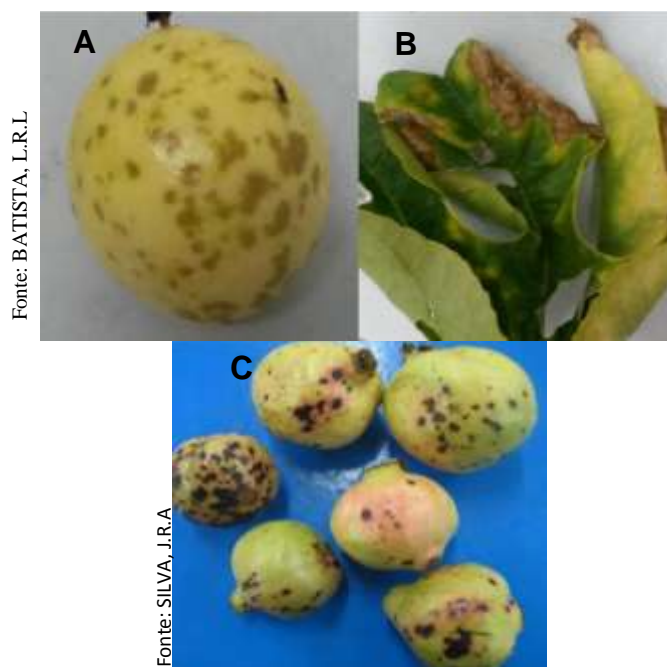
3.MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), localizado no município de Rio Largo, Alagoas.

3.1. Amostragem, obtenção e preservação dos isolados

Isolados de maracujazeiro foram coletados aleatoriamente em folhas e frutos maduros apresentando sintomas típicos de antracnose (Figura 1), em três áreas de plantios comerciais, localizados em municípios dos estados de Alagoas e Sergipe (Tabela 1). Os frutos de romãzeira apresentando sintomas de antracnose (Tabela 1) (Figura 1), foram coletados em plantios não comerciais e em feiras livres de municípios dos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco.

Figura 1. Sintomas de antracnose em frutos (A) e folhas de maracujazeiro amarelo (B) e frutos de romãzeira (C).



As amostras foram inicialmente lavadas em água corrente e secas com papel toalha. Uma lesão de cada folha e fruto foi cortada na região de transição entre o tecido doente e o sadio, e retirados quatro fragmentos. Em uma câmara de fluxo laminar, procedeu-se a desinfestação superficial na seguinte sequência: álcool a 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 1% (1 minuto), e duas lavagens em água destilada esterilizada (ADE) por 30 segundos. Os tecidos foram secos em papel de filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), preparados com 200g de batata, 20g de dextrose, 17g de ágar, 1000ml de água.

Tabela 1. Procedência e ano de coleta dos frutos e folhas de maracujazeiro amarelo e frutos de romãzeira usados para identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose.

Hospedeiro	Procedência	Ano de coleta
Maracujazeiro (folhas e frutos)	Coruripe (AL)	2014
	São Sebastião (AL)	2015
	Canindé de São Francisco (SE)	2015
Romãzeira	Paulo Afonso (BA)	2012
	Maceió (AL)	2012
	Piranhas (AL)	2012
	Carpina (PE)	2012

As placas contendo o meio de cultura e os fragmentos de tecido foram mantidas na temperatura ambiente (aproximadamente 28°C), durante dois dias. Observado o crescimento do patógeno, foram retirados discos (5 mm) das bordas das colônias e posteriormente, transferidos para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidos em temperatura ambiente por dez dias.

Observada a presença de esporos nos isolados realizou-se a metodologia para obtenção de cultura monospórica, garantindo a pureza genética necessária à realização dos estudos de caracterização cultural, morfológica e molecular. Inicialmente, preparou-se uma suspensão de esporos com 1mL de água destilada esterilizada (ADE). A suspensão de esporos foi obtida através de uma raspagem superficial sobre a colônia com o auxílio de uma alça de alumínio previamente esterilizada na chama e resfriada. Em seguida, com auxílio de uma

pipeta contendo 200 μL de ADE. A suspensão de esporos foi ajustada para 10^{-6} con. mL^{-1} . Então, 200 μL desta suspensão foram colocados em uma placa de Petri, contendo BDA e espalhada uniformemente com auxílio de uma alça de Drigalski, previamente esterilizada na chama e resfriada, com duas repetições por isolado. As placas de Petri contendo os esporos foram mantidas à temperatura de 25°C . Decorridos dois dias, discos de BDA (5mm) contendo o esporo germinado foi transferido para novas placas de Petri com meio BDA e mantidos por 7 dias em temperatura ambiente.

Os isolados foram preservados em água, através do método de Castellani (1967) e em tubos de ensaio contendo meio BDA, onde o disco de micélio foi depositado sobre a superfície do meio de cultura e mantidos em temperatura ambiente.

3.2. Teste de patogenicidade e reisolamento

A verificação da patogenicidade dos isolados foi realizada em frutos de maracujazeiro e romãzeira através da deposição de discos de inóculo com e sem ferimento.

Frutos assintomáticos de maracujá e romã foram lavados com água e sabão, em seguida imersos em solução de hipoclorito a 1% por cinco minutos, lavados em água destilada (AD) e secos com papel toalha. A inoculação foi realizada através da deposição de discos do inóculo (5mm), retirados da cultura monospórica contendo as estruturas do patógeno, e colocados equidistantes um dos outros sobre a superfície dos frutos sadios, com duas repetições para cada tratamento (com ferimento/sem ferimento). Os ferimentos foram feitos com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada na chama. Para a testemunha, foram utilizados apenas discos de BDA sem estrutura do patógeno.

Os frutos que apresentaram sintomas típicos de antracnose foram reisolados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA.

3.3. Caracterização molecular

Para obtenção da massa micelial dos isolados de *Colletotrichum*, três discos de BDA (5mm) com o micélio de cada isolado, foram transferidos para

frascos de Erlenmeyer (50ml), contendo 30 mL do meio Sacarose-Extrato de levedura- Asparagina (sacarose 10 g, L-asparagina 2 g, extrato de levedura 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,48 mg, e $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,36 mg) (ZAUZA *et al.*, 2007). As culturas foram incubadas por 7 dias, sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem agitação, e fotoperíodo de 12 horas.

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Doyle; Doyle (1987), onde os micélios dos isolados foram macerados com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo.

O micélio triturado foi transferido para tubos de micro centrifuga com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1mL de tampão de extração CTAB 4% e 4 μL de β -mercaptoetanol, e então 500 μL do micélio triturado foram transferidos para tubos de micro centrífuga com capacidade de 1,5 mL. Os tubos foram mantidos em banho maria a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 600 μL de CIA (clorofórmio: álcool iso-amílico - 24:1) e 40 μL de CTAB 10% aquecido a 65°C . Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e acrescentado 400 μL de etanol absoluto, para precipitação do DNA.

O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspenso com 40 μL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) + RNase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio e observado sob luz UV. O material foi armazenado sob temperatura de -20°C .

3.3.1. Amplificação, Purificação e sequenciamento do DNA

Para o maracujá, os isolados do estudo foram amplificados com os genes que codificam para a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), como medida inicial da diversidade de espécies. Os isolados foram selecionados para representar a gama de diversidade de espécies e origem geográfica e foram posteriormente sequenciados com os genes, β -tubulina e a região ITS-rDNA (Tabela 2), o mesmo procedimento foi utilizado para os isolados da romã.

A amplificação do DNA foi realizada por PCR (Polimerase Chain

Reaction), em que foram preparadas com tampão 10X, MgCl₂ 50 mM, DNTP's 10 mM, 10 µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1µL de DNA diluído (1:30). O volume final das reações foi ajustado para 60µL com água Milli-Q autoclavadas. As reações de PCR foram realizadas em termociclador APPLIED Biosystems (2720 Thermal Cycler) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 2 minutos (desnaturação inicial), 35 ciclos a 94°C por 45 segundos (desnaturação), 60°C por 45 segundos (anelamento), e 72°C por 1 minuto (extensão), e um ciclo final à 72°C por 10 minutos, para o gene GAPDH. Para os genes β -tubulina e a região ITS consiste em desnaturação inicial de 94°C e 34 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30s, 72°C por 1 min e um ciclo final de 10 min por 72°C.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, coradas com brometo de etídio e observadas sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante e posteriormente enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul).

Tabela 2. Primers utilizados no estudo.

Gene	Primer	Sequência (5'-3")	Referências
GAPDH	GDR	GGGTGGAGTCGTA CTTGAGCATGT	Guerber et al., 2003
	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	
TUB2	T1	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	O'Donel; Cigelmik, 1997
	Bt2b	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

3.3.2. Análises Filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Todas as sequências foram analisadas e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Os

isolados foram previamente identificados pela análise das sequências de GAPDH no banco de dados Q-Bank Fungi.

As sequências foram inicialmente alinhadas com o software MUSCLE (EDGAR, 2004), disponível no pacote computacional MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2011). Para identificação dos isolados foi construída uma árvore filogenética do tipo Inferência Bayesiana com as sequências do gene GAPDH, e um subgrupo de isolados foram escolhidos para confirmar a filogenia com as sequências concatenadas dos genes GAPDH, TUB2 e região ITS juntamente com as espécies adicionais obtidas do GenBank (Tabela 3).

A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi realizada empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). MrMODELTEST 2.3 (POSADA, BUCLEY, 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise IB. Os modelos foram estimados pesadamente para cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). A análise BI foi concluída com MrBayes v. 3.1.2. (RANNALA, YANG, 1996; MAU et al., 1999; HUELSENBECK et al., 2001; HUELSENBECK et al., 2002). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise, como uma fase de burn-in. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA, YANG, 1996) foram determinados a partir de uma árvore consenso majority-rule gerada com as 7.500 árvores remanescentes. A convergência dos logs de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (beast.bio.ed.ac.uk/Tracer). As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

Tabela 3. Isolados incluídos nas análises de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.

Espécies	Nº acesso da cultura	Nº de acesso do GenBank		
		ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. aenigma</i>	C1256	JX010243	JX009913	JX010390
<i>C. aeshynomenes*</i>	3-1-3	JX010176	JX009930	JX010392
<i>C. alatae*</i>	C1275	JX010190	JX009990	JX010383
	C1276	JX010191	JX010011	JX010449
<i>C. alienum*</i>	C824	JX010251	JX010028	JX010411
	C1189	JX010217	JX010018	JX010385
<i>C. asianum*</i>	C1315	JX010406	JX010053	JX010406
	C1187	JX010192	JX009915	JX010384
<i>C. boninense*</i>	CBS 123755	JQ005153	JQ005240	JQ005588
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126518	-	AFO60561	AFO61882
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126519	-	AFO60562	AFO61883
<i>C. dianesei*</i>	CMM4083	KC329779	KC517194	KC517254
<i>C. endophytica</i>	DNCL075	KF242123	KF242181	KF254857
<i>C. grevilleae</i>	CBS 132879	KC 297078	KC297102	KC297010
<i>C. gossypii</i>	CML 2379	JX844082	JX847010	JX844108
<i>C. gossypii</i>	CML 2374	JX844077	JX8470091	JX844104
<i>C. guajavae</i>	IMI 350839	-	AFO60560	AFO61881
<i>C. hymenocallidis</i>	CSSN 3	GQ485601	GQ856759	GQ849439
<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551	NR 111744	JQ948618	JQ949939
<i>C. jasmini-sambac</i>	CLTA-01	HM131515	HM131501	HM153772
	LLTA-01	HM131511	HM131497	HM153768
<i>C. kahawae*</i>	C1266	JX010231	JX010012	JX010444
	C1275	JX010238	JX010042	JX010432
<i>C. laticiphilum</i>	CBS 112989	NR111745	JQ948619	JQ949940
	CBS129827	JQ948290	JQ948620	JQ949941
<i>C. murrayae*</i>	GZAAS5.09506	JQ247632	JQ247609	JQ247644
	GZAAS5.09538	JQ247633	JQ247608	JQ247645
<i>C. musae*</i>	CBS116870	JX010146	JX010050	HQ596280
	C1266.11	JX010142	JX010015	JX010395
<i>C. nupharicola*</i>	C1275.24	JX010187	JX009972	JX010398
	C1275.25	JX010189	JX009936	JX010397
<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753	NR111742	JQ948615	JQ949936
<i>C. proteae*</i>	CBS 132882	KC297079	KC297009	KC297101
	CBS 134301	KC842385	KC842379	KC842387
<i>C. queenslandicum*</i>	ICMP 1778	JX010276	JX009934	JX010414
	C956	JX010185	JX010036	JX010412
<i>C. salsolae*</i>	C1314	JX010242	JX009916	JX010403

(CONTINUAÇÃO)

<i>C. scovillei</i>	CBS 126529	-	AFO60559	AFO61880
	CBS 120708	-	AFO60557	AFO61878
<i>C. sloanei</i>	IMI364297	NR111743	JQ948617	JQ949938
<i>C. simmondsii</i>	CBS 122122	NR111741	JQ948606	JQ949927
<i>C. simmondsii</i>	CBS 29467	FJ972610	FJ972581	FJ907444
<i>C. siamense*</i>	C1315	JX010171	JX009924	JX010404
	C1316	JX010294	JX010006	JX010447
<i>C. theobromicola*</i>	C1275	JX010286	JX010024	JX010373
	C1270	JX010289	JX009962	JX010380
	C5101	JX010264	JX010007	JX010407
<i>C. tropicale*</i>	C1272	JX010275	JX010020	JX010396
	YG4	JN412804	JN412798	JN412813
<i>C. viniferum*</i>	GG4	JN412802	JN412800	JN412811
	CBS 125472	-	AFO60565	AFO61886

* Espécie tipo. TUB-2: β -tubulin; GAPDH: gliceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; ITS: partial rDNA-ITS region.

3.4. Estudo Morfocultural das Espécies de *Colletotrichum*

As espécies fúngicas identificadas com base nas análises filogenéticas, foram selecionados para observações da taxa de crescimento micelial, morfologia da colônia, caracterização de conídios e apressórios.

Para caracterização cultural, discos de meio BDA dos isolados de *Colletotrichum* foram retirados da borda da colônia cultivadas por sete dias. Estes foram transferidos individualmente para o centro de novas placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA sintético. O diâmetro das colônias (cm) foi avaliado diariamente tomado no reverso das placas, através da mensuração, em dois sentidos, dos diâmetros perpendiculares, com o auxílio de uma régua, sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas e aos sete dias foi observado a morfologia das colônias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de cada isolado, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

Para caracterização morfológica de espécies de *Colletotrichum* foram avaliados o tamanho e forma de cinquenta conídios e apressórios escolhidos aleatoriamente provenientes das estruturas do patógeno crescidos em meio BDA entre sete e quatorze dias. Para a mensuração dos esporos foram utilizadas lâminas de vidro, onde foi depositada uma gota (40 μ L) do corante azul de

metileno juntamente com os conídios e realizada a medição dos mesmos em microscópico óptico.

A formação de apressórios foi observada utilizando duas metodologias. A primeira, foi utilizada uma gota de suspensão de esporos depositada sobre uma lâmina de vidro estéril acondicionada em placa de Petri forrada com papel filtro estéril umedecido com ADE, para manter o ambiente úmido e permitir a germinação dos conídios. A segunda, foi realizada a microcultura, onde a mensuração de comprimento e largura dos apressórios, considerou-se como comprimento, a distância entre o septo existente entre o apressório e o tubo germinativo e a extremidade mais distante do mesmo. A largura foi mensurada em sentido perpendicular ao considerado para o comprimento (SUSSEL, 2005).

As medidas de comprimento e largura dos conídios e apressórios foram obtidos após 48 horas, através de imagens capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada ao microscópio óptico com aumento de 400x, projetada em monitor de computador, através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®).

Os dados obtidos no crescimento micelial, comprimento e largura dos conídios e apressórios das espécies de *Colletotrichum* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa Sistema de análise de variância para dados balanceados (SISVAR), desenvolvido por Ferreira (2000).

3.5. Patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em diferentes hospedeiros

Isolados de *Colletotrichum* identificados com base nas análises filogenéticas, sendo três espécies de frutos de romã (*C. tropicale*, *C. theobromicola* e *C. fructicola*) e cinco provenientes de frutos e folhas de maracujazeiro (*Colletotrichum* sp., *C. theobromicola*, *C. fructicola*, *C. clivia* e *C. brevisporum*), foram utilizados nos estudos de patogenicidade em diferentes hospedeiros.

Frutos assintomáticos de mamão (*Carica papaya* L.), manga (*Mangifera indica* L.), pimentão (*Capsicum Anuum Group*) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.), foram lavados com água corrente e sabão e tratados com uma solução de hipoclorito a 1% por cinco minutos, posteriormente lavados em água destilada

(AD) e secos com papel toalha. Os frutos receberam ferimentos com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada na chama, onde foram inoculados com discos do patógeno (5mm), retirados da cultura monospórica. Para a testemunha, foram utilizados apenas discos de BDA sem estrutura do patógeno.

Os frutos foram colocados, separadamente, em um saco de polietileno contendo um algodão embebido em ADE para não permitir a desidratação do fruto e favorecer a germinação das estruturas de reprodução do patógeno. Para evitar o contato direto com a superfície úmida do plástico, foram utilizados tampas e fundos de placas de Petri esterilizadas.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada aos sete dias, onde foram realizadas medições de comprimento e largura da área lesionada com ajuda de uma régua milimetrada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 33 tratamentos em esquema fatorial 8x4 + testemunha, representados por espécies de *Colletotrichum* e quatro espécies de frutos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.6. Estudo Morfofisiológica das Espécies de *Colletotrichum*

Na caracterização morfofisiológica foram testados alguns meios de cultura com o objetivo de selecionar um meio adequado ao crescimento micelial. Foram utilizados os seguintes meios: BDA, CA (20g de cenoura, 17d de ágar e 1000mL de ADE), V8 (200mL de suco V8, 3 g de CaCO_3 , 17 g de ágar e 800 mL de ADE) e CMA (20g de fubá, 17 g de ágar e 1000mL de ADE).

Foram escolhidos oito isolados de *Colletotrichum* identificadas com base na análise molecular foram utilizadas neste experimento, onde discos de BDA contendo o patógeno com sete dias foram transferidos para centro de placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura descritos anteriormente. Posteriormente, as placas foram mantidas sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 32 tratamentos, em esquema fatorial 4x8, com quatro meios de cultura e oito espécies de *Colletotrichum* e 10 repetições, sendo cada repetição representada

por uma placa de Petri. Durante sete dias de incubação, foi avaliado diariamente tomado no reverso das placas, através da mensuração, em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de uma régua o diâmetro médio de cada colônia (cm).

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR Sistema de análise de variância para dados balanceados (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos isolados

Quarenta isolados provenientes de folhas e frutos de maracujazeiro e dez de frutos de romã foram identificados morfologicamente como *Colletotrichum* spp. (SUTTON, 1980) (Tabela 4).

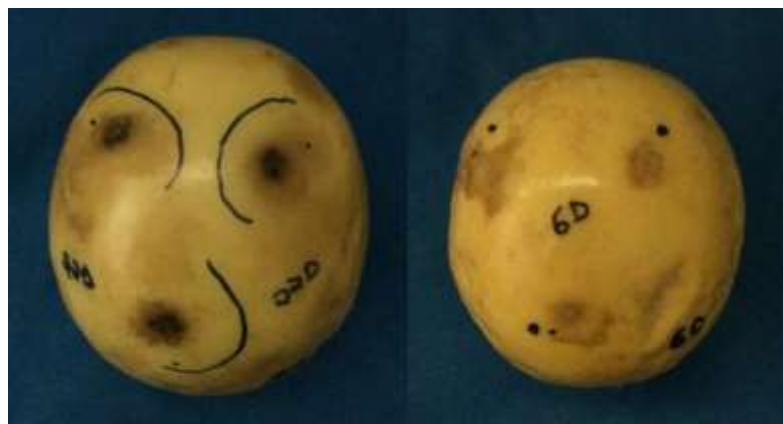
Tabela 4. Descrição dos isolados usados para identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose em romã e maracujá.

Hospedeiro	Código do isolado	Local de coleta	Ano da coleta
Romã	R01, R02, R05, R06	Paulo Afonso (BA)	2012
Romã	R03, R04, R10	Maceió (AL)	2012
Romã	R07, R08	Piranhas (AL)	2012
Romã	R09	Carpina (PE)	2012
Maracujá	MP1, MP2, MP3, MP4, MP5, MP6, MP7, MP8, MP9, MP10, MP11, MP12, MP13, MP14, MP15, MP16, MP17	Coruripe (AL)	2014
Maracujá	MS18, MS19, MS20, MS21, MS22, MS23, MS24, MS25	São Sebastião (AL)	2015
Maracujá	MC26, MC27, MC28, MC29, MC30, MC31, MC32, MC33, MC34, MC35, MC36, MC37, MC38, MC39, MC40, MC41, MC42, MC43, MC44	Canindé de São Francisco (SE)	2015

4.2. Teste de patogenicidade

Os isolados de *Colletotrichum* provenientes de folhas e frutos de maracujazeiro foram patogênicos quando inoculados em frutos sadios, apresentando manchas pequenas e oleosas, tornando-se circulares, escuras e deprimidas, e após o reisolamento confirmaram ser o agente causal dos sintomas de antracnose. Os sintomas surgiram em até sete dias após a inoculação (Figura 2).

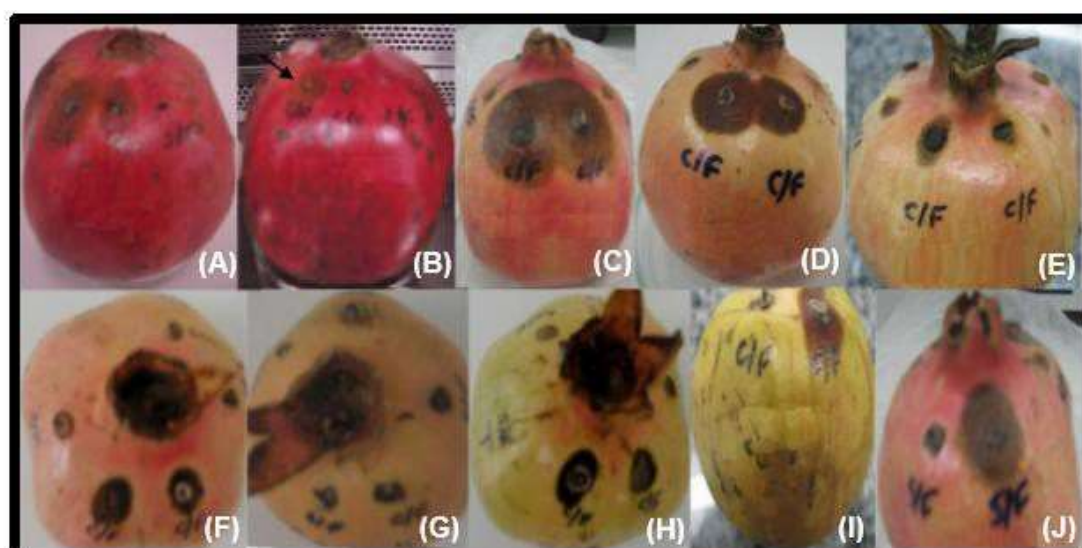
Figura 2. Frutos de maracujá apresentando sintomas de antracnose após inoculação com disco de inóculo de *Colletotrichum* spp.



Fonte: BATISTA, L.R.L

Os dez isolados oriundos de romãzeira foram patogênicos quando inoculados em frutos sadios, apresentando os sintomas típicos da antracnose, com manchas circulares, escuras e deprimidas. Os isolados R03 e R04 apresentaram os sintomas da doença após cinco dias da inoculação e o isolado R06 em dez dias de inoculação, e os demais isolados apresentaram sintomas após os sete dias da inoculação (Figura 3).

Figura 3. Resultado do teste de patogenicidade mostrando as lesões causadas por *Colletotrichum* nos frutos. Isolados: R01 (A), R02 (B), R04 (C), R05 (D), R06 (E), R07 (F), R08 (G), R09 (H), R10 (I) e R04 (J).



Fonte: SILVA, J.R.A.

Estes resultados também foram observados por Silva et al., 2006, ao avaliar a patogenicidade causada por *Colletotrichum* em diferentes espécies frutíferas, onde três dias após inoculação do patógeno, os frutos mantidos em temperatura ambiente apresentaram sintomas característicos da doença. Entretanto, Serra; Silva (2004), em testes realizados com isolados de diversas frutíferas, observaram que, em frutos de maracujá, isolados de manga e goiaba, induziram sintomas típicos da antracnose, porém, isolado de maracujá não causou lesão no próprio hospedeiro.

O desenvolvimento de antracnose em várias culturas é influenciado por alguns fatores, inclusive pelo genótipo do hospedeiro e também do próprio patógeno, e os isolados de *Colletotrichum* demonstram grande variação quanto a agressividade dentro e entre hospedeiros (TU, 1992; TAKAHASHI, 2008).

Segundo CIA (2005), diferentes estágios de maturação dos frutos influenciam na suscetibilidade aos patógenos, ocorrendo declínio de resistência natural dos frutos durante o processo de maturação e após a colheita. Dessa forma, a diferença de dias em que cada isolado apresentou sintomas característicos da antracnose pode ser justificada pelos diferentes estágios de maturação em que os frutos utilizados para o teste foram colhidos.

4.3. Caracterização da molecular

4.3.1. Maracujá

A análise molecular dos isolados amplificados com o gene GAPDH permitiu a delimitação de espécies de *Colletotrichum* pertencentes a três complexos: *C. boninense*, *C. gloeosporioides* e *C. brevisporum* (Figura 4).

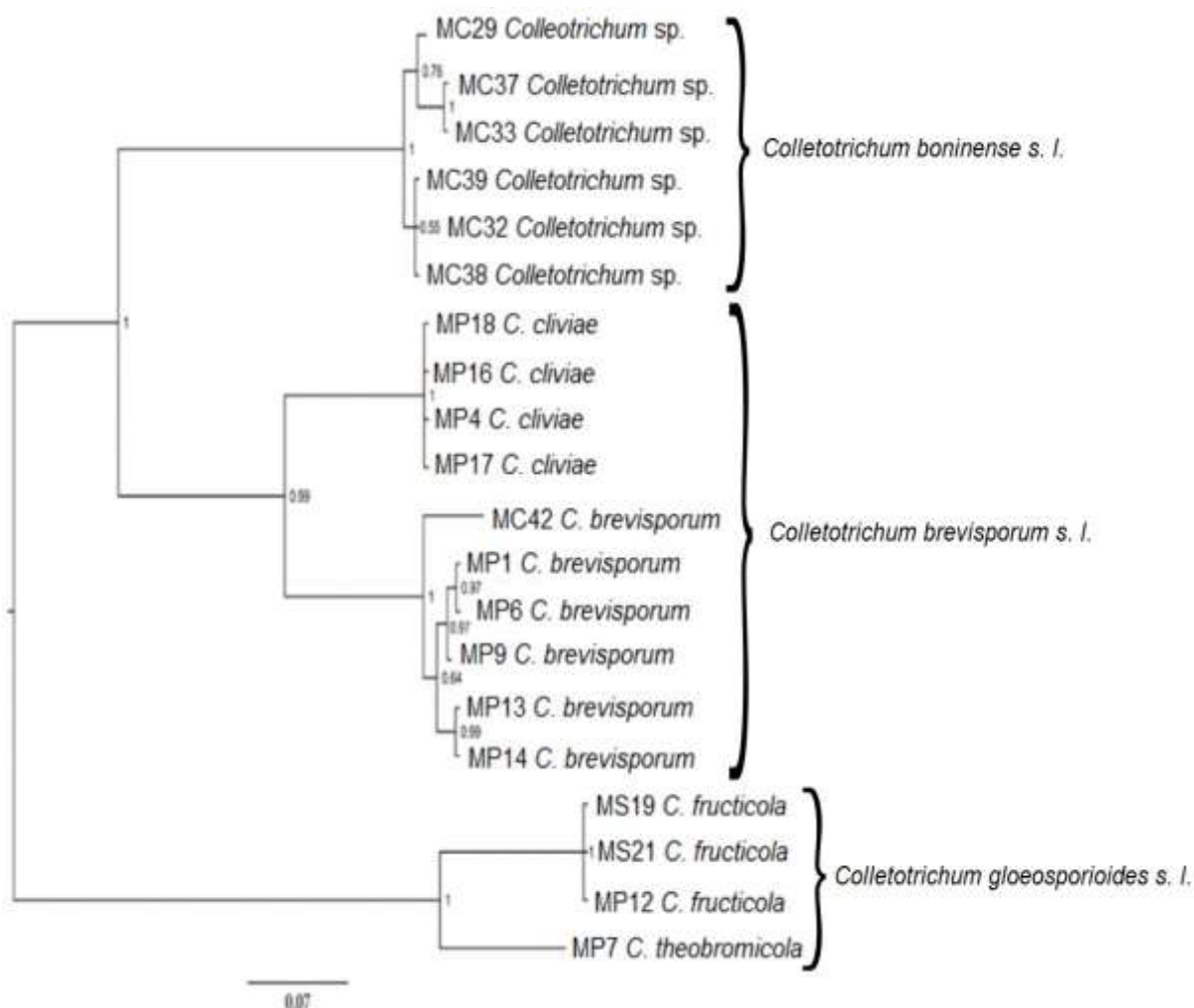
Do complexo *C. brevisporum*, foram identificadas duas espécies, *C. brevisporum* e *C. cliviae*, ambas obtidas a partir do isolamento em maracujá, coletados no município de Coruripe-AL.

A espécie *C. brevisporum* foi descrita recentemente por J et al. (2012) na Tailândia, sendo considerada uma nova espécie dentro do gênero *Colletotrichum*, que deu origem ao novo complexo. Desde de então, foi relatada na Índia (SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2013), na Coreia, (PAUL et al., 2014) e no

Brasil, em mamoeiro (VIEIRA; NASCIMENTO; MICHEREFF, 2013) e em *Capsicum frutescens* (SILVA, 2015). Porém, ainda não há relatos desta espécie associada ao maracujá amarelo.

A espécie *Colletotrichum cliviae* foi observada pela primeira vez por Yang et al. (2009), causando manchas foliares em *Clivia miniata*, uma flor perene da família Amaryllidaceae, originária da África do Sul. No Brasil, o primeiro relato desta espécie foi em isolados de manga (VIEIRA, 2012). E não há relatos de incidência deste fungo na cultura do maracujazeiro.

Figura 4. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com os isolados de *Colletotrichum* obtidos de maracujazeiro amarelo, pertencentes a três complexos, usando o gene GAPDH.



Desde do primeiro relato por Rojas et al. (2010), em cacauzeiro, a espécie *C. theobromicola*, já foi descrita em diversos países como Israel, México, Austrália, Nova Zelândia, Panamá e Estados Unidos (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012). No Brasil, foi relatada em acerola (*Malpighia emarginata* DC) (BRAGANÇA, 2013) e

anonáceas (COSTA,2014). Esta espécie ainda foi identificada como agente causal da antracnose em maracujazeiro.

A árvore filogenética de Inferência Bayesiana concatenada com os genes GAPDH, tub2 e região ITS para representar a gama de diversidade de espécies do complexo *C. gloeosporioides*, confirmaram a análise preliminar com o gene GAPDH, em que os isolados obtidos de frutos e folhas de maracujazeiro identificados são: *C. fructicola*, e *C. theobromicola* (Figura 5). O mesmo foi observado na análise filogenética com os genes GAPDH, tub2 e região ITS para espécies do complexo *C. brevisporum*, confirmando as espécies *C. cliviae* e *C. brevisporum* (Figura 6).

Figura 5. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* oriundos de maracujá amarelo do complexo *C. gloeosporioides*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS.

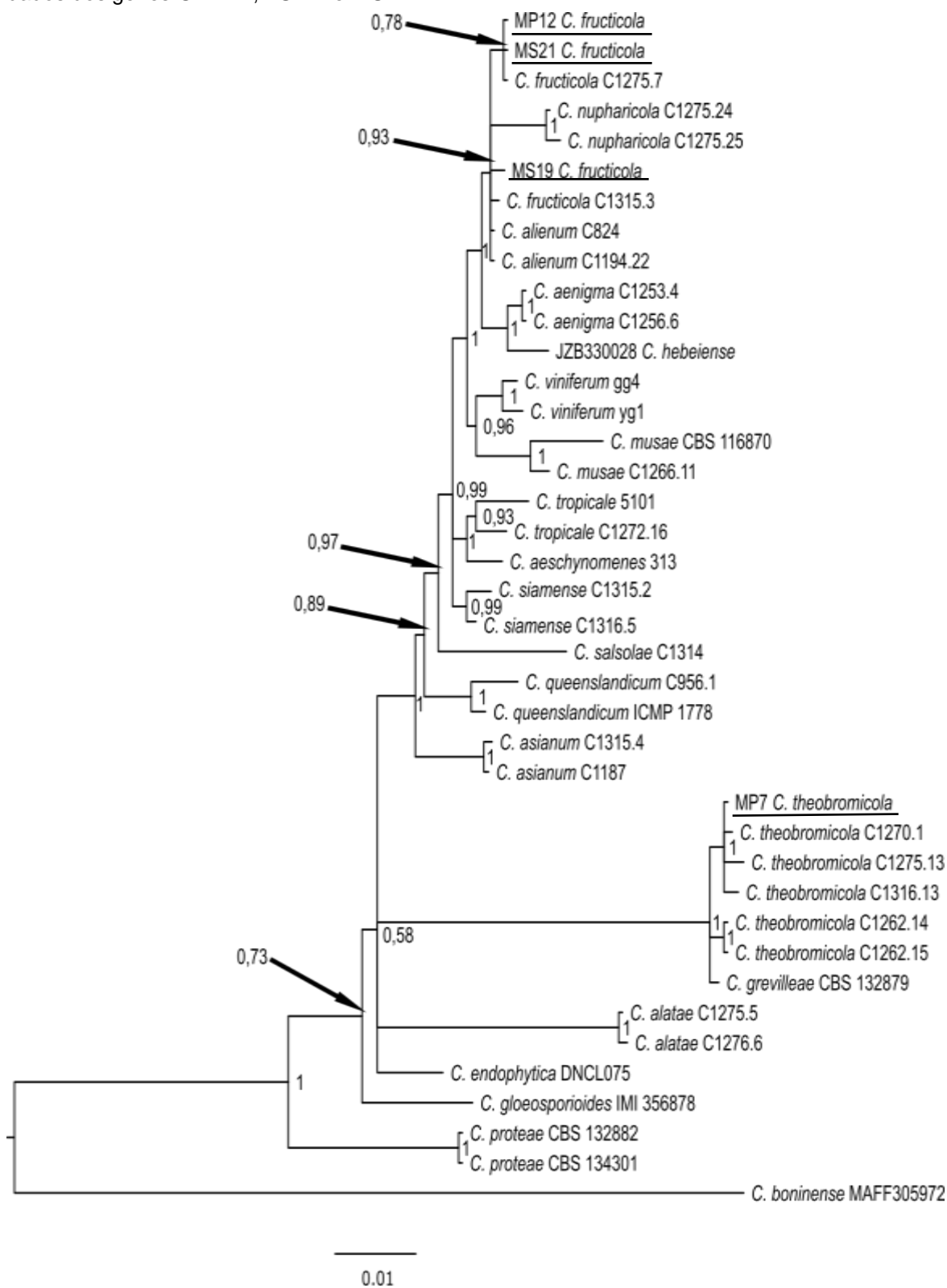
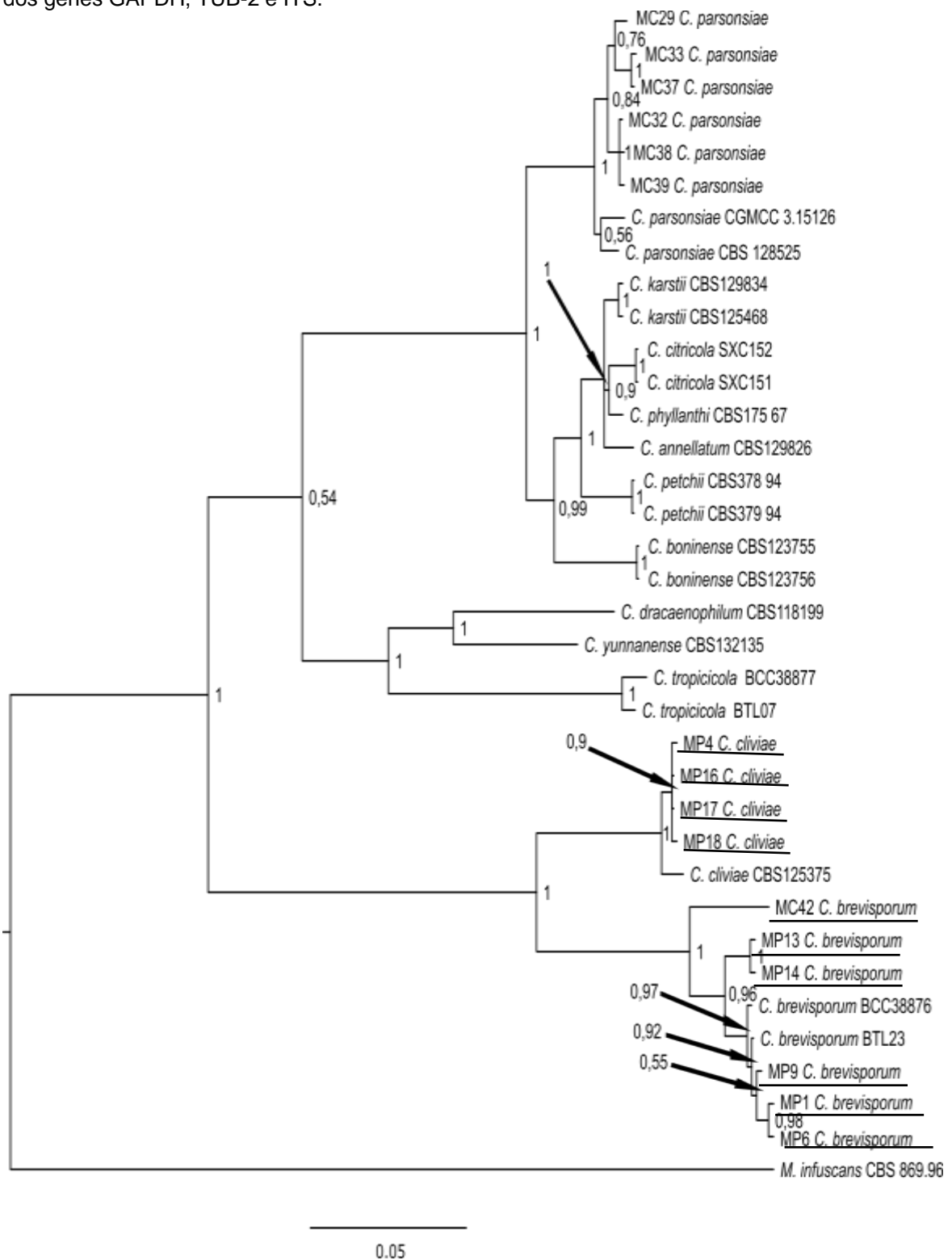


Figura 6. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* oriundos de maracujá amarelo do complexo *C. brevisporum*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS.

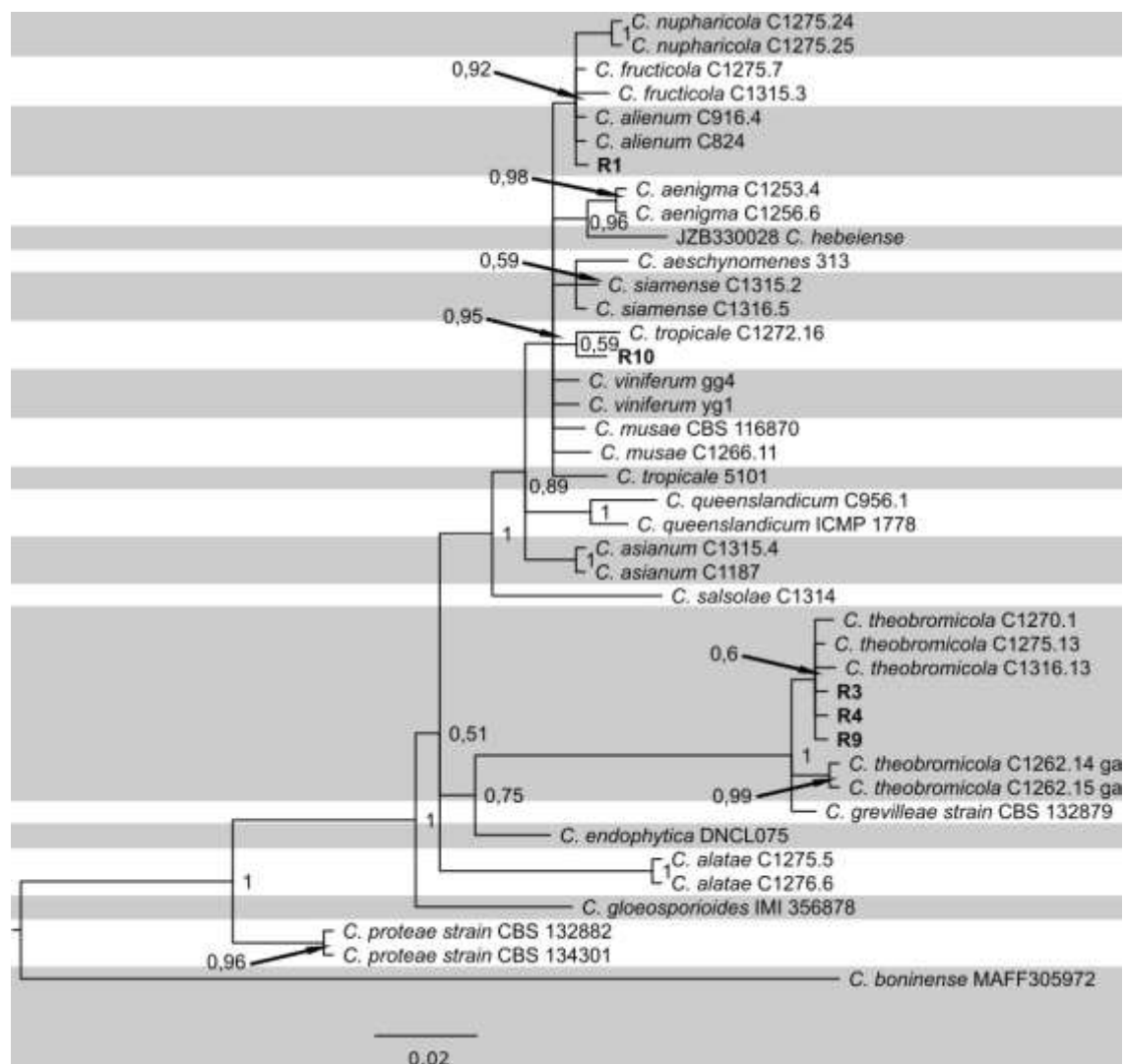


4.3.2. Romã

A análise molecular do gene GAPDH para os isolados R1, R3, R4, R9 e R10, selecionados para representar a gama de diversidade de espécies e origem geográfica, permitiu a identificação de três espécies de *Colletotrichum* pertencentes ao complexo gloeosporioides: *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. theobromicola* (Figura 7). Observa-se que em alguns clados da árvore do complexo gloeosporioides não foi possível separar os isolados quanto à sua respectiva espécie.

Espécies do complexo gloeosporioides foram associadas à romã pela primeira vez em trabalho de Cardoso et al. (2011), sobre ocorrência e controle químico da antracnose em plantio comercial da romãzeira no estado do Ceará. Atualmente o nome *Colletotrichum gloeosporioides* está em uso comum em dois sentidos, um incluindo todo o complexo de espécies, e o outro abrangendo apenas as espécies geneticamente correspondentes selecionadas para este nome por Cannon et al. (2008).

Figura 7. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com os isolados de *Colletotrichum* obtidos de frutos de romã usando o gene GAPDH.



A árvore filogenética de Inferência Bayesiana concatenada com os genes GAPDH, tub2 e região ITS para representar a gama de diversidade de espécies do complexo *C. gloeosporioides*, confirmaram a análise preliminar com o gene GAPDH, em que os isolados identificados são *C. tropicale* (R10) e *C. theobromicola* (R3 e R4). Contudo, não foi possível a confirmação da identificação da espécie *C. fructicola* (R1) com os genes concatenados (Figura 8).

O isolado R1 foi obtido a partir do isolamento em fruto de romã coletado no município de Paulo Afonso (BA), agrupando-se com a espécies de *C. fructicola*. Originalmente esta espécie foi relatada por Prihastuti et al. (2009), em bagas de café da Tailândia e atualmente está associada a diversas culturas como: frutos de pera (*Pyrus pyrifolia*) na China (LI et al., 2013), cacau (*Theobromae cacao* L.) no Panamá (ROJAS et al., 2010), maçã (*Malus domestica*) e Morango (*Fragaria vesca*) nos Estados Unidos (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012), citrus (*Citrus* spp.) (PENG et al. 2012) dentre outras.

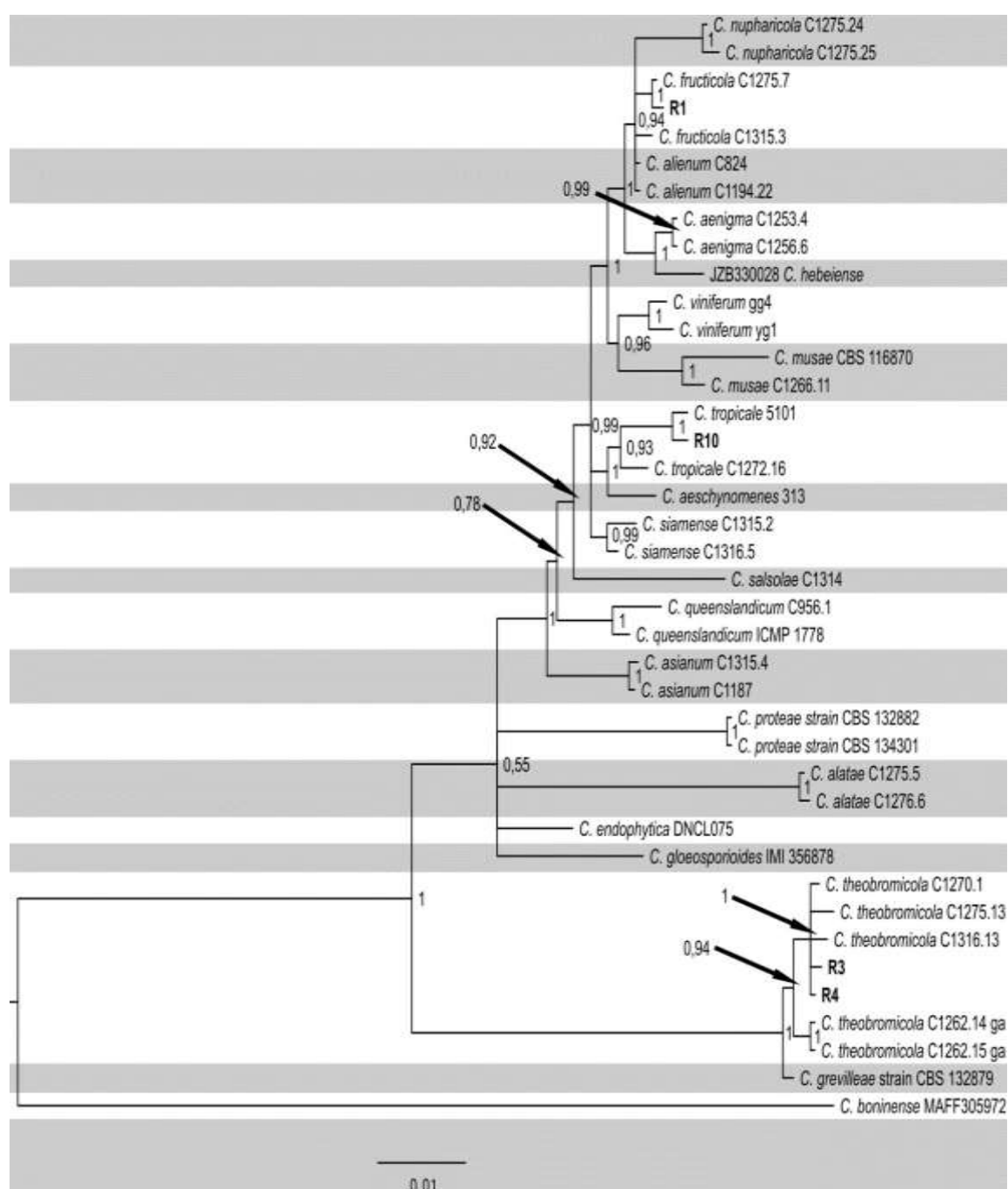
No Brasil existem relatos de ocorrência de antracnose causada por *C. fructicola* em: maçã (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012), goiaba (*Psidium guajava*) (BRAGANÇA, 2013), manga (*Mangifera indica*) (LIMA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014) e anonáceas (COSTA, 2014). Embora haja ocorrência de algumas espécies do complexo *C. gloeosporioides* infectando romãzeira, não há relatos de *C. fructicola* como agente causal da antracnose nesta cultura.

O isolado R10 obtido do município de Maceió (AL) agrupou-se com a espécie *C. tropicale*. Esta espécie foi descrita como agente causal da antracnose em cacau e graviola, no Panamá (ROJAS et al., 2010; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012); lichia (*Litchi chinensis* Sonn), no Japão (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) e gramínea (*Terpsichore taxifolia* L.), em Porto Rico (DOYLE et al., 2013). No Brasil foi associada as culturas de manga (LIMA et al., 2013) anonáceas COSTA, 2014) e pimentão (SILVA, 2015). Não há relatos desta espécie associada a cultura da romãzeira.

Os isolados R3 e R4 oriundos dos municípios de Maceió (AL) e Carpina (PE) respectivamente, foram identificados como *C. theobromicola*. Segundo estudos de Weir, Johnston, Damm (2012), esta espécie é sinonímia de *C. fragariae*, que foi originalmente relatado a isolados associados à cultura do morango na Flórida (BROOKS, 1931).

Colletotrichum theobromicola tem sido relatada em diferentes hospedeiros como: Mata-pasto (*Cassia obtusifolia*), café (*Coffea* sp.), cíclame (*Cyclamens persicum*), morango (*Fragaria ananassa*), *F. chiloensis* (morango costeira), *F. vesca* (Morango selvagem), *F. virginiana* (morango da floresta), oliveira (*Olea europaea*), romã (*Punica granatum*), carvalho (*Quercus* sp.), e cacau (FARR; ROSSMAN, 2015; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Figura 8. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com isolados de *Colletotrichum* obtidos de frutos de romã do complexo *C. gloeosporioides*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS.



4.4. Caracterização cultural

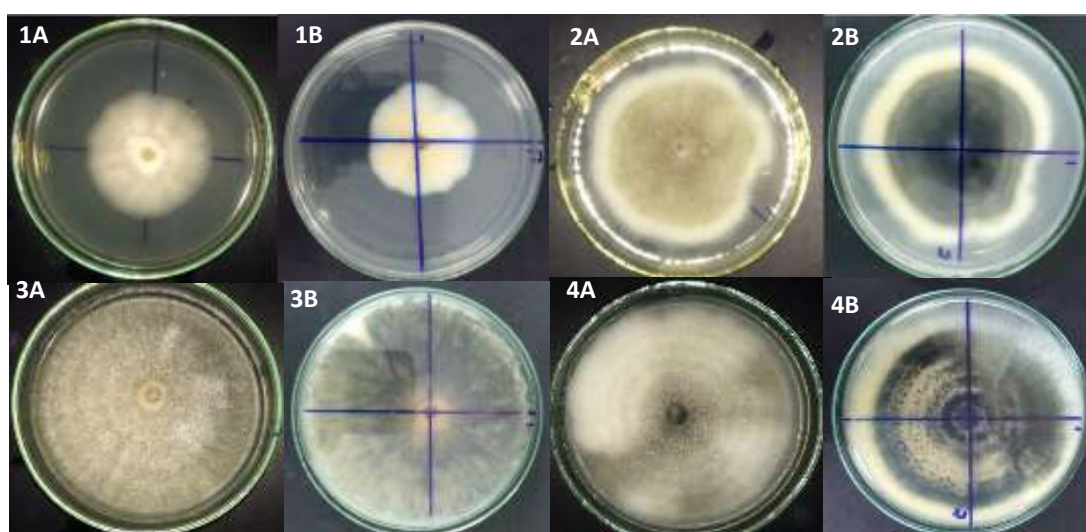
4.4.1. Maracujá

Os isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram-se heterogêneos quanto à coloração das colônias, o que permitiu agrupá-las em 4 grupos distintos (Tabela 5 e Figura 9). A espécie *Colletotrichum* sp. apresentou colônia com aspectos do grupo I, a espécie *C. brevisporum* ao grupo II, a espécie *C. theobromicola* ao grupo III e as espécies *C. fructicola* e *C. cliviae* ao grupo IV.

Tabela 5. Diversidade dos aspectos culturais dos isolados de *Colletotrichum* spp. de maracujá.

GRUPO	COR DA COLÔNIA	BORDA COLÔNIA	REVERSO DA COLÔNIA
I	Branco	Branca	Salmão
II	Marrom claro	Branca	Esverdeado com branco
III	Cinza claro	Cinza claro	Esverdeado com branco e ao centro abundante esporulação de cor laranja
IV	Cinza escuro com branco	Branca	Esverdeado com branco

Figura 9. Aspecto das colônias dos quatro grupos de isolados de *Colletotrichum* obtidos em maracujazeiro. Placas 1- Grupo I espécie *Colletotrichum* sp.(A-Frente, B- Verso); 2- Grupo II espécie *C. brevisporum* (A-Frente, B- Verso); 3- Grupo III espécie *C. theobromicola* (A-Frente, B- Verso); 4- Grupo IV espécie *C. fructicola* e *C. cliviae* (A-Frente, B- Verso).



Quanto à topografia das colônias, os isolados apresentaram dois padrões distintos: micélio aéreo moderadamente abundante (colônias com crescimento micelial aéreo de até 2 mm de altura) e micélio aéreo abundante (colônias com crescimento micelial aéreo acima de 2 mm de altura) (Tabela 6).

As médias de crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* variaram entre si, diferindo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Tukey (Tabela 6).

Os isolados da espécie *Colletotrichum* sp. apresentaram as menores TCM, que correspondeu a 0,52 cm/dia. Esses isolados não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram estatisticamente dos demais isolados analisados. Diante dessas diferenças foram observados quatro padrões distintos de crescimento micelial. Os isolados da espécie *C. fructicola* apresentaram o maior crescimento micelial de 1,91 cm/dia, diferindo dos isolados da espécie *C. theobromicola* com 1,37 cm/dia, que não diferiu estatisticamente dos isolados da espécie *C. cliviae* com crescimento de 1,22 cm/dia, seguidos dos isolados da espécie *C. brevisporum*, que apresentaram crescimento médio de 0,95 cm/dia.

Tabela 6. Taxa de Crescimento Micelial (TCM), grupo de coloração e topografia da colônia de espécies de *Colletotrichum* oriundos de maracujá.

Espécie	TCM cm/dia	Grupo de coloração da colônia	Topografia da colônia
<i>C. fructicola</i>	1,91 a**	III	Micélio aéreo abundante
<i>C. theobromicola</i>	1,37 b**	III	Moderadamente abundante
<i>C. cliviae</i>	1,22 bc**	I	Micélio aéreo abundante
<i>C. brevisporum</i>	0,95 d**	V	Moderadamente abundante
<i>Colletotrichum</i> sp.	0,52 e**	IV	Moderadamente abundante

** Diferença de 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

As espécies de *Colletotrichum* apresentam coloração das colônias bastante variáveis (SUTTON, 1980; SUTTON, 1992; BONETT et al., 2010; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al., 2012). A aparência macroscópica das culturas podem variar dentro de uma mesma espécie, fatores de armazenamento como temperatura, luminosidade e meio de cultura, interferem na estabilidade e aspecto das colônias (COUTO; MENEZES, 2004; MENEZES, 2002).

Neste trabalho foram encontrados resultados semelhantes aos descritos na literatura, quanto aos aspectos culturais de cada espécie.

Weir, Johnston e Damm (2012), com estudos sobre espécies do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, observaram que as colônias da espécie *C. fructicola* apresentavam micélio aéreo, de coloração cinza escuro com branco, reverso esverdeado com branco, enquanto a espécie *C. theobromicola* apresentou micélio aéreo de cor cinza claro e reverso esverdeado com branco e ao centro esporulação de cor laranja. Em ambas as espécies foi observado rápido crescimento micelial, em que atingiram o diâmetro da placa de Petri (8,5 cm) em menos de 10 dias.

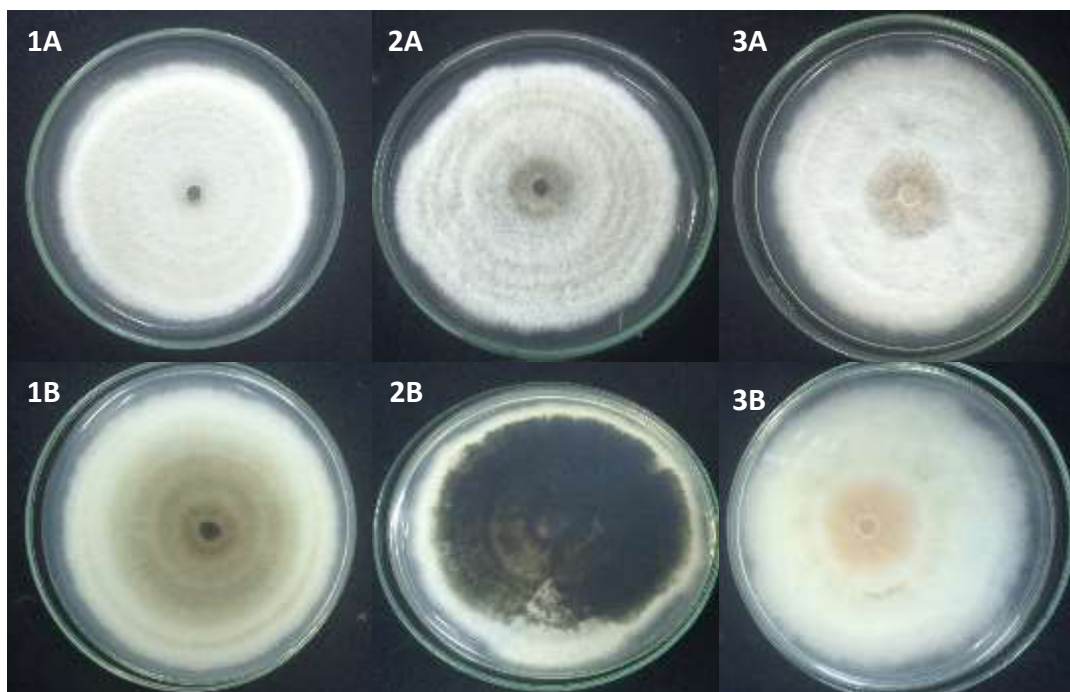
A espécie *C. cliviae* apesar de pertencer ao complexo *Colletotrichum brevisporum*, neste trabalho encontra-se no mesmo grupo dos isolados da espécie *C. fructicola* que pertence ao complexo *C. gloeosporioides*. Segundo Yang et al. (2009), ao descreverem esta espécie pela primeira vez, relataram que a colônia deste fungo apresenta micélio aéreo denso, inicialmente branco, tornando-se cinza com o tempo, com borda branco-acinzentado, reverso esverdeado, com taxa de crescimento de $1,5 \text{ cm} \pm 0,2$ por dia, resultados semelhantes ao descrito nesta pesquisa.

4.4.2. Romã

A avaliação da coloração da colônia dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de romãzeira, possibilitou a diferenciação em três grupos distintos: I, II e III (Tabela 7 e Figura 10). A espécie *C. fructicola* apresentou colônia com aspectos do grupo I, a espécie *C. theobromicola* ao grupo II e a espécie *C. tropicale* ao grupo III.

Tabela 7. Diversidade dos aspectos culturais dos isolados de *Colletotrichum* spp. de romã.

GRUPO	COR DA COLÔNIA	BORDA DA COLÔNIA	REVERSO DA COLÔNIA
I	Cinza com branco	Branco	Marrom claro com branco
II	Cinza com branco	Branco	Verde escuro com branco
III	Branco	Branco	Branco e ao centro abundante esporulação de cor laranja

Figura 10. Aspecto das colônias dos quatro grupos de isolados de *Colletotrichum* obtidos em romazeira. Placas 1- Grupo I espécie *C. fructicola* (A-Frente, B- Verso); 2- Grupo II espécie *C. theobromicola*. (A-Frente, B- Verso); 3- Grupo III espécie *C. tropicale* (A-Frente, B- Verso).

A média da velocidade de crescimento micelial não apresentou diferença significativa entre as espécies (Tabela 8), Entretanto, *C. tropicale* apresentou maior TCM, média de 1,28cm/dia, sob as mesmas condições de cultivo das espécies *C. fructicola* e *C. theobromicola* que apresentaram média de crescimento de 1,22 e 1,23 cm/dia respectivamente.

Todos os grupos apresentaram coloração e topografia característica para espécies do complexo *C. gloeosporioides*, conforme trabalho realizado por de Weir, Johnston, Damm (2012). Em relação ao crescimento micelial, apenas a espécie *C. tropicale* apresentou TCM acima do que é característico para espécie. Segundo os mesmos autores citados acima, a espécie *C. tropicale* apresentou

media 0,85 cm/ dia. Contudo, de acordo com o padrão de crescimento para *Colletotrichum* proposto por Sutton (1992), a TCM entre 0,91 a 1,10 cm/dia, está mais próxima ao crescimento mostrado por *C. gloeosporioides*.

Os dados culturais são importantes na caracterização das espécies como informações complementares que contribuem na sua identificação, porém não devem ser levadas em consideração isoladamente, pois estas características podem variar dentro de uma mesma espécie, porque estão sujeitas a mudanças de acordo com as condições de cultivo.

Tabela 8. Taxa de Crescimento Micelial (TCM), grupo de coloração e topografia da colônia de espécies de *Colletotrichum* oriundos de romã.

Espécie	TCM cm/dia	Grupo da coloração da colônia	Topografia da colônia
<i>C. fructicola</i>	1,22 ^{NS}	I	Micélio aéreo moderado
<i>C. theobromicola</i>	1,23 ^{NS}	II	Micélio aéreo moderado
<i>C. tropicale</i>	1,28 ^{NS}	III	Micélio aéreo moderado

^{NS} Diferença não significativa pelo teste Tukey.

4.5. Caracterização morfológica

4.5.1. Maracujá

Os conídios apresentaram-se com formato, comprimento e largura variáveis. Houve diferença estatística entre todas as espécies, sendo *C. cliviae* a que apresentou maior comprimento de conídios e *C. fructicola* que não diferiu estatisticamente de *Colletotrichum* sp., apresentaram maior comprimento em relação aos apressórios (Tabela 9).

Tabela 9. Médias de comprimento e largura de conídios e apressórios de isolados de *Colletotrichum*.

Espécies	Conídios		Apressórios	
	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Comprimento (μm)	Largura (μm)
<i>Colletotrichum</i>				
<i>C. brevisporum</i>	6,38 c (8,24 -4,33)	2,87 ab (4,44-2,00)	4,08 d (6,27-2,72)	3,54 a (4,87-2,02)
<i>C. theobromicola</i>	7,63 b (9,15- 6,15)	3,01 a (3,69-2,29)	4,25 d (5,83-3,01)	3,21 bc (4,50-2,15)
<i>C. cliviae</i>	8,07 a (10,11-5-15)	2,74 b (3,88-2,25)	4,26 b (6,16-2,21)	3,13 cd (4,84-2,18)
<i>C.fructicola</i>	6,59 cd (8,17-4,31)	2,31 d (3,18-1,19)	4,71 a (6,77-2,68)	2,97 d (4,89-2,04)
<i>Colletotrichum</i> sp.	5,93 d (8,99-4,49)	2,43 c (3,73-1,67)	4,71 a (8,27-3,04)	3,39 ab (5,21-2,29)

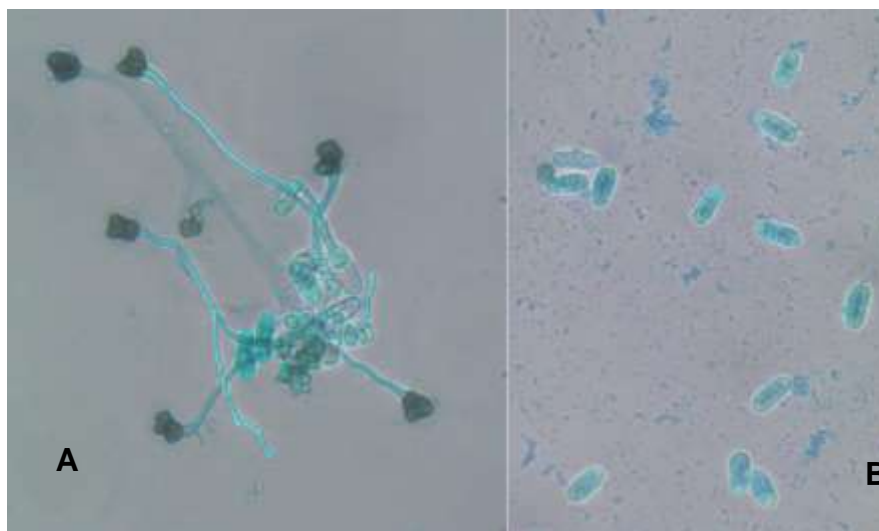
Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A espécie *C. brevisporum* apresentou conídios curtos com extremidades arredondadas, com média de comprimento e largura de 6,38 – 2,87 μm . Os apressórios foram predominantemente de formato irregular com média de comprimento e largura de 4,08 – 3,54 μm (Figura 11).

Os formatos dos conídios e apressórios observados se enquadram nos padrões citados na literatura para espécies de *C. brevisporum* (SILVA, 2015). Noireung et al. 2012, ao realizarem análises morfológicas e moleculares de espécies de *Colletotrichum* isolados de folhas de plantas da Tailândia, observaram que esta espécie apresenta conídios curtos, hialinos, gutulados, com extremidade arredondada e apressórios com formato irregular, porém, apesar da semelhança descritiva, há diferença entre as dimensões de conídios e apressórios, em que apresentaram, respectivamente, de 12-17 x 5-6 μm e 10- 13 x 8-11 μm .

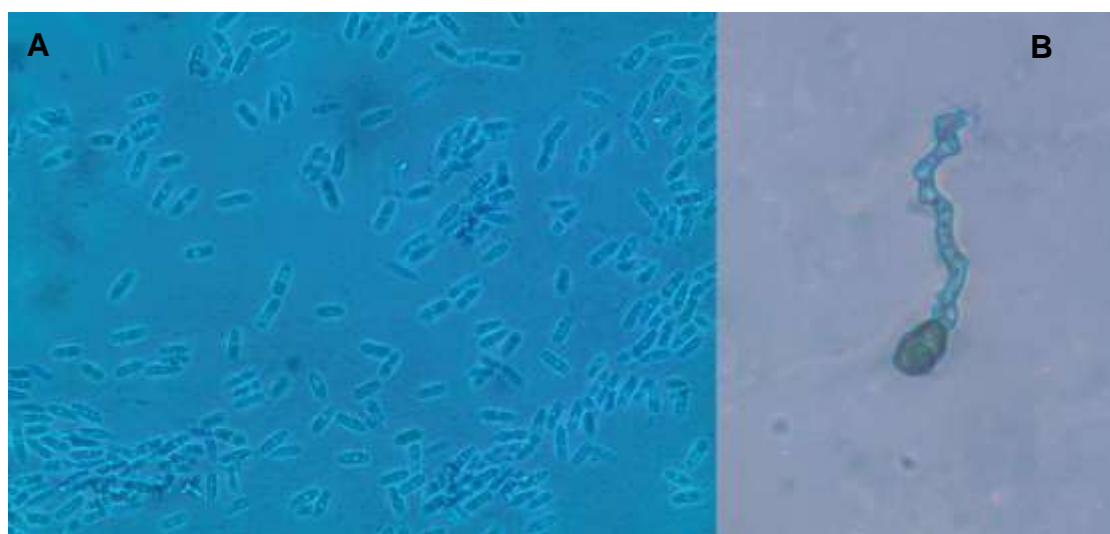
Este fato tem sido relatado por outros autores, e a variação na morfometria dos conídios pode ser explicada em função do local onde são produzidos, devido a influência do ambiente na população do biótipo.

Figura 11. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *C. brevisporum*. A-B: apressórios e conídios.



A espécie *C. theobromicola* apresentou conídios retos, cilíndricos, com ápices arredondados, com valores médios de comprimento e largura 7,63 – 3,01 μm (Figura 12). Os apressórios apresentaram formatos irregulares com média de comprimento e largura de 4,25 – 3,21 μm . Apesar de Rojas et al., 2010, observarem as mesmas características de formato em *C. theobromicola* no cacau, as dimensões apresentavam comprimento e largura de 16 – 5.0 μm .

Figura 12. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *C. theobromicola*. A: conídios e B:apressórios.

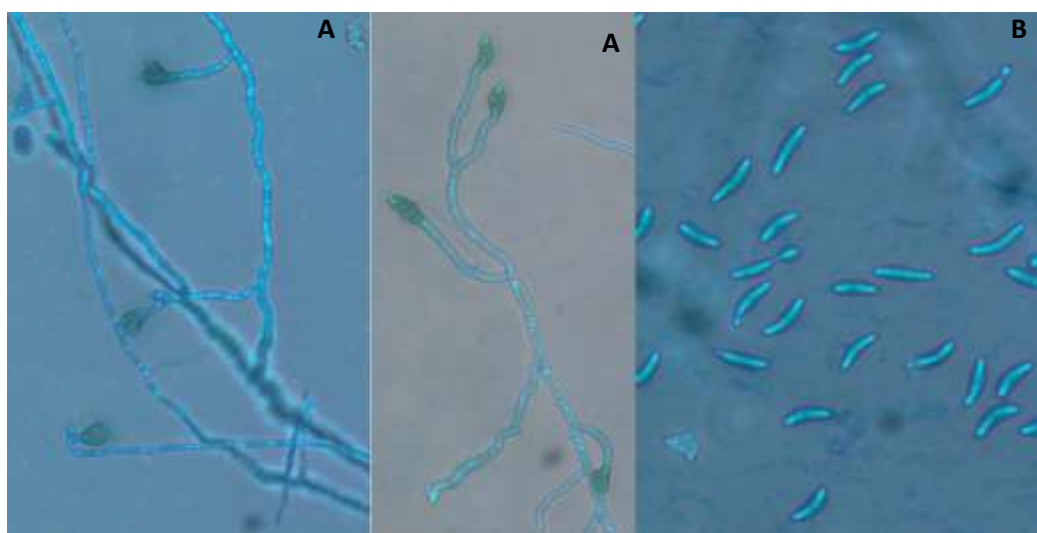


A espécie *C. fructicola* apresentou conídios compridos com as duas extremidades afiladas, curvados, arredondados e hialinos, com valores médios para comprimento e largura de 6,29 – 2,19 μm (Figura 13). Os apressórios

apresentaram-se clavados, irregulares e globosos, com medias de comprimento e largura de 4,71 – 2,97 μm .

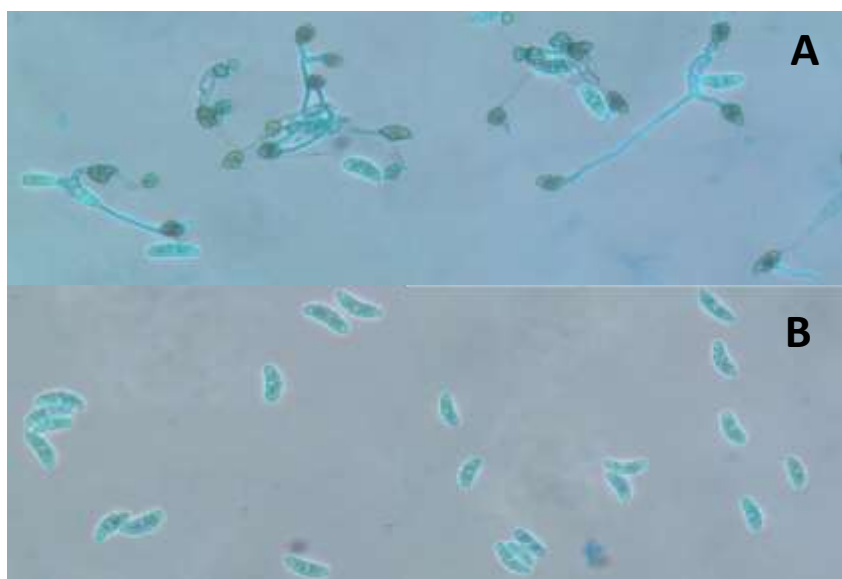
Prihastuti et al.,2009, ao caracterizar espécies de *Colletotrichum* associadas com bagas de café no norte da Tailândia, encontrou resultados semelhantes ao deste trabalho, com conídios hialinos, de formato cilíndrico, com extremidades ligeiramente arredondadas, diferindo nas dimensões que apresentaram 9.7-14 \times 3-4.3 μm e apressórios de coloração marrom, com formatos clavados, oval e irregulares, com dimensões de 4,3-9,7 \times 3.7- 7.3 μm . o mesmo foi encontrado por Jiang et al., 2013, ao relatar pela primeira vez *C. fructicola* em Pêra (*Pyrus bretschneideri*) na China.

Figura 13. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *C. fructicola*. B:conídios e A:apressórios.



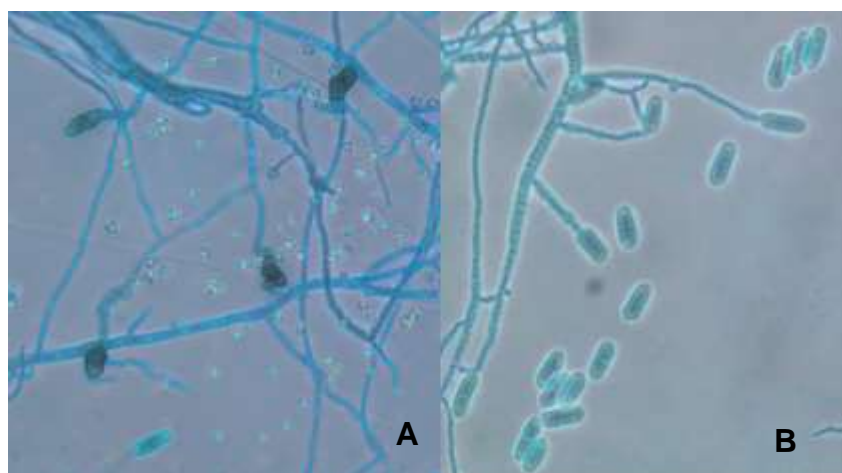
Os conídios da espécie *C. cliviae* são hialinos, ligeiramente curvados, com extremidades estreitas e arredondadas, medindo em comprimento e largura 8,07 – 2,74 μm (Figura 14). Os apressórios apresentaram-se globosos e irregulares com média de comprimento e largura de 4,26 – 3,13 μm . O mesmo foi descrito por Yang et al.,2009 ao estudarem espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose em Amaryllidaceae.

Figura 14. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *C. cliviae*. A: apressórios e B:conídios.



A espécie *Colletotrichum* sp. apresentou conídios retos, cilíndricos com extremidades arredondadas, e média de comprimento e largura de 5,93 – 2,43 μm . Os apressórios apresentaram-se com formato irregular com média de comprimento e largura de 4,71 – 3,39 μm (Figura 15). O mesmo foi relatado por Damm et al.,2012, ao descrever espécies de *Colletotrichum* que pertencem ao complexo boninense.

Figura 15. Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *Colletotrichum* sp.. A: apressórios e B:conídios.

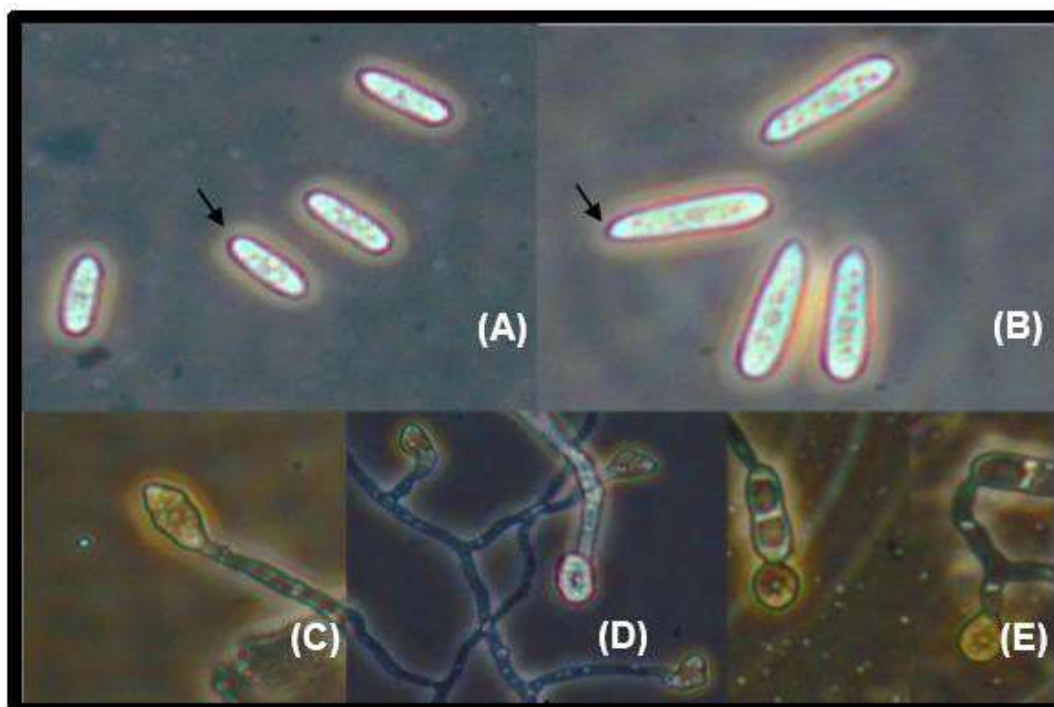


4.5.2. Romã

A espécie *C. fructicola* (R01) apresentou conídios retos, cilíndricos com ápices arredondados, e dimensões de 7,72 - 20,01 x 2,31 - 6,11 μm (Figura 16). Os apressórios apresentaram as formas clavado, irregular e globoso e a média de comprimento e largura foi de 9,2 x 6,6 μm . Prihastuti et al. (2009) ao caracterizar espécies de *Colletotrichum* associadas com bagas de café no norte da Tailândia, encontrou resultados semelhantes ao deste trabalho, com conídios hialinos, de formato cilíndrico, com extremidades ligeiramente arredondadas, diferindo nas dimensões que apresentaram 9.7-14 x 3-4.3 μm e apressórios de coloração marrom, com formatos clavados, oval e irregulares, com dimensões de 4,3-9,7 x 3.7- 7.3 μm . o mesmo foi encontrado por Yang et al. (2009), a partir de lesões em espécie da família *Amaryllidaceae*.

A espécie *C. theobromicola* (R03 e R04) apresentou conídios retos, cilíndricos com ápices arredondados estreitos, sendo um mais estreito que o outro, com dimensões de 12,65 - 21,72 x 3,18 - 6,16 μm (Figura 16), característico da espécie *C. theobromicola* (SUTTON, 1992).

Figura 16. Formato dos conídios e apressórios observado nos isolados. Conídios semelhantes às espécies de *C. fructicola* (A) e *C. theobromicola* (B). Apressórios: clavado (C), irregular (D) e globoso (E).

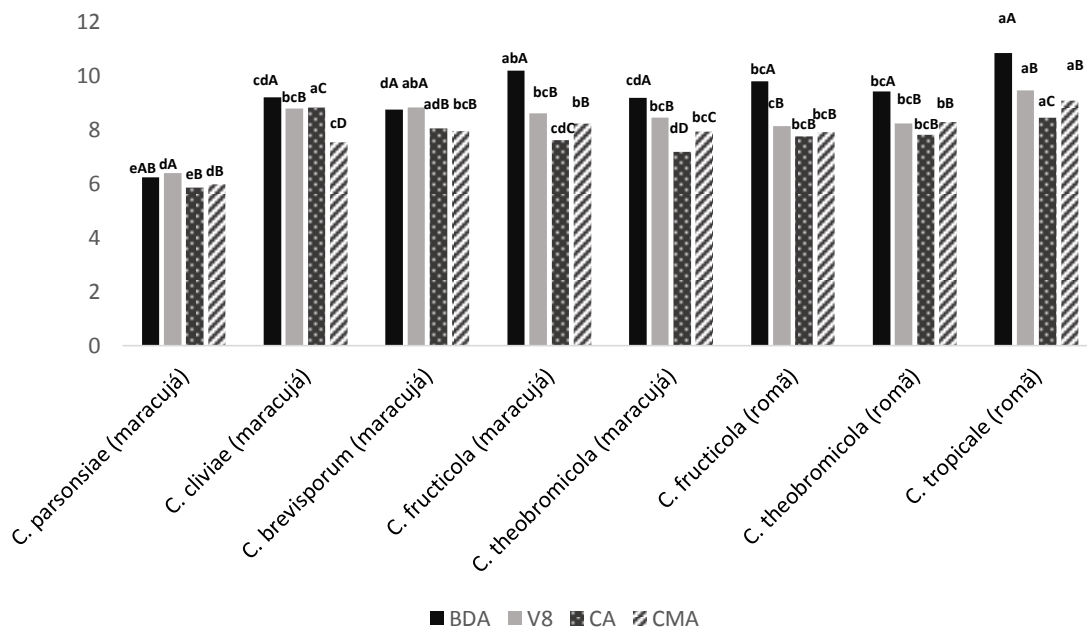


4.6. Caracterização morfofisiológica

A velocidade de crescimento micelial avaliada durante sete dias, nos meios de cultivo Batata-Dextrose-Agar sintético (BDA); suco V8-ágar (V8); cenoura-ágar (CA); e fubá-ágar (CMA), revelaram diferenças de crescimento entre as espécies e os meios em que foram cultivadas. As espécies apresentaram maior crescimento micelial em meio BDA sintético e menor crescimento nos meios de CA e CMA (Figura 17).

A espécie *Colletotrichum* sp., apresentou estatisticamente menor crescimento micelial em relação as outras espécies. No entanto, em relação aos meios de cultura apresentou maior crescimento no meio V-8 e BDA sintético. A espécie *C. tropicale* apresentou maior crescimento micelial em relação as espécies e aos meios de cultivo deste estudo.

Figura 17. Medias do crescimento micelial (cm) de espécies de *Colletotrichum*, em quatro diferentes meios de cultivo, durante sete dias de avaliação.

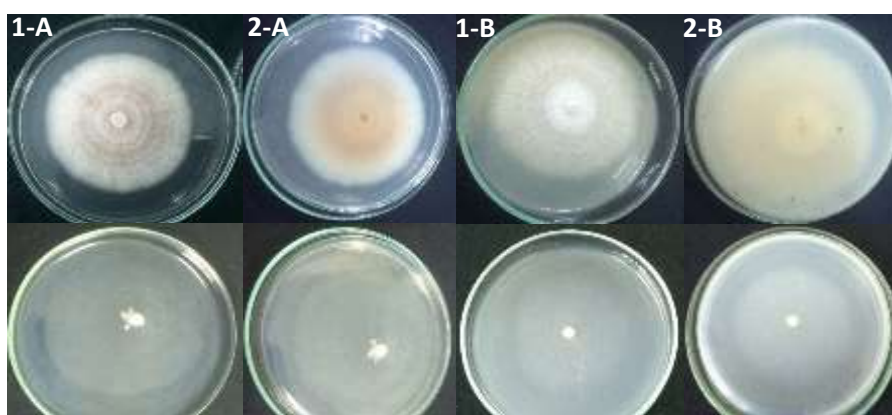


Medias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Medias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao aspecto das colônias, as espécies de *Colletotrichum* spp. apresentaram-se heterogêneas quanto à coloração e topografia micelial nos diferentes meios de cultivo.

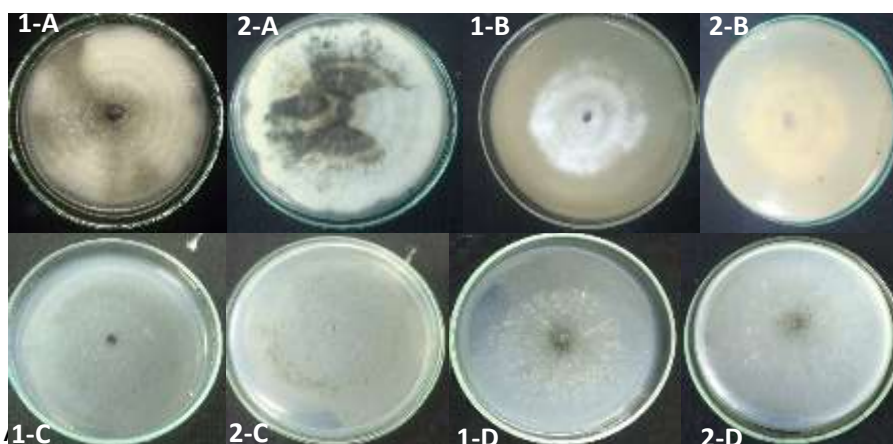
A espécie *Colletotrichum* sp., nos meios BDA sintético e V8, apresentou micélio aéreo cotonoso, com coloração branca e reverso róseo ao centro. Nos de cultura CA e CMA esta espécie apresentou micélio ralo de coloração branca (Figura 18).

Figura 18. Aspecto das colônias da espécie *Colletotrichum* sp. em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).



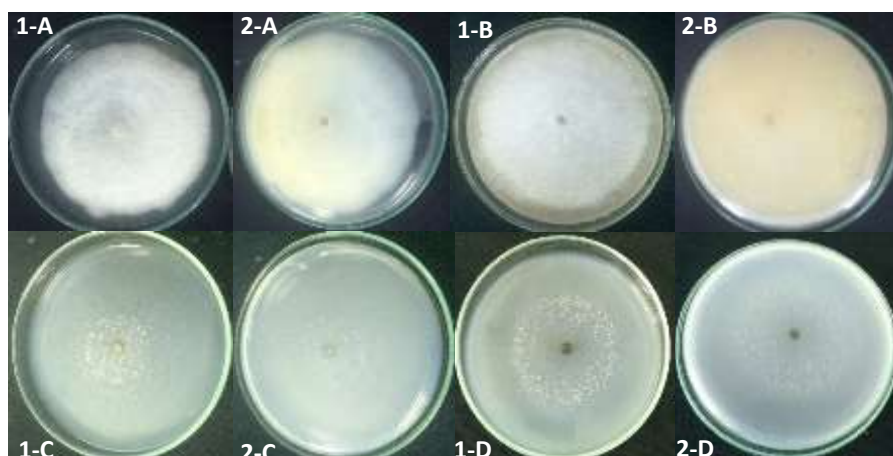
A espécie *C. cliviae*, em meio BDA sintético apresentou colônia de coloração branca e cinza com reverso branco e setores verde escuro. Em meio V8, apresentou colônia branca frente e reverso de aspecto cotonoso. E nos meios CA e CMA apresentaram crescimento micelial ralo de coloração cinza (Figura 20).

Figura 19. Aspecto das colônias da espécie *C. cliviae* em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).



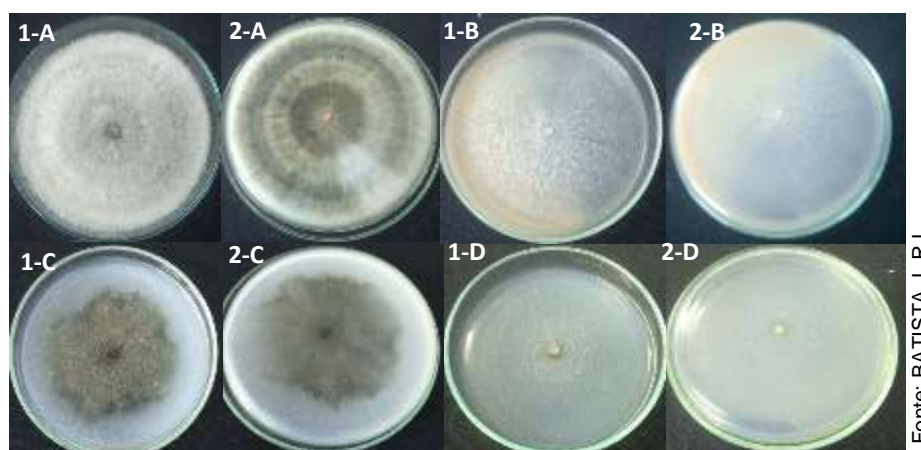
e e reversos nos meios BDA sintético, V8, CA e CMA, porem nos meios BDA e V8 apresentou topografia cotonosa, enquanto nos meios CA e CMA as colônias apresentaram-se ralas (Figura 20).

Figura 20. Aspecto das colônias da espécie *C. brevisporum* em meios: BDA sintético (frente 1- A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).



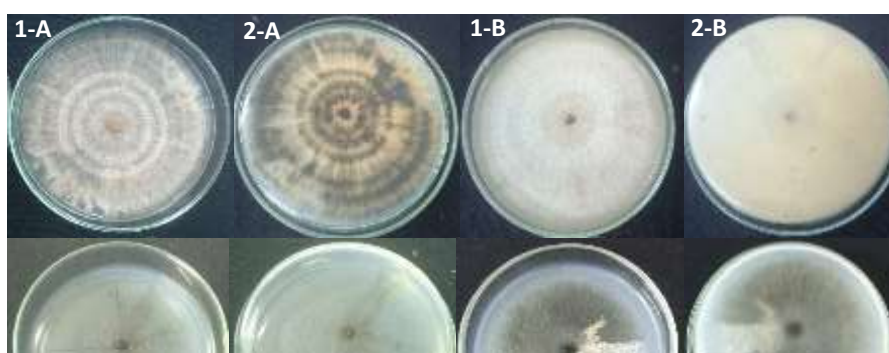
A espécie *C. fructicola*, isolada de frutos de maracujá, apresentou em meio BDA sintético, colônia cotonoso de coloração cinza claro e reverso cinza escuro. Nos meios V8 e CMA apresentou coloração branca frente e reverso e topografia rala. Em meio CA a colônia apresentou coloração cinza escuro frente e reverso (Figura 21).

Figura 21. Aspecto das colônias da espécie *C. fructicola* em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).



A espécie *C. theobromicola*, isolada de frutos de maracujá, apresentou em meio BDA sintético micélio de crescimento moderado, de coloração cinza e reverso esverdeado com abundante esporulação de cor laranja. No meio V8 apresentou coloração branca frente e reverso. Em meio CA a colônia de topografia rala, com coloração cinza escuro frente e reverso. Em meio CMA apresentou colônia frente e reverso de coloração cinza escura com setor branco (Figura 22).

Figura 22. Aspecto das colônias da espécie *C. theobromicola* em meios: BDA sintético (frente 1- A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).



A espécie *C. fructicola*, isolada de frutos de romã, apresentou em meio BDA sintético micélio de crescimento moderado, de coloração branca e reverso marrom claro. Em meio V8 apresentou coloração branca frente e reverso. Em meio CA a colônia de topografia rala, com coloração cinza frente e reverso. Em meio CMA apresentou colônia frente e reverso de coloração cinza escura (Figura 23).

Figura 23. Aspecto das colônias da espécie *C. fructicola*, isolada de frutos de romã, em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).

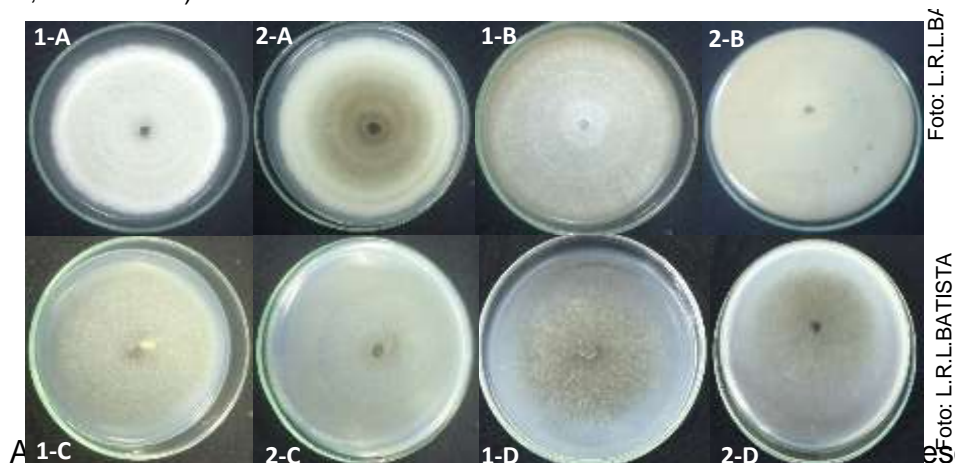
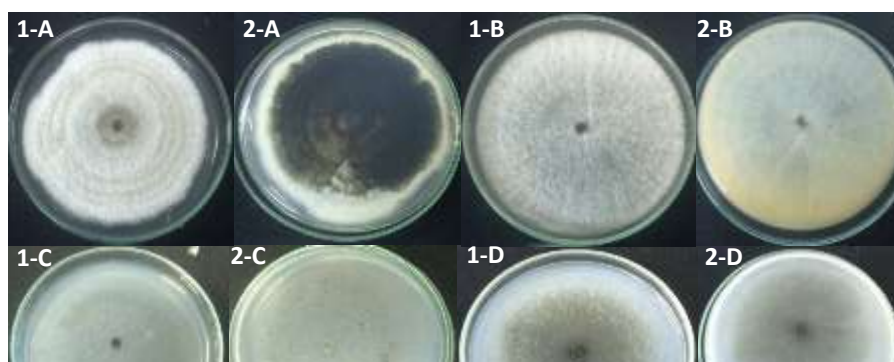


Foto: L.R.L.Bf

Foto: L.R.L.BATISTA

presentou em meio BDA sintético micélio cotonoso, de coloração branca e reverso verde escuro. Em meio V8 apresentou coloração branca frente e reverso. Em meio CA a colônia de topografia rala, com coloração cinza frente e reverso. Em meio CMA apresentou colônia frente e reverso de coloração cinza escura (Figura 24).

Figura 24. Aspecto das colônias da espécie *C. theobromicola*, isolada de frutos de romã, em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).



L.BATISTA

A espécie *C. tropicale*, apresentou em meio BDA sintético, micélio cotonoso, de coloração branca frente e reverso com abundante esporulação de cor laranja ao centro. Em meio V8 apresentou coloração branca frente e reverso, com abundante esporulação de cor laranja em toda placa. Em meio CA a colônia de topografia rala, com coloração branca frente e reverso. Em meio CMA apresentou colônia frente e reverso de coloração cinza claro (Figura 25).

Figura 25. Aspecto das colônias da espécie *C. tropicale*, isolada de frutos de romã, em meios: BDA sintético (frente 1-A, reverso 2-A), V8 (frente 1-B, reverso 2-B), CA (frente 1-C, reverso 2-C) e CMA (frente 1-D, reverso 2-D).

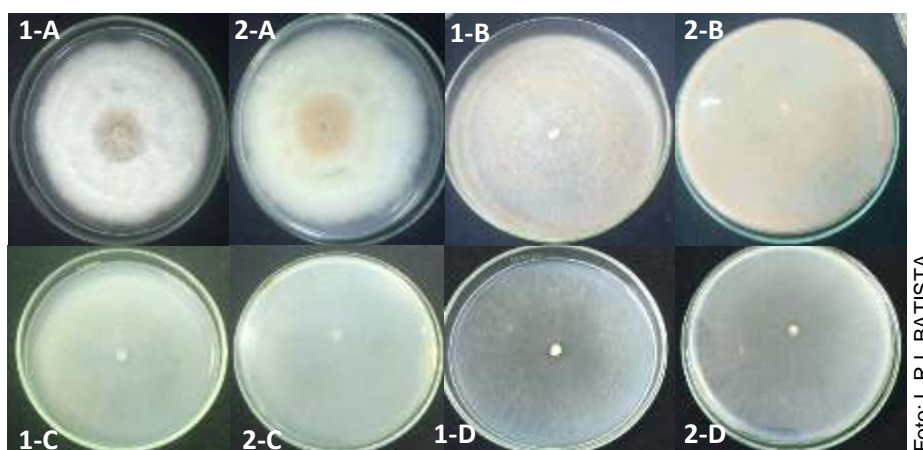


Foto: L.R.L. BATISTA

Assim como neste trabalho, Tozze (2006) ao analisar crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* em diferentes meios de cultura, verificou que o meio BDA apresentou maior crescimento em relação aos meios V8 e caju-ágar. López e Pereira (2010) trabalhando com os meios de cultura BDA, AVEIA e Manthur e isolados de *C. gloeosporioides* de pinha, observaram maior crescimento micelial em BDA, atingindo médias de 90 mm, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

4.7. Patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em diferentes hospedeiros

O teste de patogenicidade cruzada revelou a capacidade de espécies de

Colletotrichum spp., em causar lesões em frutos de mamão, tomate, manga e pimentão (Figura 26).

A espécie *Colletotrichum sp.*, obtida do isolamento em frutos de maracujá, apresentou patogenicidade apenas em frutos de mamão, com maior diâmetro da lesão quando comparadas as outras espécies de *Colletotrichum* patogênicas ao mamão, porém, não diferiu da espécie *C. theobromicola*, também isolada de frutos de maracujá (Tabela 10).

Figura 26. Frutos inoculados com espécies de *Colletotrichum* obtidas de maracujazeiro e romãzeira. (A) Mamão (*Carica papaya* L.), (B) pimentão (*Capsicum Anuum* L.), (C) manga (*Mangifera indica* L.), (D) tomate (*Solanum lycopersicum* L.): 1- *C. fructicola* (isolada romã); 2- *C. theobromicola* (romã); 3- *C. tropicale*; 4- *C. cliviae*; 5- *C. brevisporum*; 6- *Colletotrichum sp.*; 7- *C. fructicola* (isolada de maracujá); 8- *C. theobromicola* (isolado de maracujá).



C. cliviae, foi a única espécie patogênica a todos os hospedeiros do estudo, apresentando maior tamanho da lesão em tomate com 6,85 cm, deferindo estatisticamente dos frutos de mamão, manga e pimentão. O fruto de pimentão foi suscetível apenas a espécie de *C. cliviae*. No entanto, *C. theobromicola* proveniente de maracujá no geral apresentou as maiores lesões nos frutos. (Tabela 10).

Tabela 10. Média do diâmetro das lesões (cm) causada pela infecção cruzada em frutos de mamão (*Carica papaya* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), manga (*Mangifera indica* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.), de espécies de *Colletotrichum* spp. isolados de frutos

Espécies	Diâmetro das lesões (cm)			
	Mamão	Tomate	Manga	Pimentão
<i>Colletotrichum</i> sp.(maracujá)	6,71 a	-	-	-
<i>C. cliviae</i> (maracujá)	4,95 bB	6,85 aA	3,12 dD	4,06 c
<i>C. brevisporum</i> (maracujá)	3,63 c	-	-	

<i>C. fructicola</i> (maracujá)	5,44 bB	5,96 bA	4,18 cC	-
<i>C. theobromicola</i> (maracujá)	6,73 aA	6,18 bA	6,63 aA	-
<i>C. fructicola</i> (romã)	5,63 bA	-	4,57 bcB	-
<i>C. theobromicola</i> (romã)	5,00 bB	6,14 bA	5,04 bB	-
<i>C. tropicale</i> (romã)	5,78 bB	6,20 bA	4,88 bcB	-
CV (%)	11,31	3,58	13,55	8,63

Medias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Medias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As espécies *C. brevisporum* obtidas de frutos de maracujá, apresentaram patogenicidade apenas em frutos de mamão. Dentre as espécies deste estudo *C. brevisporum* apresentou uma das menores médias de tamanho de lesão.

A espécie *C. fructicola*, isolada de frutos de maracujá, apresentou patogenicidade ao mamão, tomate e manga, apresentando maior diâmetro de lesão em frutos de tomate. No entanto, a mesma espécie obtida de frutos de romã, apresentou patogenicidade somente em frutos de mamão e manga, sendo o mamão o hospedeiro em que esta espécie de fungo apresentou maior agressividade.

Uma das principais características do gênero *Colletotrichum* é a não especificidade do patógeno. Segundo Smith e Black, 1990, a caracterização patogênica é um método utilizado por pesquisadores para relatar diversos casos de especificidade, nos quais diversas espécies estão relatadas para um mesmo hospedeiro, porém, o contrário também ocorre, sugerindo a patogenicidade cruzada como um método complementar de diferenciação dos isolados (DEYONES e BAUDRY, 1995; MUNIZ et al. 1998; FURTADO et al., 1999 e PERES et al., 2002).

Há vários relatos de espécies de *Colletotrichum* obtidas de isolamento em determinado frutos, serem patogênicas a uma gama de hospedeiros, como por exemplo, Takahashi, (2008), verificou que todos os isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de atemóia, foram patogênicos quando inoculados

nos frutos de mamão, manga, laranja e banana. Lima Filho, Oliveira e Menezes (2003), também observaram através do teste patogenicidade cruzada suscetibilidade dos frutos de maracujá, banana, caju, manga e mamão, à espécie *C. gloeosporioides*.

5. CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato mundial da ocorrência de *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum cliviae*, *Colletotrichum theobromicola* e *Colletotrichum brevisporum* em folhas e frutos de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*. Deg.

Este é o primeiro relato mundial da ocorrência de *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum tropicale* em frutos de *Punica granatum* L. E o primeiro relato no Brasil de *Colletotrichum theobromicola* em frutos de romã.

Colletotrichum fructicola, *Colletotrichum cliviae*, *Colletotrichum theobromicola* e *Colletotrichum brevisporum* são os agentes causais da antracnose em maracujá nos municípios de São Sebastião e Coruripe do Estado de Alagoas.

Colletotrichum fructicola é o agente causal da antracnose em frutos de romã coletados no estado da Bahia.

Colletotrichum tropicale é o agente causal da antracnose em frutos de romã coletados no estado de Alagoas.

Colletotrichum theobromicola é o agente causal da antracnose em frutos de romã coletados nos estados de Alagoas e Pernambuco.

As espécies *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. cliviae*, *C. brevisporum*, *C. tropicale* apresentaram maior crescimento micelial em meio BDA sintético quando comparadas aos meios V8, CA e CMA.

A espécie *C. brevisporum* obtida do isolamento em frutos de maracujá, apresentou patogenicidade em frutos de mamão.

A espécie *C. cliviae*, obtida do isolamento em frutos de maracujá, apresentou patogenicidade em frutos de mamão, tomate, manga e pimentão.

A espécie *C. fructicola* e *C. theobromicola*, obtida do isolamento em frutos de maracujá e romã, e a espécie *C. tropicale* oriunda de isolados de romãzeira apresentaram patogenicidade em frutos de mamão, tomate e manga.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. **FNP Consultoria & Agroinformativos**, São Paulo, 497 p, 2002. agricultura.gov.br>. 2010. Acesso em: 22 dez 2015.

AGRIOS, G. N. Diseases caused by fungal-like organisms. In: AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5 ed. São Paulo: **Elsevier Academic** Press, 2004. p. 404-414.

AGROFIT. Agrofit: **Sistema de agrotóxicos fitossanitários 2010**. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 15 nov. 2015.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <<http://www.Agronômica Ceres>, p. 467-474. 2005.

ALMEIDA, L.C.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.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. v.1. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704p

ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p.2131, 2007.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 104 p. 2015.

ARAÚJO, F. P. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no semi-árido brasileiro**. 2007. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botocatu, 2007.

BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: **CAB International**. p. 88-120, 1992.

BONETT, L. P. et al. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência**, Guarapuava, v. 6, n. 3, p.451-463, 2010.

BRAGA, L.C. et al. Pomegranate Extract Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth and Subsequent Enterotoxin Production. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.1-2, p.335-9, 2005. BRUCKNER et al., 2005.

BRAGANÇA, C. A. D., **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. Associated with fruits in Brazil**. 2013 Tese (Doutorado em Patologia de plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2013.

BRUCKNER, C. H. et al. Autoincompatibilidade do maracujá - implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 315-338, 2005.

CAI L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Divers**, v.39, p.183-204, 2009.

CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum*- current status and future directions. **Stud Mycol**. v.73, p.181-213, 2012.

CARDOSO, J. E. et al. Ocorrência e controle químico da antracnose em plantio comercial da romãzeira no estado do Ceará. **Comunicado técnico**, Fortaleza: EMBRAPA, 165p. 2011.

CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P.; MOREIRA, R. C.; LIMA, J. S. Ocorrência e controle químico da antracnose em plantio comercial da romãzeira no estado do Ceará. **Comunicado técnico**, Fortaleza: EMBRAPA, 165p. 2011.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in sterile distilled water, for the researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.181-184, 1967.

CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora***. Madrid: Fontqueria XLV, 92 p. 1997.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

COSTA, A. de F. S. et al. Plantio, formação e manejo da cultura do maracujá. In: COSTA, A. de F. S.; COSTA, A. N. de (Ed.). **Tecnologias para a produção de maracujá**. Vitória: INCAPERp. 23-53. , 2005.

COSTA, J. F. de O. **Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas**. 2014. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas (CECA), Rio Largo, 2014.

COSTA, R.V. et al. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v.36, n.2, p.122-128, 2010.

CRISÓSTOMO, L. A; NAUMOV, A. **Aduando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 238 p. 2009.

CROCHEMORE, M. L. et al. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 25, n. 1, p.5-10, 2002.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Mycol.**, v. 73, p.136, 2012.

DAS, A.K. et al. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.205-8, 1999.
de Brasília, Brasília: 2006

Dean R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology** 2012.

DHAWAN, K. et al. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, 94, no.1, p.1-23, 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull.**, v.19, p.11-15, 1987.

ERCISLI, S. et al. The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries grown in Turkey. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 27-33, 2007.

FALEIRO, F. G. et al.. **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**.

Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 315-338. 2005.

Farr, D. F., & A. Y. Rossman. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory**, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>
Acesso em 31 de dez. de 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar - **sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FIRMINO, A.C. et al. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose em plantas de atemóia e colonização do fungo nos frutos. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 40, n. 4, p. 323-328, 2014.

FISCHER, I.H. et al Doenças do Maracujazeiro. In:
KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.;

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia – Diagnóstico e Análise de Variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p 12–16, 2000.

FURLANETO, F.P.B. et al. **Características técnicas e econômicas do cultivo de maracujazeiros**. 2010. Disponível em:<http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/maracuja/index.htm>. Acesso em: 22/12/2015

GANGA, R. M.D. et al. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares faflp1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.

GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. 13ed. São Paulo: Nobel, 446p. 2007. HAYER, J. F. S. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, 2010.

HORA, J.J. et al. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. **Journal of Medicinal Food**, v.6, n.3, p.157- 61, 2003.

HUELSENBECK, J.P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Scienc.**, v.294, p. 2310-2314, 2001.

HUELSENBECK, J.P. et al. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. **Syst. Biol.**, v.51, p. 673-688,. 2002.

HUKKERI, V.I. et al. In vitro antihelmintic activity of aqueous extract of fruit rind of *Punica granatum*. **Fitoterapia**, v.64, n.1, p.69-70, 1993.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRARIA E ESTATÍSTICA.

Produção Agrícola Municipal 2014. Rio de Janeiro: IBGE, 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRARIA E ESTATÍSTICA.

Maracujá: área plantada e quantidade produzida. Brasília: IBGE, 2014.

(Produção Agrícola Municipal em 2013). Disponível em: [https://www.](https://www.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2013/pa)

[ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2013/pa](https://www.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2013/pa)
m2013.pdf. Acesso em: janeiro de 2015.

INDEX FUNGORUN, 2011. Disponível em

<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp?pg=4>. Acesso em: 19 de dez. 2015.

ISHIDA, A. K. N.; Vieira, B. A. H. **Mancha-bacteriana do maracujazeiro: etiologia e estratégias de controle**. Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 23p, 2009.

JAISWAL, V.; DERMARDEROSIAN, A.; PORTER, J. R. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Food Chemistry**, v.118, p.11–16, 2010.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.3, p.412-27, 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V Doenças constatadas na fase pós-colheira. In: Santos Filho HP, Junqueira NTV (Eds.) **Maracujá Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. pp. 32-36, 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V. et al. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência à doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.) **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p. 80-108. 2005.

KAMEI, S. H. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas**. Dissertação (Mestrado em Produção e Proteção Vegetal)-Universidade Federal de Alagoas/Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2011.

KIM, N.D. et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.71, n.3, p.203-17, 2002.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. v2. 4.ed. São Paulo: Agronômica

Ceres, p. 467-474, 2005.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª. Ed. São Paulo SP. Ceres. 2005.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the fungi**. 10 ed. Wallingford: CABI Europe – UK, 2008.

KOHNO, H. et al. Pomegranate seed oil rich in conjugated linoleic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats . **Cancer Science**, v.95, n.6, p.481-6, 2004.

KUDO, A. S. **Reação de genótipos de maracujazeiro azedo a *Septoria passiflorae* e a *Cladosporium herbarum***. 2004. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2004.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, v.321, n.4, p.1153-4, 2000.

LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C. Botânica do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1., 1971. Campinas. **Resumos...** Campinas: SBF, 13 p. 1974.

LI, H.N. First Report of *Colletotrichum fructicola* Causing Bitter Rot of Pear (*Pyrus bretschneideri*) in China. **Plant Disease**, V. 97, N. 7, p. 2013.

LI, Y. et al. E. Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. **Phytotherapy Research**, v.18, n.9, p.718-22, 2004.

LOPES, S.C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, p. 201-209. 1991.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil** – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1088p. 2001.

MACHADO, T.B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, n.3, p.279-84, 2002.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Podridão do fruto, novo sintoma relacionado a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 68, n. 2, p. 121-123, 2001.

MANICA, I. **Fruticultura tropical: maracujá**. São Paulo: Agronômica Ceres, 151 p, 1981.

MARTIN, F. W.; NAKASONE, H. Y. The edible species of Passiflora. **Economic Botany**, New York, v. 24, p. 333-343, 1970.

MARTINS, I. **Reação de progênies de maracujazeiro-amarelo ao *Colletotrichum gloesporioides* e biocontrole da antracnose com *Trichoderma* spp** 2006, 137 p. (Dissertação de Mestrado) Faculdade De Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília: 2006

MAU, B. et al. Bayesian phylogenetic inference via markov chain Monte carlo methods. **Biometrics**, v.55, p.1-12. 1999.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 083-091, Outubro 2011.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá, germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-78.2005.

MELETTI, L.M.M. et al. **Maracujá**. Jaboticabal: FUNEP, (Série Frutas Nativas, 6), 2010.

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

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

MOREIRA, I. S. et al. Biometria e componentes físico-químicos de romã armazenada sob refrigeração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 209-215, 2015.

MORI-OKAMOTO, J. et al. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, n.1, p.93-101, 2004.

MOUHAJIR, F. et al. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used

by Berber peoples of Morocco. **Pharmaceutical Biology**, v.39, n.5, p.364-74, 2001.

NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases . **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p.143-7, 1996.

NEURATH, A.R. et al. Punica granatum (pomegranate) juice provides an HIV-I entry inhibitor and candidate topical microbicide. **BMC Infectious Diseases**, v.4, n.41, p.1-12, 2004.

NODA, Y. et al. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding and pelargonidin. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, DC, v. 50, n. 1, p. 166-171, 2002.

NOIREUNG, P. et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Mycol.**, v. 33, n.3, 2012.

OLIVEIRA, J. C. et al. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB : DFZ, p. 27–37, 1994.

PAUL, N. C. et al. Endophytic fungi from *Lycium chinense* Mill and characterization of two new Korean records of *Colletotrichum*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 9, p. 15272-15286, 2014.

PENG, L. et al. *Colletotrichum* species on citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptog. Mycolog.**, v.33, p.267-283, 2012.

PEREIRA, J.V. et al. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da Punica granatum Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana . **Revista Periodontia**, v.12, n.4, p.57-64, 2001.

PEREIRA, N.A. Plants as hypoglycemic agents. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5/6, p.354-8, 1997.

PEREZ, C.; SUAREZ, C. Antifungal activity of Plants Extracts against *Candida albicans*. *American Journal of Chinese Medicine*, v.25, n.2, p.181-4, 1997.

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Indonésia, v. 44, n.1, p. 33-43, 2010.

POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Syst Biol.**, v.53, p.793-808, 2004.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fung. Divers.**, v. 39, p.89-109, 2009.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc. 491 p., 2002.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**. v.43, p.304-311, 1996.

ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with Theobroma cacao and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycolog.** 102:1318–1338, 2010.

RUGGIERO, C. et al. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. (Embrapa_SPI. Publicações Técnicas Frupepex, n.19), Brasília, Embrapa-SPI, 64 p. 1996.

RUGGIERO, C. **Situação do maracujazeiro no Brasil**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 21, p. 5-9, 2000.

SÁNCHEZ, A. C.; BARRACHINA, A. A. C. **A fruta romã cultivada em Espanha: punicalagina antioxidante do sumo de romã e o extrato de romã, na alimentação funcional do futuro**. Disponível em: <<http://granatumplus.pt/afrutaroma/>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

SANTIAGO, M. C. P. de A. **Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.)**. – 2014. f.135. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SERRA, I. M. R. de S.; SILVA, G. S. da. Caracterização Morfofisiológica de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Agentes de Antracnose em Frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 475-480. 2004.

SERRANO, M. **La Granada: maduración y post-recolección. I Jornadas Nacionales sobre el granado**. Disponível em: < www.poscosecha.com >. Acesso em: 15 dez. de 2012.

SHARMA, G. et al. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Curr. Res. in Envir. & App. Mycol.** v. 3, n. 2, p. 194–220. Oct., 2013.

SILVA, A. C.; SÃO JOSÉ, A. R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista, BA:

UESB, p. 1-5. 1994.

SILVA, K. S. et al. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 131-133, 2006.

SILVA, M. R. L. et al. Estudo da agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* proveniente de frutos e flores de cafeeiro. In: **SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, 7. 2011, Araxá. Articulação em Redes de Pesquisa e Novas Fronteiras do Conhecimento. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/4016/230.pdf?sequence=2>>. Acesso em: 15 agosto 2015.

SKIPP, R.A.; BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, E.H.A. & SOARES, J. L. **Dicionário etimológico e circunstanciado de biologia**. São Paulo: Scipione, 534 p.1995.

SOUZA, B. O. de; SOUZA, E. A. de; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciênc. e Agrotéc.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, 2007

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (eds.) *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control*. Wallingford. CAB International, p. 1-26, 1992.

SUTTON, B.C. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. **The Coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 696p,1980.

TAKAHASHI, L. M. **Identificação de *Colletotrichum gloeosporioides* de atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica**. 2008.48f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Botucatu,2008.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecul. Biol. and Evolut.** v.28, n.10, p. 2731 – 2739, 2011.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, V.29, p.51-655, 2004.

TOMAZ, A. Planejamento é fundamental para o sucesso no cultivo do maracujá. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.33, n.269. p.4-5, 2012.

TU, J. C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean: Population dynamics of the pathogen and breeding for resistance in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and M. J. Jeger, p. 203-224, 1992.

TYAGI, S. et al. Punicalagins - A Large Polyphenol Compounds Found in Pomegranates: A Therapeutic Review. *Academic Journal of Plant Sciences*, v.5, n.2, p.45-49, 2012.

URASHIMA, A. S. **Aspectos fenológicos do maracujazeiro amarelo** (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.). 1985. 83 f. Dissertação (Mestrado Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 1985.

VAN ELSWIJK, D.A. et al. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry . *Phytochemistry*, v.65, n.2, p.233-41, 2004.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Massachusetts: MIT Press, 224p,1996.
VASCONCELOS, L.C. et al. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis . *Mycoses*, v.46, n.5-6, p.192-6, 2003.

VIANA, F. M.P. et al. **Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle**. Fortaleza: EMBRAPA – Agroindustrial Tropical, 11p. (Comunicado técnico 86). 2003.

VIDA, J.B. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on peach palm fruits in Minas Gerais and Paraná States, Brazil. *Summa Phytopatholog.*, Botucatu, v.32, n.4, p.379380, 2006.

VIEIRA, W. A. S.; NASCIMENTO, R. J.; MICHEREFF, S. J. First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. *Plant Dis.* v. 97, n. 12, p.1659. Dec., 2013.

WEIR, B.S., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol.* v.73, p.115-180, 2012.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fung. Diver.* v. 39, p. 123-146, 2009.

ZAUZA, E. A. V., ALFENAS, A. C., MAFIA, G. R. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, C. A. & MAFIA, R. G. (eds.). Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, p. 42, 2007.