

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

**JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA COMPARATIVA DE  
ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ANONÁCEAS NO ESTADO DE  
ALAGOAS**

**RIO LARGO**

**2014**

**JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA COMPARATIVA DE  
ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ANONÁCEAS NO ESTADO DE  
ALAGOAS**

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

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Profa. Dra. Iraildes Pereira Assunção

Profa. Dra. Kamila Correia Câmara

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

RIO LARGO

2014

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

C837c

Costa, Jaqueline Figueredo de Oliveira.

Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas / Jaqueline Figueredo de Oliveira Costa. – 2014.

110 f. : il.

Orientadora: Iraildes Pereira Assunção.

Coorientadores: Kamila Câmara Corrêa, Gaus Silvestre de Andrade Lima.  
Tese (Doutorado em Proteção de plantas) – Universidade Federal de Alagoas.  
Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Fungicidas. 2. Ácido salicilhidroxâmico. 3. *Annona squamosa*.  
4. Multilocus. 5. Pinhas. 6. Graviola – Doenças e pragas I. Título.

CDU: 632.4:634.41

## **Folha de Aprovação**

JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA COSTA

### **CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA COMPARATIVA DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* EM ANONÁCEAS NO ESTADO DE ALAGOAS**

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas e **Aprovada** em 18 de dezembro de 2014.

---

Profa Dra Iraildes Pereira Assunção (UFAL)  
(Orientadora)

Banca examinadora:

---

Profa Dra Kamila Câmara Correia (UFC) (Examinador externo)

---

Profa Dra Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva (UFAL) (Examinador externo)

---

Profa Dra Edna Peixoto da Rocha Amorim (UFAL) (Examinador interno)

*Ao meu filho Tales Figueiredo Moreira Costa,  
Que tanto amo;*

*Ao meu esposo Mario Leandro da Costa Júnior, que  
Sempre me incentivou;*

*Aos meus pais Vicente Barbosa de Oliveira e Maria Figueiredo  
de Oliveira, que  
Sempre me apoiaram;*

*Aos meus irmãos Taciana e Jailton Figueiredo, que  
Sempre confiaram em mim;*

*E a DEUS que sempre ilumina meus caminhos*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pelas bênçãos recebidas durante toda a minha vida;*

*Aos Profs. Drs. Iraíldes Pereira Assunção e Gaus Silvestre de Andrade Lima pela atenção, amizade, orientação, ensinamentos que contribuíram para minha formação;*

*Aos Profs. Drs. Fátima Muniz, Gildemberg, Edna Peixoto pelos valiosos ensinamentos e apoio para realização deste trabalho;*

*Ao Prof. Dr. Sami Michereff por disponibilizar os fungicidas para realização do trabalho;*

*À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;*

*Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias, pelos ensinamentos;*

*Aos funcionários da Secretaria da pós-graduação, Geraldo de Lima, Marcos Antônio Lopes e Michele Cristina pela convivência;*

*Aos amigos Edlene Moraes, Janaine Rossane, Joseani Castro, Maria Quitéria, Mayra Ferro, Maria Lousane, Deise Rocha, Dayanne Uchôa e Sarah Cavalcanti pela amizade, carinho, incentivo e grande apoio dado ao trabalho;*

*Aos que fazem parte do Laboratório de Fitopatologia Molecular, por todo apoio e ótima convivência;*

*A Profa Dra Kamila Câmara pelas valiosas sugestões durante o trabalho e por aceitar o convite para participar da banca;*

*Aos Drs. Danilo Pinho, Roberto e Leonardo pelas sugestões e ensinamentos.*

*Aos colegas e amigos da pós-graduação, Ellen Carine Neves Valente, Joseani Castro da Silva, Deyse Ferreira Rocha, Danilo César Oliveira, Wellington Costa da Silva, Jorge Portella, Maria Quitéria Santos, pelo excelente convívio durante a realização do curso;*

*Aos produtores de anonáceas do Estado de Alagoas os quais tive a oportunidade de conhecer e realizar as coletas do material para realização desse trabalho em suas áreas de produção.*

## RESUMO

A antracnose é uma importante doença das anonáceas. Causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, é um dos fatores limitantes à produção devido ao ataque severo nas folhas, frutos, flores e pecíolo. No Brasil, *Colletotrichum gloeosporioides* foi relatada sendo agente etiológico associada à antracnose em anonáceas. Os objetivos desse trabalho foram identificar por meio da caracterização molecular e morfocultural espécies de *Colletotrichum* em anonáceas, bem como avaliar a influência da temperatura na intensidade da doença, o efeito de fungicidas e do ácido salicilhidroxâmico sobre o crescimento micelial destas espécies. Isolados de espécies de *Colletotrichum*, obtidas de folhas apresentando sintomas típicos da doença, foram coletados nos municípios de Maceió, Palmeira dos Índios, Arapiraca, Igaci, Delmiro Gouveia, Estrela de Alagoas e Maragogi. A caracterização molecular foi realizada com noventa isolados onde foram analisados com sequências do gene gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), como medida inicial da diversidade genética. Tinta isolados foram selecionados para representar a gama de diversidade genética e origem geográfica para serem posteriormente sequenciados com os genes, chitin sintase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2) e a região ITS-rDNA. A caracterização cultural foi realizada mediante a mensuração do crescimento micelial dos isolados a 25°C e aspectos das colônias. A caracterização morfológica foi realizada através de medições de conídios e apressórios. A análise da sequencia multilocus, juntamente com as características morfoculturais foi possível comprovar que pelo menos cinco espécies de *Colletotrichum* são responsáveis por causar antracnose em pinha e graviola no estado de Alagoas: *C. karstii*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. theobromicola* e *C. fructicola*. As espécies de *Colletotrichum* apresentaram maior tamanho da lesão à temperatura de 25°C. *Colletotrichum tropicale* foi a espécie que obteve um maior desenvolvimento micelial na concentração de 10 $\mu$ g i.a.ml<sup>-1</sup> quando comparada com as outras espécies. Os fungicidas difenoconazole e tiofanato metílico foi o que teve melhor desempenho no controle in vitro das espécies de *Colletotrichum*, porém, todas as espécies apresentaram crescimento reduzido na presença dos fungicidas independente do princípio ativo. O fungicida azoxistrobina na presença do ácido salicilhidroxâmico inibiu o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum*.

**Palavras-chave:** *Annona squamosa*. *Annona muricata*. Multilocus. Fungicidas. Ácido salicilhidroxâmico. Azoxistrobina.

## ABSTRACT

Anthrachnose is an important disease of Annonaceae. Caused by species of the genus *Colletotrichum*, is one of the limiting factors of production due to severe attack on leaves, fruits, flowers and petiole. In Brazil, *Colletotrichum gloeosporioides* was reported as etiologic agent associated with anthracnose in Annonaceae. The objectives of this study were to identify by molecular characterization and Morphocultural species of *Colletotrichum* in *Annonaceae*, to evaluate the influence of temperature on disease intensity, and the effect of fungicides and salicilhidroxâmico acid on the mycelial growth of these species. *Colletotrichum* isolates, obtained from leaves showing typical disease symptoms, were collected in Maceio, Palmeira dos Indios, Arapiraca, Igaci, Delmiro Gouveia, Estrela de Alagoas and Maragogi municipalities. Molecular characterization was carried out with ninety isolates which glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) was sequenced and analyzed as **an initial measure genetic diversity**. Thirty isolates were selected to represent genetic diversity range and geographical origin by sequencing chitin syntase (CHS-1) and  $\beta$ -tubulin (TUB2) genes and rDNA-ITS region. Cultural characterization was performed by mensuration mycelial growth at 25 °C and colonies aspects. Morphological characterization was performed through measurements of conidia and apressoria. Analysis of multilocus sequence, together with **morfoculturais** characteristics was possible to prove that at least five *Colletotrichum* species are responsible for causing anthracnose in cone and soursop in Alagoas state: *C. karstii*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. theobromicola* and *C. fructicola*. *Colletotrichum* species showed greater lesion size at 25 °C. *Colletotrichum tropicale* was the species that obtained a higher mycelial growth at 10mg ml<sup>-1</sup> concentration compared with other species. The difenoconazole and thiophanate methyl fungicides showed the best *in vitro* control of *Colletotrichum* species, however, all species showed reduced growth in the presence of fungicides independent of their ingredient active. The fungicide azoxystrobin in presence of ácido salicilhidroxâmico inhibited the mycelial growth of *Colletotrichum* species.

**Keywords:** Annona squamosa. Annona muricata. Multilocus. Fungicidas. Salicilhidroxâmico. Ácido. Azoxistrobina.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - | Folhas de graviola (A) e pinha (B) apresentando lesões típicas de antracnose.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 46 |
| Figura 2 - | Teste de patogenicidade em folhas de pinha (A) e graviola (B)..                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 57 |
| Figura 3-  | Árvore filogenética de Inferência Bayseana com isolados de <i>Colletotrichum</i> do complexo gloeosporioides, usando o gene GAPDH. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de <i>Colletotrichum</i> de anonáceas. <i>Colletotrichum boninense</i> foi usado como outgroup.....                                                                      | 59 |
| Figura 4-  | Árvore filogenética de Inferência Bayseana com isolados de <i>Colletotrichum</i> do complexo boninense, usando o gene GAPDH. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de <i>Colletotrichum</i> de anonáceas. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> foi usado como outgroup.....                                                                      | 60 |
| Figura 5-  | Árvore filogenética de Inferência Bayseana com 24 isolados de <i>Colletotrichum</i> do complexo gloeosporioides, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, CHS-1, TUB-2 e ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de <i>Colletotrichum</i> de anonáceas. <i>Colletotrichum boninense</i> foi usado como outgroup..... | 63 |
| Figura 6-  | Árvore filogenética de Inferência Bayseana com 6 isolados de <i>Colletotrichum</i> do complexo boninense, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, CHS-1, TUB-2 e ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de <i>Colletotrichum</i> de anonáceas. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> foi usado como outgroup.....  | 67 |
| Figura 7 - | Aspecto dos seis morfogrupos de isolados de <i>Colletotrichum</i> cultivados em meio BDA, observadas ao 7º dia. Placas A: frente e B: verso.....                                                                                                                                                                                                                  | 69 |
| Figura 8-  | Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>Colletotrichum theobromicola</i> . A. apressórios (G22G); B-C-D. conídios e apressórios (G10A; P27I; P46aI), respectivamente.....                                                                                                                                       | 71 |
| Figura 9 - | Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>C. tropicale</i> e <i>C. siamense</i> . A-B-C. conídios e apressórios (G5aM; G1bM).....                                                                                                                                                                                 | 72 |

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 10 - | Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>Colletotrichum karstii</i> . A. conídios (G5aD); B. conídios e apressórios (G5aD); C. apressórios (P40I).....                                                                                                                                    | 73 |
| Figura 11-  | Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie <i>Colletotrichum fructicola</i> . A. conídio germinando (P6P); B. Apressorio (G3G); C. conídios: D-E.conídios e apressórios (G14bG; G1G).....                                                                                                      | 74 |
| Figura 12 - | Influência da temperatura (tamanho da lesão) em folhas de anonáceas ( <i>A. muricata</i> e <i>A. squamosa</i> ) de cinco espécies de <i>Colletotrichum</i> associados a antracnose no estado de Alagoas....                                                                                                                                | 95 |
| Figura 13-  | Sensibilidade de cinco espécies de <i>Colletotrichum</i> associadas a antracnose de anonáceas aos fungicidas difenoconazole, tiofanato metílico, e azoxistrobina nas concentrações 10, 1 e 0.5 µg de i.a.ml <sup>-1</sup> aos 7 dias de crescimento micelial (cm). As barras representam as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5%..... | 98 |

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                                                                                                                      |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1-  | Primers utilizados no estudo.....                                                                                                                                                    | 50 |
| Tabela 2-  | Isolados do complexo gloeosporioides incluídos na análise de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.....     | 52 |
| Tabela 3-  | Isolados do complexo boninense incluídos na análise de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.....           | 54 |
| Tabela 4-  | Modelo de substituição selecionado para os genes através do programa MrModeltest 2.3.....                                                                                            | 66 |
| Tabela 5-  | Médias de comprimento e largura de conídios e apressórios, velocidade de crescimento micelial de isolados de <i>Colletotrichum</i> .....                                             | 75 |
| Tabela 6 - | Isolados das cinco espécies de <i>Colletotrichum</i> obtidos de folha de pinheira (var. Crioula) e gravoieira (var. Morada), provenientes de plantios nos municípios de Alagoas..... | 90 |

## SUMÁRIO

|            |                                                                                                                       |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                                                                                          | <b>14</b> |
| <b>2</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                    | <b>16</b> |
| <b>2.1</b> | <b>As anonáceas .....</b>                                                                                             | <b>16</b> |
| <b>2.2</b> | <b>A cultura da graviroleira.....</b>                                                                                 | <b>17</b> |
| 2.2.1      | Aspectos botânicos da graviroleira.....                                                                               | 18        |
| 2.2.2      | Importância econômica da graviroleira.....                                                                            | 20        |
| <b>2.3</b> | <b>A cultura da pinheira.....</b>                                                                                     | <b>20</b> |
| 2.3.1      | Aspectos botânicos da pinheira.....                                                                                   | 22        |
| 2.3.2      | Importância econômica da pinheira.....                                                                                | 23        |
| 2.3.3      | Aspectos fitossanitários da graviroleira e pinheira.....                                                              | 23        |
| <b>2.4</b> | <b>Antracnose.....</b>                                                                                                | <b>24</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Controle da antracnose em anonáceas.....</b>                                                                       | <b>26</b> |
| <b>2.6</b> | <b>O Gênero <i>Colletotrichum</i>.....</b>                                                                            | <b>27</b> |
| <b>2.7</b> | <b>Identificação de espécies de <i>Colletotrichum</i> .....</b>                                                       | <b>30</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                               | <b>32</b> |
| <b>3</b>   | <b>CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> ASSOCIADAS À ANTRACNOSE EM FOLHAS DE PINHA E GRAVIOLA.....</b> | <b>42</b> |
| <b>3.1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                               | <b>44</b> |
| <b>3.2</b> | <b>METODOLOGIA.....</b>                                                                                               | <b>46</b> |
| 3.2.1      | Amostragem, obtenção e preservação dos isolados.....                                                                  | 46        |
| 3.2.2      | Caracterização da patogenicidade.....                                                                                 | 47        |
| 3.2.3      | Caracterização molecular.....                                                                                         | 48        |
| 3.2.3.1    | Extração de DNA.....                                                                                                  | 48        |
| 3.2.3.2    | Amplificação, Purificação e Sequenciamento do DNA.....                                                                | 49        |
| 3.2.4      | Análises Filogenéticas.....                                                                                           | 50        |
| 3.2.5      | Estudos morfológicos das espécies de <i>Colletotrichum</i> .....                                                      | 55        |
| <b>3.3</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                    | <b>57</b> |
| 3.3.1      | Caracterização da patogenicidade .....                                                                                | 57        |
| 3.3.2      | Caracterização molecular .....                                                                                        | 57        |
| 3.3.3      | Estudos morfológicos das espécies de <i>Colletotrichum</i> .....                                                      | 68        |
| <b>3.4</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                | <b>76</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                               | <b>77</b> |

|                                                                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4. EPIDEMIOLOGIA COMPARATIVA DE ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> ASSOCIADAS À ANTRACNOSE DE ANONÁCEAS NO ESTADO DE ALAGOAS.....</b> | <b>86</b>  |
| <b>4.1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                              | <b>89</b>  |
| <b>4.2 METODOLOGIA.....</b>                                                                                                             | <b>90</b>  |
| 4.2.1 Isolados fúngicos.....                                                                                                            | 91         |
| 4.2.2 Influência de diferentes temperaturas na intensidade da antracnose induzida por espécies de <i>Colletotrichum</i> .....           | 92         |
| 4.2.3 Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial das espécies de <i>Colletotrichum</i> .....                                     | 92         |
| 4.2.4 Teste de Sensibilidade ao Ácido Salicilhidroxâmico (SHAM).....                                                                    | 93         |
| 4.2.5 Análise dos dados.....                                                                                                            |            |
| <b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                  | <b>94</b>  |
| 4.3.1 Influência de diferentes temperaturas na intensidade da antracnose induzida por espécies de <i>Colletotrichum</i> .....           | 95         |
| 4.3.2 Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial das espécies de <i>Colletotrichum</i> .....                                     | 96         |
| 4.3.3 Teste de Sensibilidade ao Ácido Salicilhidroxâmico (SHAM).....                                                                    | 100        |
| <b>4.4 CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                              | <b>102</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                 | <b>101</b> |
| <b>ANEXOS</b>                                                                                                                           |            |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As anonáceas são dicotiledôneas pertencentes à Família Annonaceae, que engloba um grupo de frutíferas de importância econômica no Brasil e em várias regiões do mundo, embora a distribuição esteja restrita a alguns países, como Chile, México, Venezuela e Austrália. Compreende cerca de 132 gêneros e 2500 espécies, das quais aproximadamente 250 ocorrem no Brasil. Os gêneros mais importantes são *Rollinia* St.-Hill e *Annona* L., com destaque maior para este último que agrupa as principais espécies cultivadas (KAVATI, 1992; JESSUP, 1988; SAUQUET et al., 2003)

As espécies com maior potencial econômico são a pinha (*A. squamosa* L.), a graviola (*A. muricata* L.), a cherimóia (*A. cherimola* Mill.) e a atemóia (*A. cherimola* x *A. squamosa*). E ainda, com menor expressão, a condessa (*A. reticulata* L.) e o beribá (*Rollinia mucosa* Baill.) (JOSÉ et al., 1997).

No Brasil, estas culturas são encontradas desde o Norte até o Sul do país, mas foi na região semiárida do Nordeste que o cultivo se espalhou, devido às condições climáticas bastante favoráveis (RIBEIRO et al., 2007). As principais espécies são a pinha e a graviola (DONADIO, 1997), naturais de clima tropical, mais encontradas nos Estados da Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Alagoas. Destaque também para a atemóia e a cherimóia, mais adaptadas ao clima subtropical, cultivadas em São Paulo e Minas Gerais, e que possuem alto valor comercial no mercado nacional e internacional (KAVATI, 1992).

Os frutos são comercializados principalmente na produção de polpas para sucos e para o consumo da fruta fresca. Sua importância se deve principalmente à riqueza de vitaminas e sais minerais, como cálcio, ferro, fósforo, potássio e magnésio. Ainda, apresenta conteúdo de gordura muito baixo e conteúdo nulo de colesterol (MANICA et al., 2003; LOPEZ, 2005).

A produção para a comercialização no Brasil tem sido uma importante alternativa do agronegócio (JOSÉ et al., 1997). Esse interesse pelo cultivo é devido ao alto preço que se pode alcançar no mercado. Assim, ainda há um grande espaço a ser explorado no mercado interno e externo, já que as anonáceas agradam ao paladar do mercado americano, europeu e asiático. No entanto, há ainda carência de padronização e qualidade dos frutos, prejudicando assim as exportações brasileiras e impedindo maiores valores no mercado interno (NEVES, 1997).

As culturas da pinha e da graviola no Brasil estão sujeitas a várias doenças, sendo a antracnose aquela que causa os maiores prejuízos, tendo com agente causal

espécies do gênero *Colletotrichum*. O fungo incide sobre folhas, ramos e frutos, em diversas fases do desenvolvimento, ocasionando manchas escuras que podem coalescer. Além de reduzir a produtividade e desqualificar comercialmente as frutas, provoca ferimentos ou lesões que favorecem a infestação de fungos oportunistas e insetos pragas (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014). As espécies de *Colletotrichum* cresce satisfatoriamente na faixa de 20-30°C. A temperatura ótima para crescimento vegetativo pode diferir da ótima para esporulação (ZAUZA, ALFENAS, MAFIA, 2007).

A busca de tecnologias para o aumento da produção de alimentos torna-se necessário, devido ao aumento da população mundial. Tais tecnologias visam combater alguns fatores que são limitantes à produção agrícola, como é o caso de doenças, pragas e plantas daninhas. Para o combate a doenças, os produtos químicos é a tecnologia mais usada nos plantios comerciais (GHINI, KIMATI, 2000).

Assim, a fim de contribuir para o melhor conhecimento das espécies causadoras de antracnose que incidem sobre as culturas da pinha e graviola no Estado de Alagoas, os objetivos deste trabalho foram identificar por meio de características molecular e morfocultural espécies de *Colletotrichum* associadas a anonáceas, bem como avaliar a influência da temperatura na intensidade da doença, o efeito de fungicidas e do ácido salicíclídico sobre o crescimento micelial destas espécies.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 As anonáceas

As anonáceas, pertencem à Família Annonaceae, com distribuição pantropical, apesar de ser mais encontrada em clima tropical e subtropical (DONADIO, 1997), e raramente em condições temperadas (SILVA, SILVA, 1997). As regiões das Américas Central e do Sul, da Ásia e da África são os principais centros de diversidade da Família (HEUSDEN, 1992). No Brasil, a cultura apresenta boa adaptação à diversidade climática, podendo ser encontrados pomares comerciais em todas as regiões do país (VIANA, 2005).

Annonaceae é a principal família de Magnoliales e apresenta cerca de 135 gêneros e 2500 espécies de arbustos, arvoretas e árvores (JESSUP, 1988; SAUQUET et al., 2003). No entanto, apenas os gêneros *Annona*, *Rollinia* e *Albernonia* produzem frutos comestíveis e os dois primeiros possuem maior importância comercial (FECHINE et al., 2002; MANICA et al., 2003; MOSCA, 2006).

O gênero *Annona* possui 118 espécies com características morfológicas muito distintas, das quais 108 são originárias da América Tropical e 10 da África Tropical, e apenas uma espécie (*Annona glabra*) é relatada nesses dois continentes (JOSÉ, 2014). O gênero apresenta cinco grandes grupos: Balaeflorae, Acutifloarae, Annonellae, Guanabani (grupo das graviolas) e Attae (anonáceas comuns: pinha, cherimólia e atemoia) (SCALOPPI JUNIOR, 2007).

A pinha e a graviola são as espécies mais cultivadas no Brasil, por serem frutos muito saborosos e comercialmente aceitáveis. Outros representantes de relevância são a cherimólia (*A. cherimola*), condessa (*A. reticulata* L.), cabeça-de-negro (*A. coriacea*), o araticum-do-campo (*A. dióica*), araticum-do-brejo (*A. paludosa*) e a ilama ou papausa (*A. diversifolia*) (DONADIO, 1997; MANICA et al., 2003). Destaca-se ainda o híbrido interespecífico atemoia, cujo cultivo está em expansão no Brasil (ARAÚJO, 2003).

Devido ao alto valor no mercado nacional e internacional, o plantio de anonáceas tem aumentado significativamente, no Brasil e em outros países, pertencendo a um grupo de produtos com potencial de crescimento de consumo. Porém, algumas dificuldades para o desenvolvimento dessa cultura são encontradas, como: planejamento das práticas culturais, melhoramento de tecnologias de produção e pós-colheita dos frutos, e adoção de estratégias de mercado (MELLO et al., 2003).

Em 2003, foi criada a Associação Brasileira dos Produtores de Anonáceas-ABPA. A finalidade maior é orientar os fruticultores atuais e potenciais para a conquista do mercado com qualidade. A organização desse setor também depende da sistematização de informações técnicas e de mercado (BRAGA SOBRINHO, 2010).

A Secretaria de Agricultura e Abastecimento, por meio do Instituto de Economia Agrícola – IEA e da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI, tem colaborado no desenvolvimento de tecnologias, na assistência técnica, no levantamento de dados de produção e incentivo à abertura de novas áreas de produção. Entretanto, mesmo considerando o apoio de algumas instituições oficiais, os produtores de anonáceas sentem a necessidade do estabelecimento de um programa oficial que direcione de forma legal e sustentável este agronegócio e o conduza em níveis de competitividade em outros mercados (BRAGA SOBRINHO, 2010).

## 2.2 A cultura da gravioleira

A gravioleira, é originária da América Tropical e vales peruanos, sendo distribuído em várias regiões tropicais do mundo pelos espanhóis (PINTO, SILVA, 1994). A planta é encontrada tanto na forma silvestre como cultivada em regiões desde o nível do mar até altitudes superiores a 1.100 m, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Europa, Ásia, África, Nova Zelândia e Austrália (RAMOS et al., 2001, SACRAMENTO et al., 2009).

Os países produtores dessa cultura são: Angola, Austrália, Ceilão, Colômbia, Cuba, Jamaica, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Panamá, Sudoeste Asiático, Venezuela e Brasil, sendo os dois últimos os maiores produtores (PINTO et al., 2005; RAMOS et al., 2001). No Brasil, destaca-se a região Nordeste, sendo a maior produtora, responsável por cerca de 90% do total da produção do país (PINTO et al., 2005).

No Brasil, a espécie foi introduzida pelos portugueses no século XVI e distribuída para diversas regiões, sendo atualmente encontrada em quase todos os estados brasileiros, com exceção da região Sul, devido ao clima mais frio, já que a planta é mais adaptada às regiões semiáridas (PINTO et al., 2005).

A graviola recebe diversas denominações de acordo com a região, sendo conhecida no Brasil com as denominações mais comuns: *coração-de-boi*, *coração-de-rainha*, *jaca-de-pobre*, *jaca-do-pará*, *araticum manso* (PINTO et al., 2001, SACRAMENTO et al., 2009). Nos países de língua espanhola é conhecida como *guanábana* ou *guanaba*, *Corossolier*, *cachiman*, *epineux* em países de língua francesa,

*zapote de viejas* no México e *soursop* nos países de língua inglesa (SACRAMENTO et al., 2009). Os frutos variam de forma e tamanho, os menores com cerca de 750 g e os maiores com até 10 kg como, por exemplo, na variedade “Morada” (LOPEZ, 2005).

A exploração crescente desta cultura, informações e trabalhos disponíveis sobre produtividade e área cultivada ainda são bastante escassos. Em Alagoas, o cultivo de graviola encontra-se distribuído em todas as regiões. Entretanto, as áreas de maior concentração de plantio estão localizadas nos municípios de zona da mata e agreste (ALBUQUERQUE, 1997).

Em 2006, o Ministério da Saúde realizou um vasto estudo sobre várias plantas medicinais com o objetivo de avaliar sua eficácia. Sobre a graviola, foi estudada possível ação antidiabética, sedativa e anticonvulsivante. A graviola é aproveitada das mais diversas formas, tanto na medicina homeopática, como na culinária caseira (BATISTA et al., 2003).

Estudo realizado na Universidade de Pardue, na Califórnia, demonstrou que as acetogeninas, presente na graviola, podem inibir seletivamente o crescimento de células cancerosas. Em outro estudo realizado pelos cientistas da mesma Universidade, foi demonstrado que as acetogeninas da graviola possuem uma ED<sub>50</sub> (dose letal 50) de até 10 microgramas por mililitro (HUANABANO, 2013). Esta substância, encontrada em folhas e sementes, apresenta significativa atividade citotóxica contra células cancerígenas *in vitro* (LIAW et al., 2002). No entanto, mais pesquisas devem ser realizadas antes de ser indicada como medicamento (NETTO JÚNIOR et al., 2006).

### 2.2.1 Aspectos botânicos da gravioleira

A gravioleira apresenta hábito de crescimento ereto, com altura média de 4 a 8 metros na fase adulta, caule único e com abundante sistema radicular. Inicia a frutificação entre o terceiro e o quinto ano e alcança o seu pleno desenvolvimento entre o sexto e o oitavo ano (FREITAS, 1997).

As folhas apresentam pecíolo curto, são do tipo oblongo-lanceoladas ou elípticas, medindo cerca de 14 a 16 cm de comprimento e 5 a 7 cm na maior largura; as nervuras são pouco perceptíveis (MANICA et al., 2003).

As flores no estágio de “capulho” possuem um formato subgloboso ou piramidal, são hermafroditas, de cor verde-escura, quando em crescimento, e verde-clara, quando próximas da antese, distribuídas em pedúnculos curtos axilares ou

diretamente no tronco, solitárias ou agrupadas de 2 a 4 flores (MANICA, 1997), formando uma estrutura denominada almofada floral (FREITAS, 1997).

O cálice é constituído por três sépalas pequenas e a corola por seis pétalas carnosas, formadas por dois verticilos, sendo o externo de pré-floração (PINTO, GENÚ, 1984). O androceu é composto por diversos estames, claviformes e apinhados, com filetes curtos. Cada um deles possui duas anteras que se abrem longitudinalmente, para lançar os polens. O gineceu é composto de numerosos pistilos agrupados acima dos estames; o ovário é súpero, unilocular e uniovulado, e o estilete é curto com estigma único (PINTO, GENÚ, 1984; PINTO, SILVA, 1994; PINTO et al., 2001).

O fruto é uma baga composta, fruto múltiplo ou sincarpo, carnoso, com peso variando de 0,4 a 10 kg (MANICA, 1997). O formato varia em função dos óvulos que não foram fecundados. A casca é de cor verde-escura, quando os frutos estão imaturos, e verde-clara, quando no ponto de colheita, possui espículas carnosas moles e recurvadas (PINTO, SILVA, 1994).

A polpa apresenta coloração branca, formando gomos, sucosa, agridoce, de cheiro e sabor muito agradáveis, contendo proteínas, gorduras, carboidratos, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas A, B, B1 e C. É utilizado geralmente na produção de sucos naturais ou para o processamento industrial, na produção de refrescos, sucos concentrados, polpas congeladas, néctares, sorvetes, geleias, cremes e bebidas lácteas (MANICA et al., 2003; LOPEZ, 2005). Quando consumida ao natural, a graviola é de difícil digestão, devido à alta porcentagem de celulose (1,8%) (ABPA, 2007, LOPEZ, 2005). Possui até 490 sementes, as quais são obovoides, aplainadas, medem de 17 a 20 mm de comprimento e pesam de 0,57 a 0,61g, com a testa dura e de cor marrom-escura brilhante (SACRAMENTO et al., 2009).

As plantas normalmente são propagadas por sementes, uma vez que gravioleiras propagadas sexuadamente não diferem quanto à precocidade, daquelas propagadas assexuadamente, pois ambas apresentam frutificação precoce entre dois e três anos (PINTO, RAMOS, 1997). No entanto, um pomar formado com mudas propagadas por enxertia, a partir de plantas produtivas, possui como vantagens a manutenção das características genéticas das plantas matrizes, redução do porte das plantas, maior uniformidade entre as plantas e maior produção, além da possibilidade de imprimir características de resistência a pragas e doenças, melhor aproveitamento dos recursos hídricos e de nutrientes do solo (BEZERRA, LEDERMAN, 1997).

### 2.2.2 Importância econômica da gravioleira

A importância socioeconômica do cultivo de anonáceas, especialmente da graviola no Brasil, tem aumentado nos últimos anos pela demanda de frutas tropicais. Esse interesse se deve ao alto preço alcançado no mercado, bem como pela sua inserção no mercado europeu e americano (BRAGA SOBRINHO, 2010).

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de graviola do mundo, observou-se que, a partir de meados da década de 1990, essa fruta passou a ter maior destaque entre as frutas tropicais brasileiras, pela sua boa aceitação no mercado nacional, tanto por parte do consumidor como por parte das indústrias de processamento de polpa (JOSÉ et al., 2014). Seu cultivo está presente de forma economicamente relevante nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, destacando-se os Estados da Bahia, Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Pará (LIMA, 2004).

A graviola está incluída no rol das frutas tropicais brasileiras de maior aceitação comercial no mercado nacional, graças à crescente demanda e interesse pela polpa, por parte do consumidor e das indústrias que utilizam o fruto como matéria-prima destinada ao processamento de sucos, doces, licores, frutas cristalizadas entre outros, sendo estas as formas mais comuns de consumo no nordeste brasileiro (RAMOS et al., 2001).

O cultivo comercial da gravioleira ainda é recente, entretanto, sua importância socioeconômica tem aumentado nos últimos anos em função do aumento da demanda por frutas tropicais, além da possibilidade de uso na indústria farmacêutica e de cosméticos (BRAGA SOBRINHO, 2010). A importante quantidade da produção é comercializada sob a forma de fruta fresca. Dados da Central de Abastecimento de Salvador, no Estado da Bahia, apontam que a comercialização de graviola como fruta fresca cresceu cerca de 350% entre 2005 e 2011 (EBAL, 2014).

## 2.3 A cultura da pinheira

A pinha é originária das terras baixas da América Central, mais precisamente da Ilha Trindade, nas Antilhas. Fatores históricos tendem a confirmar que a pinheira é nativa da América Tropical, fato confirmado pela existência de nomes, em sânscritos, épicos, pinturas e esculturas de cavernas fortificadas (ARAÚJO, 2003). A cultura foi introduzida no México, e posteriormente nas Filipinas e na Austrália, pelos espanhóis (OLIVEIRA et al., 2005; CORDEIRO, PINTO, RAMOS, 2000).

A introdução da pinheira no Brasil ocorreu no Estado da Bahia em 1926 pelo Conde Diogo Luís de Miranda, motivo pelo qual também é conhecida como fruta-do-conde (CORDEIRO, PINTO, RAMOS, 2000). A fruta da pinheira também recebe várias denominações: “ata”, no Pará, Maranhão, Ceará e na África; “pinha”, na Bahia, Pernambuco, Paraíba e Alagoas; “fruta-do-conde”, nos estados das regiões Sul e Sudeste (MANICA, 1997; ARAÚJO, 2003). Encontra-se distribuída em quase todos os continentes, sendo conhecida na língua inglesa como “sugar apple” ou “sweet sop”, “rinon” em espanhol e “ata” em francês (ABPA, 2007).

A cultura encontra-se distribuída em várias regiões do mundo: Sudeste da China, Austrália, Polinésia, Havaí, África Tropical, Egito, Índia, terras baixas da Palestina e América Central. Contudo, o Brasil e a Índia destacam-se como as regiões com maior área plantada (ARAÚJO, 2003).

No Brasil, o cultivo da pinheira ocorre em todas as regiões sendo que, na região Nordeste, encontrou condições excepcionais de adaptação, estando disseminada por todos os estados. Pode ser cultivada em condições de sequeiro, como nos municípios de Igaci, Estrela de Alagoas e Palmeira dos Índios no Estado de Alagoas, onde os solos e a pluviosidade (800-1200 mm/ano) com período seco são favoráveis ao desenvolvimento e à alta produção (OLIVEIRA et al., 2005). Porém também pode ser cultivado sob irrigação como ocorre no Vale do São Francisco, nos estados da Bahia e de Pernambuco (ARAÚJO, 2003).

O Estado da Bahia é maior produtor do Brasil com cerca de 7100 hectares plantados (SEAGRI, 2010). Em Alagoas a área de produção está estimada em mais de 200 hectares, distribuídos na zona do agreste e sertão, com forte prevalência da agricultura familiar (LEMOS, 2011).

Entre as anonáceas tropicais, a pinha é a mais conhecida e a de maior importância econômica. Seus frutos são aromáticos, açucarados e levemente ácidos. O teor de sólidos solúveis totais (SS) em pinha pode ultrapassar 20° Brix, enquanto a elevada produção de açúcares, em especial de frutose, supera a de sacarose e determina o sabor acentuadamente doce dos frutos (ARAÚJO, 2003).

A pinha é geralmente consumida in natura. Dos frutos também podem ser obtidos sucos, doces, licores, geleias, marmeladas e sorvetes. A polpa também é usada na fabricação de bebidas fermentadas. Apresenta também uso medicinal, as folhas, sementes, frutos, casca e raízes são utilizadas no preparo de chás, sucos, macerado das

sementes e consumo direto da fruta, no tratamento de anemia, diarreia, desnutrição, convulsões, verminose, reumatismo, furúnculos, etc. (LEAL, 1990).

As folhas, as raízes e, principalmente, as sementes da pinha apresentam propriedades inseticidas. Essas propriedades são devidas a substâncias do tipo acetogeninas como as anoninas ou anonacina, asimicina, butalacina, tendo ação sobre a cadeia respiratória celular do inseto (CORDEIRO, 2000).

### 2.3.1 Aspectos botânicos da pinheira

A pinheira é uma árvoreta ramificada, medindo entre 3m e 5m de altura. Seu sistema radicular é pivotante, o que confere grande tolerância em relação às variações hídricas do solo (OLIVEIRA et al., 2005). As folhas são decíduas, de lâminas oblongo-elípticas, de ápice obtuso ou arredondado, medindo de 5 a 15 cm de comprimento por 2 a 6 cm de largura. A coloração foliar é verde brilhante na face adaxial e verde-azulada na parte abaxial. É uma planta hermafrodita prioritariamente alógama (SCALOPPI JÚNIOR, 2007).

As flores são hermafroditas e apresentam dois fenômenos importantes: o primeiro é denominado “dicogamia protogínica”, ou seja, os pistilos amadurecem primeiro, e, quando estão receptivos, os estames liberam pólen, e o segundo, na sua biologia floral, a heterostilia, que consiste no fato de o gineceu (órgão feminino de reprodução) localizar-se acima do androceu (órgão masculino), o que também dificulta a polinização natural (MANICA et al., 2003). Como os insetos polinizadores não têm contato uniforme com a área curva do gineceu, ocorre a formação do fruto composto (sincarpo), de modo assimétrico (ARAÚJO, 2003).

O fruto é uma baga composta (sincarpo) é arredondado, ovoide, esférica ou cordiforme, com 5 a 13 cm de diâmetro procedente de uma só flor, e é resultado da fusão de muitos carpelos, constituindo uma massa sólida. Quando o óvulo não é fertilizado, o carpelo correspondente não se desenvolve, e o fruto apresenta-se assimétrico ou defeituoso. Todos os carpelos fecundados contêm uma semente de cor preta, que, quando seca, passa a marrom (SCALOPPI JÚNIOR, 2007; ARAÚJO, 2003).

O fruto da pinheira possui de 20 a 60 sementes e pesa de 200g a 400g, sendo 55% de polpa, 40% de casca e 5% de semente. De modo geral, a maturidade fisiológica, caracterizada pelo afastamento do tecido intercapelar do fruto e pela

mudança de coloração, que passa de verde-amarelada, caracteriza o estágio que ocorre a partir de 95 a 100 dias depois da fecundação, e indica também o momento de colheita (ARAÚJO, 2003).

A polpa tem coloração branca ou creme e envolve individualmente as numerosas sementes de coloração preta brilhante ou castanho-claro, com forma elíptica, e que mede de 1,4 a 2,3 cm de comprimento por 0,8 a 1,2 cm de largura (MANICA et al., 2003).

Não existe no Brasil cultivares definidas do fruto, com exceção da pinha sem sementes, denominada ateira cearense ou pitaguari, no Estado do Ceará. O fruto é resultante de uma mutação somática da planta, que produz frutos partenocárpicos (GOMES, 1972).

### 2.3.2 Importância econômica da pinheira

A importância socioeconômica da pinheira (*Annona squamosa* L.) no Brasil tem aumentado nos últimos anos pela demanda de frutas tropicais (BRAGA SOBRINHO, 2010). Seu cultivo comercial tem sido efetuado com maior ênfase na região Nordeste e Centro-Oeste do País, em razão de sua boa adaptação à baixa umidade relativa do ar. Na região Nordeste, a Bahia destaca-se, especialmente a microrregião de Irecê, com cerca de 3.000 ha cultivados, sendo a produção caracteristicamente oriunda de agricultores familiares, pequenos e médios produtores. Nessa microrregião, o município de Presidente Dutra foi batizado como a “capital mundial” da pinha. Outros importantes Estados produtores são: Alagoas, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais (JOSÉ, 2014).

A oferta da pinha ocorre durante todo o ano nos mercados atacadistas, no entanto há déficit de produção, pois o mercado ainda não consegue suprir a demanda. A concorrência é relativamente fraca, aproximando-se da estrutura perfeita, com a presença de grande número de pequenos produtores. Alguns avanços são necessários, como, por exemplo, melhorar a qualidade do fruto, a pós-colheita e a embalagem (JOSÉ, 2014).

### 2.3.3 Aspectos fitossanitários da gravioleira e pinheira

Os maiores problemas para essas culturas são relativos à fitossanidade. Várias doenças podem afetar folhas, caules, flores e frutos de gravioleira, pinheira e atemoia em diferentes estádios de seus desenvolvimentos. Geralmente, as doenças mais

importantes são causadas por fungos durante o florescimento e a frutificação. Também podem ocorrer murchas ou podridões de raízes, causadas por nematoides e patógenos do solo. A antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), murcha ou podridões de raízes (*Rhizoctonia solani*, *Cylindrocladium clavatum*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica*), cancos (*Albonectria rigidiuscula*) e podridão de frutos (*Botryodiplodia theobromae*, sin. *Lasiodiplodia theobromae*) são as mais importantes (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

## 2.4 Antracnose

A antracnose ou “podridão-negra-dos-frutos” é considerada a moléstia mais importante das anonáceas, chegando a provocar de 53% a 70 % de perdas de frutos quando ocorrem chuvas prolongadas durante a floração e formação de frutos. Incide preferencialmente nos tecidos jovens de folhas, ramos, flores e frutos (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

A doença é causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo a fase do ciclo de vida do patógeno responsável pelos processos infecciosos e consequente desenvolvimento dos sintomas da antracnose em anonáceas e em outras culturas hospedeiras de importância agrícola (FREIRE, CARDOSO, 1997).

Os sintomas de antracnose na pinheira são caracterizados, nas folhas, por manchas de coloração pardo-escura ou preta, com o centro mais claro, de contorno irregular, distribuídas por todo o limbo foliar. As folhas ficam deformadas e, em ataques mais severos, ocorre desfolhamento. As lesões, inicialmente, são pequenas, mas, com o passar do tempo, podem atingir mais de um centímetro de diâmetro. Nos ramos, são encontradas lesões alongadas, deprimidas, que podem provocar a morte das ponteiros. Nas flores, aparecem manchas circulares, de coloração castanho-escura, que impedem o vingamento e provocam quedas expressivas (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

Os frutos podem ser atacados em qualquer estágio de desenvolvimento. Nos frutos jovens, ocorre escurecimento de toda a sua superfície, queda e mumificação. Em frutos desenvolvidos, que estão iniciando o seu amadurecimento, ou nos maduros, causa uma podridão escura de rápida evolução, inutilizando o fruto para o consumo ou para sua comercialização (JUNQUEIRA, CUNHA, JUNQUEIRA, 2003).

Na graviroleira o ataque da antracnose ocorre nas folhas, brotações novas, flores e frutos de qualquer idade, causando a morte de ramos, enxertos, queda de frutos e flores.

Os sintomas caracterizam-se pela morte das brotações novas ou ramos ponteiros e pela formação de lesões necróticas escuras e irregulares nas folhas e nas brotações novas. Quando as condições climáticas são muito favoráveis, o fungo pode atacar os botões florais, frutos de qualquer idade e até causar a morte de ramos ponteiros. Quando ataca frutos novos, estes se tornam escuros, mumificados e permanecem na planta por algum tempo. Em mudas enxertadas, o patógeno pode atacar o ponto de ligação enxerto/porta-enxerto, reduzindo drasticamente a taxa de pegamento da enxertia ou provocando a morte dos enxertos (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

A infecção é favorecida por temperaturas de 25°C, que é a ideal ao desenvolvimento do apressório, e um período de 12 a 18 horas de umidade, promovido por chuvas de final de tarde ou orvalho noturno. As condições climáticas ideais para o desenvolvimento da doença ocorrem com umidade acima de 95%, presença de água livre (ROBERTS, PERNEZNY, KUCHARÉK, 2012; TAVARES, SOUZA, 2005; LOPEZ, 2005). Os efeitos da temperatura sobre o diâmetro das lesões desenvolvidas sobre o hospedeiro pode variar com meio de cultura e o estágio de desenvolvimento dos organismos (ZAUZA, ALFENAS, MAFIA, 2007).

A disseminação da doença ocorre pela água, vento, animais, ferramentas e utensílios agrícolas que carregam esporos e micélios presentes no solo, em restos de cultura, em ramos secos, em pecíolos e folhas velhas até o hospedeiro (TAVARES, SOUZA, 2005; PUTZKE, J., PUTZKE, M., 2002). O fungo consegue sobreviver em frutos infectados ou mumificados por mais de dois anos (FERRARI et al., 2011).

As mudas, também, podem atuar como inoculo primário contribuindo para a introdução da doença em novas áreas, visto que é difícil a identificação de sintomas nesta fase (KOSOSKI et al., 2001). Sementes contaminadas também constitui um importante meio de disseminação da doença (GUIMARÃES, 2011).

A disseminação do patógeno pode ser rápida quando não é feito um controle efetivo da doença através da aplicação preventiva de fungicidas e remoção de folhas, flores e frutos doentes, visando reduzir o potencial de inoculo dentro da cultura. O vento e respingos de chuva são muito eficientes na dispersão de esporos a partir de órgãos infectados da planta dentro da cultura (FERRARI et al., 2011; COLATTO, 2010).

No Brasil, a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) foi relatada como responsável por causar antracnose em plantas de anonáceas (FREIRE, CARDOSO 1997), assim como em outros países da América do Sul, onde há plantações comerciais de espécies da mesma família (FREIRE, CARDOSO, 1997; ÁLVAREZ et al., 2004).

Porém, segundo Villanueva-Arce et al., (2005; 2008), foram encontrados isolados de *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* em frutos de cherimólia em plantações no México. Na Colômbia, *C. acutatum* foi isolado de frutos de *Annona muricata* (ÁLVAREZ et al., 2004). Em 2014, Kamei et al. relataram *C. fragariae* e *C. boninense* causando sintomas de antracnose em folhas de *Annona muricata* e *Annona squamosa* no Nordeste do Brasil.

## 2.5 Controle da antracnose em anonáceas

Para o controle da antracnose nos plantios de anonáceas recomenda-se eliminar galhos secos e frutos mumificados do pomar, fazer podas periódicas para tornar as copas mais ventiladas e eliminar os ramos secos da planta, efetuar os tratos culturais, adubações adequadas e fazer pulverizações preventivas com fungicidas à base de oxiclreto de cobre (2 g/L) intercalado com mancozeb (2 g/L), em intervalos semanais, durante o período chuvoso e, se necessário, a cada 20 ou 30 dias durante o período da seca. Fungicidas à base de difenoconazole, tebuconazole são eficazes, no entanto não estão registrados junto ao Ministério da Agricultura para uso em anonáceas. É importante ressaltar que a primeira pulverização deve ser feita a aproximadamente 15 dias antes do início da florada. Os fungicidas à base de cobre não devem ser aplicados durante a florada, pois podem provocar queda intensa de flores e frutos jovens principalmente se aplicados nas horas mais quentes do dia (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

Outro grupo de fungicidas bastante usado na agricultura para o controle da antracnose são as estrobilurinas, porém, não está registrado para anonácea. Estes compostos fazem parte do grupo dos inibidores de quinona oxidase (QoI), cuja toxicidade advém da inibição da cadeia respiratória ao nível do Complexo III, impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (GHINI, KIMATI, 2000; AVILA-ADAME, OLAYA, KÖLLER, 2003; VINCELLI, 2002). No entanto, foi observado um mecanismo de respiração alternativo de isolados fúngicos a estrobilurinas. Esse relato indica a existência do potencial genético e bioquímico para o desenvolvimento de uma rota alternativa de fungos a fungicidas inibidores de quinona (MARKOGLOU et al., 2006).

## 2.6 O Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* é apontado como um dos principais patógenos causadores de doenças em plantas, possui uma ampla distribuição e inespecificidade, e infectando diversas culturas de importância econômica como cereais, gramíneas, hortaliças, legumes e frutas (IVEY, NAVA-DIAZ, MILLER, 2004; ROBERTS, PERNEZNY, KUCHARÉK, 2012). Dentre estas culturas de interesse econômico, podemos citar: algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (ROCA et al., 2004), café (*Coffea arabica* L.) (LINS, ABREU, ALVES, 2007; SILVA et al., 2011), cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (CARNEIRO et al., 2012), citrus (*Citrus* spp.) (KUPPER, GIMENES-FERNANDES, GOES, 2003), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (SOUZA, SOUZA, MENDES-COSTA, 2007), mamão (*Carica papaya* L.) (CIA, 2005; ANDRADE et al., 2007; BONETT et al., 2010; SILVA et al., 2006), milho (*Zea mays* L.) (COSTA et al., 2010), pupunheira (*Bactris speciosa* (Mart.) H. Karst.) (VIDA et al., 2006), graviola (*Annona muricata* L.) (ÁLVAREZ et al., 2004), abacate (*Persea americana* Mill.), chuchu (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz), jiló (*Solanum gilo* Raddi), pimentão verde (*Capsicum annuum* L.) e pimenta (*Capsicum frutescens* L.) (BONETT et al., 2010).

Por causar perdas em frutíferas de clima tropical e subtropical e sendo de difícil controle por desenvolver infecção quiescente, muitos estudos têm sido realizados para elucidar a etiologia das doenças causadas por espécies de *Colletotrichum* e a dinâmica das suas populações (PERES et al., 2005; TOZZE, MELLO, 2006).

O gênero *Colletotrichum* foi descrito em 1831 por Corda, tendo como espécie tipo *C. gloeosporioides* [teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. and & von Schrenk] (SUTTON, 1992). De acordo com a classificação do Dictionary of the fungi (2008), o gênero *Colletotrichum* pertence ao grupo dos fungos Anamórficos, classe Sordariomycetes, ordem Incertae sedis e família Glomerellaceae.

Em 1957, Von Arx, em suas revisões, concluiu que muitas espécies fúngicas incluídas nos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium*, pertenciam ao mesmo gênero, tendo então decidido conservar o nome *Colletotrichum*. Posteriormente, propôs a reorganização da sistemática do gênero, com base em caracteres morfológicos e especificidade do hospedeiro (MENEZES, 2006).

A realização de estudos mais detalhados sobre morfologia, caracteres culturais, patogenicidade levou ao aumento do número de espécies do gênero *Colletotrichum* (COLATTO, 2010). De acordo com *Index fungorum* (2013), o gênero *Colletotrichum*

possui mais de 766 taxas listados, incluindo as variedades e *formae speciales*, evidenciando a grande variabilidade do gênero. Essa diversidade e a falta de especificidade de suas espécies a determinados hospedeiros tornam sua taxonomia e nomenclatura bastante confusas (GUIMARÃES, 2011).

Estudos realizados por Cannon et al., 2012, com 119 espécies de *Colletotrichum* utilizando análise multilocus revelaram nove principais complexos (gloeosporioides, boninense, acutatum, graminicola, spaethianum, destructivum, dematium, truncatum, orbiculare). O complexo gloeosporioides foram incluídos 22 espécies; *C. asianum* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, *C. cordylinicola* Phoulivong, L. Cai & K.D. Hyde, *C. fructicola* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. horii* B. Weir & P.R. Johnst., *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, *C. nupharicola* D.A. Johnson, Carris & J.D. Rogers, *C. psidii* Curzi, Atti, *C. siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, *C. theobromicola* Delacr., *C. tropicale* E.I. Rojas, S.A. Rehner & Samuels, *C. xanthorrhoeae* R.G. Shivas, Bathgate & Podger, *C. aenigma* B. Weir & P.R. Johnst., *C. aeshynomenes* 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. clidemiae* B. Weir & P.R. Johnst., *C. kahawae* subsp. *Ciggaro* B. Weir & P.R. Johnst., *C. salsolae* B. Weir & P.R. Johnst., *C. ti* B. Weir & P.R. Johnst. e *C. queenslandicum* B. Weir & P.R. Johnst. O complexo boninese é composto por 17 espécies; *C. torulosu* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib., *C. cymbidiicola* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. oncidii* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. colombiense* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. beeveri* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. brassicicola* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. karstii* Y.L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. phyllanthi* Damm, P.F. Cannon & Crou, *C. annellatum* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. petchii* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. novae-zelandiae* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. brasiliense* Damm, P.F. Cannon, Crous & Massola, *C. parsonsiaae* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir, *C. hippeastri* Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. constrictum* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir e *C. dacrycarpi* Damm, P.F. Cannon, Crous, P.R. Johnst. & B. Weir.

Algumas espécies são mais específicas a determinados hospedeiros, como exemplo, *C. lindemuthianum* Sacc. & Magnus, em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), *C. musa*, a frutos de bananeira (*Musa* spp.) (JOHNSTON; JONES, 1997), enquanto que

outras, com *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, podem ocorrer em diferentes famílias de hospedeiros. Portanto, uma simples espécie pode causar doença em vários hospedeiros, como também, um único hospedeiro pode ser atacado por várias espécies de *Colletotrichum* (MENEZES, 2006).

As espécies do gênero *Colletotrichum*, apresentam como características peculiares a alta variabilidade fenotípica e ampla gama de hospedeiros, pois é muito conhecida e amplamente distribuída na natureza (SUTTON, 1992; CANNON, 2008), possuindo mais de 600 sinonímias e sendo indicado como anamorfo de *Glomerella cingulata* (MENEZES, 2006). Segundo Phoulivong et al. (2010) o *C. gloeosporioides* tem infectado pelo menos 1000 espécies de planta, sendo responsável por doenças economicamente importante denominadas de antracnoses.

A espécie mais conhecida do gênero é *Colletotrichum gloeosporioides*, apresenta conídios hialinos de formato reto, cilíndrico, com ápice arredondado e base truncada, com comprimento variando entre 12-17µm por 3,5-6 µm de largura e taxa de crescimento médio de 26,5 mm/d a 25°C (SUTTON, 1992, BUDDIE, BRIDGE, 2008).

Os conídios não constituem estruturas de sobrevivência, porque sua viabilidade diminui rapidamente. Entretanto, o micélio pode permanecer viável por longo período, em restos de cultura ou ainda em infecções latentes onde as plantas não mostram sintomas (MENEZES, 2006). Os apressórios apresentam formato clavado, ovalados, com comprimento de 6-20 µm e largura de 4-12 µm (SUTTON, 1992).

As colônias em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) apresentam-se brancas ou cinza-claro e em alguns casos ocorrem difusões cinza escuro com margens mais claras ou róseas, possuindo um rápido crescimento e micélio aéreo cotonoso (AGOSTINI et al., 1992; SUTTON, 1992).

Os acérvulos liberam os conídios na presença de água ou em elevada umidade relativa (> 90%), estes são dispersos pela ação do vento e por vários vetores, que em contato com água emitem o tubo germinativo formando em sua extremidade o apressório, estrutura que pode também ser produzida por hifas de micélio, dando início a penetração no tecido do hospedeiro (TAVARES, SOUZA, 2005).

Na formação do apressório há síntese de proteína requerida para a produção de melanina que confere a cor escura (castanho) da estrutura, tornando-o infectivo. Em geral, os apressórios são resistentes as condições adversas do ambiente, atuando como órgão de sobrevivência (MENEZES, 2006). Nesse processo, através de uma mucilagem hemicelulósica, o apressório adere à superfície do hospedeiro e após a penetração

sucedendo a colonização, o fungo infecta as células e os tecidos do hospedeiro de onde se alimenta (PUTZKE, J., PUTZKE, M., 2002).

A colonização pode ocorrer por ação de ácidos, enzimas e toxinas excretadas pelo micélio que mata as células do tecido infectado causando decomposição, e por fim aparecem os sintomas e as estruturas de reprodução do patógeno (PUTZKE, J., PUTZKE, M., 2002). As espécies de *Colletotrichum* produzem enzimas pectolíticas e toxinas que promovem a desorganização a nível celular correspondente às lesões de aspecto encharcado que se desenvolvem com rapidez e, além de deprimidas apresentam massa cotonosa constituída de hifas e estruturas de frutificação (ROZWALKA, 2003). Durante a colonização do hospedeiro, exibem como estratégias de nutrição, os modos biotrófico (nutrientes obtidos de células vivas do hospedeiro) e necrotrófico (nutrientes obtidos de células mortas pelo fungo no hospedeiro) (ROZWALKA, 2003).

## **2.7 Identificação de espécies de *Colletotrichum***

Os estudos de identificação e taxonomia do gênero *Colletotrichum* têm sido consideradas em conjunto as características morfológicas, culturais, fisiológicas e moleculares (BONETT et al., 2010). Assim, estes estudos contribuem para maior esclarecimento na identificação de espécies, para correlação de espécies a hospedeiros específicos e o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes para a antracnose através do conhecimento das causas, determinantes e distribuição da doença (GUIMARÃES, 2011).

Os estudos filogenéticos, com base em análises moleculares, têm possibilitado resultados precisos na definição de espécies de *Colletotrichum*. Tais análises podem ser baseadas em sequências de DNA, RNA e proteínas (FIGUEIREDO et al., 2003). Dentre as principais técnicas podemos destacar os testes com *primer* taxon-específico, marcadores moleculares e sequência de DNA. As informações geradas a partir de fragmentos de DNA sequenciados permitem inferir sobre as relações filogenéticas entre as espécies-grupo de *Colletotrichum* spp. (LOPEZ, 2001).

O sequenciamento do rDNA é bastante aplicado na identificação de espécies de diversos organismos, devido à presença de regiões altamente conservadas e outras relativamente variáveis. O rDNA eucariótico é formado pelos genes 18S, 5.8S e 28S, sendo estes separados por duas regiões. O gene 18S é altamente conservado e por isso é utilizado para comparar organismos distantemente relacionados; enquanto o gene 28S é

mais variável e, portanto, mais adequada para comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de espécies diferentes (FUNGARO, 2000).

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do 5.8S rDNA é a mais amplamente sequenciada em estudos filogenéticos do gênero *Colletotrichum*, e consequentemente, *primers* baseados nessa região (MILLS et al., 1992), foram amplamente utilizados nos últimos anos como um primer espécie-específico para *C. gloeosporioides*. No entanto, atualmente são conhecidas as limitações do ITS, e o desenvolvimento e uso de *loci* mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (SILVA et al., 2011).

Cai et al. (2009), sequenciaram os genes ITS (Internal transcribed spacer), GAPDH (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase), CAL (calmodulina), ACT (actina), CHS (Chitin sintase) e EF1 $\alpha$  (fator de alongação 1 $\alpha$ ) de isolados de *C. gloeosporioides*, distribuídos em 5 grupos através de filogenia multigênica e os avaliaram quanto a separabilidade, que é a capacidade do gene em separar os grupos, os genes GAPDH, CAL e ACT apresentaram os maiores valores, sendo considerados bons candidatos para identificação de espécies de *Colletotrichum*.

Estudos recentes utilizam vários marcadores filogenéticos, como actina (ACT), chitin synthase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histamina (HIS3), glutamine synthetase (GS), DNA lyase (apn2), região intergênica de apn2 e MAT1-2-1 (ApMat), para compreender melhor a divergência filogenética de espécies de *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012, WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012, PENG et al., 2012, GUNJAN et al., 2013). No entanto, apenas sequências da região ITS estão depositadas no banco de dados para todas as espécies de *Colletotrichum*, mostrando a necessidade de sequenciar as outras regiões importantes do gene (HYDE et al., 2014).

## REFERÊNCIAS

**ABPA** (Associação Brasileira de Produtores de Anonáceas – Annonas Brazil). 2007. Acesso em 15 de outubro de 2014. Disponível em: <[http://anonasbrazil.org/materia\\_tecnica01.htm](http://anonasbrazil.org/materia_tecnica01.htm)>.

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

ALBUQUERQUE, H. C. **Situação, atual e perspectivas para as anonáceas no Estado de Alagoas**. In: JOSÉ, A. R, SOUZA, I. V. B., MORAIS, O. M., REBOUÇAS, T. N. H. Anonáceas, produção e mercado: pinha, graviola, atemóia e cherimóia. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p. 150-152, 1997.

ÁLVAREZ, E., et al. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) em guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. **Fitopatología Colombiana**. v. 28, p. 1-8, 2004.

ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 21-31, 2007.

ARAÚJO, J. F. **A cultura da pinha**. Salvador: Egba, 2003. 79 p.

AVILA-ADAME, C., KÖLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. **Current Genetics**. v.42, n.6, p.332-338, 2003.

BATISTA, M. M. F. et al. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, p. 315-318, 2003.

BEZERRA, J. E. F., LEDERMAN, I. L. **Propagação vegetativa de anonáceas por enxertia**. In: José, A R. (ed.). Anonáceas: Tecnologia de produção e comercialização. Vitória da Conquista, BA. DFZ/UESB, p.61-67, 1997.

BONETT, L. P. et al. Caracterização morfocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, v. 6, n. 3, p.451-463, set./dez. 2010.

BRAGA SOBRINHO, R. B. Potencial de exploração de anonáceas no Nordeste do Brasil. 17ª Semana da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza-CE. 2010.

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

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

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

CARNEIRO, S.M.T.P.G. et al. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. em *Carthamus tinctorius* L. no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.2, p.163-165, fev. 2012.

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.

COLATTO, U. L. D. **Reação de progênes de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) -Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2010.

CORDEIRO, M. C. R., PINTO, A. C. de Q., RAMOS, V. H. V. O cultivo da pinha, fruto-do-conde ou ata no Brasil. Planaltina: Embrapa Cerrados, **Circular técnica 9**, 52p., 2000.

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

DONADIO, L.T. **Situação atual e perspectiva das anonáceas**. In: JOSÉ, A.R. SOUZA, I. V. B., MORAIS, O. M., REBOUÇAS, T. N. H. Anonáceas: mercado (pinha,

graviola, atemóia e cherimóia). 1ª Ed. Vitória da Conquista, Bahia: DFZ/UESB, p. 7-19, 1997.

EBAL- Empresa Baiana de Alimentos. Disponível em: [www.ebal.ba.gov.br/novagestao](http://www.ebal.ba.gov.br/novagestao). Acesso em: 02 novembro, 2014.

FERRARI, J.T. et al. **Antracnose associada às fruteiras**. 2011. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2011\\_4/antracnose/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/antracnose/index.htm)>. Acesso em: 29 setembro, 2014.

FECHINE, I.M. Alcalóides de *Duguetia Tuncifolia* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.12, p.17-19, 2002.

FIGUEIREDO, J. E. F. et al. Caracterização molecular de microrganismos do ecossistema agrícola do Cerrado: III – *Acremonium strictum*. **Comunicado Técnico** 69. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, 10 p., 2003.

FREIRE, F. das C. O., CARDOSO, J. E. **Doenças das anonáceas**. In: JOSÉ, A. R., VILAS BOAS, I., MORAIS, O. M., REBOUÇAS, T. N. H. (eds.). Anonáceas: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). Vitória da conquista: Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, p. 196-213, 1997.

FREITAS, G. B. **Propagação, florescimento, frutificação e produção da graviroleira (*Annona muricata* L.)**. 87f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.14, p.12-16, 2000.

GUIMARÃES, G. R., **Diversidade e caracterização morfo cultural, biológica, bioquímica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.** Monografia (Especialização)-Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Urutai, 2011.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. 1ª edição. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**. 78p. 2000

GOMES, R. P. **Fruticultura Brasileira**. 13ª Ed. São Paulo: Nobel, 446p., 1972.

GUNJAN, S. et al. Apmat gene can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Divers.** v. 61, p.117–138. 2013.

HEUSDEN, E.C.H. Flowers of Annonaceae: Morphology, classification, and evolutivo. **Blumea.** v. 7, p. 1-218, 1992.

HUANABANO. **Ação das Acetogeninas nas células de câncer.** 2013. Disponível em: <<http://www.inkanatural.com/pt/arti.asp?ref=graviola-huanabano>>. Acesso em: 20 novembro. 2014.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I. **Fungal Diversity.** v.67, p. 21-125, 2014.

INDEX FUNGORUM, 2013. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp?pg=4>>. Acesso em: 19 maio 2013.

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

JESSUP, L. W. Australian *Annonaceae* in an Asian-Pacific context. **Proceedings of the Ecological Society of Australia.** v. 15, p. 249-57, 1988.

JOHNSTON, P. R., JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycologia.** v.89, p.420-430. 1997.

JUNQUEIRA, N. T. V., JUNQUEIRA, K. P. **Principais doenças de anonáceas no Brasil: Descrição e Controle.** v. 36, edição especial, p. 55-64, Janeiro 2014.

JUNQUEIRA, N. T. V.; CUNHA, M. M.; JUNQUEIRA, K. P. . Doenças e Pragas de anonáceas. In: MANICA, I. ET AL. **Frutas anonáceas: ata ou pinha, atemólia, cherimólia e graviola: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado.** Porto Alegre: Cinco Continentes Editora. v.1, p.387-440. 2003.

KAMEI, S. H. et al. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura.** v.36, ed. Especial. Janeiro, 2014.

KAVATI, R. **Embalagem e Comercialização**. In: JOSÉ, A. R. et al. (eds.). Anonáceas: Tecnologia de produção e comercialização, Vitória da Conquista, BA: DFZ/UESB. p.257-262. 1997.

KOSOSKI, R. M. et al. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 26, p. 662-666, Jul. 2001.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 28, n.3, p.251-257, maio/jun. 2003.

LEAL, F. Sugar Apple. In: NAGY, S.; SHAW, P. E.; WARDOWSKI, W. F. Fruits os tropical and subtropical origin: composition, properties and uses. **Lake Alfred: FSS**, p.149-158, 1990.

LEMOS, E.E.P. **Panorama de las anonas cultivadas em Brasil; saramuyo, guanábana y atemoya** (ISBN 97866077510919). In: Alma Rosa Gonzalez Esquinca; Lorena Mercedes Luna-Cazáres; Javier Gutiérrez-limenez; Maria Adelina Schile-Guzmán; Dolores Guadalupe Vidal-López (org.). Anonáceas, plantas antiguas estudios recientes. 1 ed. Tuxth Gutiérrez: Unicach, 2011.

LIAW, C. C. et al. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v.65, p. 470-475, 2002.

LIMA FILHO, R.M.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.28, n.6, p.620-625, nov./dez. 2003.

LIMA, M. A. C. de. O cultivo da gravioleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3. 2004.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 32, p.488-496, 2007.

LOPEZ, A. M. Q. Doenças das anonáceas e do urucuzeiro, p. 73-77. In KIATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (eds.), **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas, 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 663p., 2005.

- LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 9, p.291-337. 2001.
- MANICA, I. et al. **Frutas Anonáceas (ata ou pinha, atemólia, cherimólia e graviola)**. Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Cinco Continentes Editora, 596 p., 2003.
- MANICA, I. **Taxonomia, morfologia e anatomia**. In: JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B., MORAIS, O. M., REBOUÇAS, T. N. H. Anonáceas: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, p. 20-35. 1997.
- MARKOGLOU, A.N. et al. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI Fungicides. **European of Plant Pathology**. v.115, p.149-162, 2006.
- MELLO, N. T. C. NOGUEIRA, E. A.; MAIA, M. L. Atemóia: perspectivas para a produção paulista. **Informações Econômicas**. v.38, p.7-13, 2003.
- 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.
- MILLS, P. R. SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98, p.137-143, 1992.
- MOSCA, J.L., CAVALCANTE, C. E. B., DANTAS, T. M. D. Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação / José Luiz Mosca-Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 106). ISSN 1677-1915 1. **Anonáceas**. I. Barros, Carlos Eliardo. II. Dantas, Tatiana Mourão. III. Título. IV. Série. 28 p. 2006.
- NETTO JÚNIOR, N. L.; RIBEIRO, J. E. G.; RODRIGUES, A. G. **O programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. In: AMARAL, A. C. F.; RODRIGUES, A. G.; RIBEIRO, J. E. G.; SANTOS, M. G. dos; NETTO JÚNIOR, N. L. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos. Série B - Textos Básicos de Saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília, 148 p., 2006.
- NEVES, E. M. Exportação de frutas de mesa: sinais de Mercado. **Preços Agrícolas**. v. 2, p.27-28, 1997.

OLIVEIRA, Z. P. et al. **Recomendações técnicas para a cultura da pinha**. Maceió: SEAGRI-AL, 56 p., 2005.

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

PERES, N. A. R. et al. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease.** v. 89, p.784-796, 2005.

PINTO, A. C. de Q. et al. *Annona* species. Fruits for the future, 5. International Centre for Underutilised Crops, **University of Southampton**, Southampto, UK, 263 p. 2005.

PINTO, A. C. Q.; GENÚ, P. J. C. Contribuição ao estudo técnico-científico da graviola (*Annona muricata*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7. 1984. Florianópolis-SC. **Anais...** Florianópolis: SBF/EMPASC. v. 2, p. 529-546. 1984.

PINTO, A. C. Q., RAMOS, V. H. V. **Graviola: formação do pomar e tratamentos culturais**. In: JOSÉ, A R. et al. (eds.). Anonáceas: Tecnologia de produção e comercialização. Vitória da Conquista, BA: DFZ/UESB, p. 94-104.1997.

PINTO, A. C. Q., SILVA, E. M. Graviola para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI, (**Série Publicações Técnicas FRUPEX; 7**). 41p, 1994.

PINTO, A. C. Q., RAMOS, V. H. V., RODRIGUES, A. A. Aspectos botânicos. In: OLIVEIRA, M. A. S (ed.). Graviola. Produção: aspectos técnicos. Embrapa Cerrados (Planaltina, DF). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. (**Frutas do Brasil; 15**). p. 10-12. 2001.

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.

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

RAMOS, V. H. V. et al. Graviola: produção: aspectos técnicos. Brasília: **EMBRAPA Informação Tecnológica**, p. 9, 2001.

RIBEIRO, G. S. et al. Aspectos da biologia floral relacionados à produção de frutos de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. v.29, p. 369-373, 2007.

ROBERTS, P. D.; PERNEZNY, K. L.; KUCHARSK, T. A. **Anthracnose on pepper in Florida**. Electronic Data Information Source - Florida Cooperative Extension Publications: Universidade da Flórida, Gainesville, 2012.

ROCA, M., M.G. et al. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p.16-20, jan./fev. 2004.

ROZWALKA, L. C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

JOSÉ, A. R. et al. **Anonáceas: mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia)**. 1. ed. Vitória da Conquista, Bahia: DFZ/UESB, 310 p., 1997.

JOSÉ, A. R. et al. **Atualidades e perspectivas das anonáceas no mundo**. v. 36, edição especial, p. 86-93, Janeiro, 2014.

SACRAMENTO, C. K.; MOURA, J. I. L.; COELHO JUNIOR, E. **Graviola**. In: SANTOS-SEREJO, J. A. et al. (eds.). **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 95-132. 2009.

SAUQUET, H. et al. Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.142, p. 125-186, 2003.

SCALOPPI JUNIOR, E. J. **Propagação de espécies de *Annonaceae* com estacas caulinares**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Jabotical, UNESP/FCAV, 87 p., 2007.

SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária). **Bahia lidera a produção mundial de graviola**. 2010. < Acesso em 15 de novembro de 2013. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping&notid=21733>>.

SILVA, A. Q., SILVA, H. **Nutrição e adubação em anonáceas**. In: JOSÉ, A. R.; VILAS BOAS, I.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. (eds.). *Anonáceas*:

produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). Vitória da conquista: Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, p. 118-137, 1997.

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, abr. 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 ago. 2012.

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. **Ciência e Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago. 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.

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

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

VIANA, J. S. **Implantação de um pomar de pinha irrigado no Distrito Federal**. Boletim Técnico. Brasília, Distrito Federal, 24p., 2005.

VILLANUEVA-ARCE, R. et al. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. **Agrociência**. v.39, p. 93-106, 2005.

VILLANUEVA-ARCE, R. et al. Espécies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Agrociência**. v. 42, p. 689-701, 2008.

VIDA, J.B. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnosis on peach palm fruits in Minas Gerais and Paraná States, Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.4, p.379-380, 2006.

VINCELLI, P., DIXON, E. Resistance to QoI (Strobilurin-like) fungicides in isolates of *Pyricularia grisea* from perennial ryegrass. **Plant Disease**. v. 86, p. 235-240, 2002.

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.

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

### 3 CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS À ANTRACNOSE EM FOLHAS DE PINHA E GRAVIOLA

#### RESUMO

A antracnose é uma importante doença das anonáceas, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*. No Brasil, *Colletotrichum gloeosporioides* foi relatada sendo agente etiológico associada à antracnose de anonáceas. Os objetivos desse trabalho foram identificar possíveis associações de espécies de *Colletotrichum* infectando a cultura da pinha e da graviola no estado de Alagoas através da caracterização molecular e morfocultural. Noventa isolados foram analisados com sequências do gene gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), como medida inicial da diversidade genética. Um subgrupo de isolados foi selecionado para o sequenciamento com os genes, chitin sintase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2) e a região ITS-rDNA. A caracterização cultural foi realizada mediante a mensuração do crescimento micelial dos isolados a 25°C e coloração das colônias. A caracterização morfológica foi realizada através da mensuração de conídios e apressórios. A análise da sequência multilocus, juntamente com as características morfoculturais, foi possível comprovar que cinco espécies de *Colletotrichum* são responsáveis por causar antracnose em pinha e graviola no estado de Alagoas: *Colletotrichum karstii*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. theobromicola* e *C. fructicola*, sendo relatada pela primeira vez a ocorrência dessas espécies no Brasil.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum karstii*. *Colletotrichum tropicale*. *Annona muricata*. *Annona squamosa*. Análise multilocus.

## CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum* SPECIES ASSOCIATED WITH ANTHRACNOSE IN PINHA AND GRAVIOLA LEAVES

### ABSTRACT

Anthracnose is an important Annonaceae disease, caused by *Colletotrichum* species. In Brazil, *Colletotrichum gloeosporioides* was reported as etiologic agent associated with anthracnose of Annonaceae. The objectives of this study were to identify possible associations of *Colletotrichum* species infecting *Annona squamosa* e *Annona muricata* and soursop cultures in Alagoas state through molecular characterization and Morphocultural. Ninety isolated sequences were analyzed using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) as an initial measure genetic diversity. A subset of isolates were selected for sequencing with the genes, chitin syntase (CHS-1),  $\beta$ -tubulin (TUB2) and rDNA-ITS region. The cultural characterization was performed by measurement of their mycelial growth at 25 ° C and color of the colony. Morphological characterization was performed by measuring conidia and appressoria. The analysis of multilocus sequence, along with the morfoculturais characteristics, it was possible to prove that five species of *Colletotrichum* are responsible for causing anthracnose in cone and soursop in the state of Alagoas: *Colletotrichum karstii*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. theobromicola* and *C. fructicola*, which first reported the occurrence of these species in Brazil.

**Keywords:** *Colletotrichum karstii*. *Colletotrichum tropicale*. *Annona muricata*. *Annona squamosa*. Multilocos análise.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A família das anonáceas engloba uma grande variedade de plantas, composta por cerca de 40 gêneros e mais de 2.000 espécies, sendo os gêneros *Annona*, *Rollinia* e *Albernonia* os que produzem frutos comestíveis e saborosos. O gênero *Annona* inclui mais de 60 espécies, sendo a graviola (*Annona muricata* L.) considerada uma das mais importantes economicamente, juntamente com a pinha (*Annona squamosa* L.), ambas exploradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (NOGUEIRA, MELLO, MAIA, 2005).

O Brasil vem se destacando em nível mundial como um importante produtor e consumidor de frutas. Dentre estas, destacam-se as anonáceas, que se transformaram em cultivos rentáveis e geradores de emprego, além da possibilidade de uso na indústria farmacêutica e de cosméticos. Esse interesse pelo cultivo de anonáceas se deve ao alto preço alcançado no mercado, bem como pela sua inserção no mercado europeu e americano (RIBEIRO et al., 2007; BRAGA SOBRINHO, 2010). A Bahia é o principal produtor mundial de anonáceas, com 9000 toneladas/ano, seguido dos estados de Pernambuco e Alagoas (LEMOS, 2011). Em Alagoas a área de produção está estimada em mais de 200 hectares, distribuídos na zona do agreste e sertão, com forte prevalência da agricultura familiar (LEMOS, 2011).

As anonáceas são encontradas em todas as regiões do Brasil, mas foi na região semiárida do nordeste que o cultivo destas fruteiras se espalhou. No entanto, as doenças que atacam a fruticultura do país são um grande problema para os produtores, pois além de provocarem perdas na produção demandam um alto investimento com produtos e técnicas de manejo para minimizarem seus efeitos (COLATTO, 2010).

A antracnose é uma doença muito severa que provoca grandes prejuízos para a fruticultura no mundo, tanto em campo como em pós-colheita (GUIMARÃES, 2011), sendo considerada a principal doença nas anonáceas com perdas de 70% na produção dos frutos (LOPEZ, 2005). Os sintomas são caracterizados, nas folhas, por manchas de coloração pardo-escura ou preta, com o centro mais claro, de contorno irregular, distribuídas por todo o limbo foliar. As folhas ficam deformadas e, em ataques mais severos, ocorre desfolhamento. As lesões, inicialmente, são pequenas, mas, com o passar do tempo, podem atingir mais de um centímetro de diâmetro (JUNQUEIRA,

JUNQUEIRA, 2014). A severidade da doença em campo depende da suscetibilidade da planta e das condições ambientais (GUIMARÃES, 2011).

Nos plantios comerciais de anonáceas no Brasil, a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Sacc. 1882, que na forma perfeita ou teleomorfa, corresponde ao fungo *Glomerella cingulata* (ston.) Spauld e Scherenk, foi relatada causando a doença antracnose. A fase de infecção do ciclo de vida do patógeno é responsável pelos processos infecciosos e consequente desenvolvimento dos sintomas nas plantas (FREIRE, CARDOSO, 1997). No entanto, recentemente Kamei et al. (2014), relataram a ocorrência de *C. boninense* e *C. gloeosporioides* causando doença em folhas de pinha e graviola no estado de Alagoas.

Diversas espécies de fungos são identificadas com base em caracteres morfológicos e culturais, para as espécies de *Colletotrichum*, esta metodologia dificulta a identificação devido à grande diversidade fenotípica em função das condições do ambiente (CAI et al., 2009; ANDRADE et al., 2007). A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do 5.8S rDNA é amplamente sequenciada em estudos filogenéticos do gênero *Colletotrichum* (MILLS et al., 1992). No entanto, atualmente já são conhecidas as limitações do gene ITS para identificação de algumas espécies, e o desenvolvimento e uso de genes mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (SILVA et al., 2011).

Atualmente já são utilizados vários marcadores filogenéticos, como actina (ACT), chitin synthase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histamina (HIS3), glutamine synthetase (GS), para compreender melhor a divergência filogenética de espécies de *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012; WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012; PENG et al., 2012; SHARMA et al., 2013) e o marcador da região intergênica (ApMat) que resolve questões de identificação de espécies do complexo gloeosporioides (SILVA et al. 2012; DOYLE et al. 2013).

Os objetivos do trabalho foram caracterizar através de técnicas moleculares e morfoculturais espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em folhas de pinheira e graviola no estado de Alagoas.

### 3.2 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) localizado no km 85 da BR 101 Norte (9°27'54.71"S – 35°49'39.27"O), no Município de Rio Largo que dista 27 km da cidade de Maceió, capital do estado de Alagoas. As coordenadas geográficas das áreas de coletas foram obtidas através de aparelho portátil de posicionamento global (GPS).

#### 3.2.1 Amostragem, obtenção e preservação dos isolados

Foram coletadas folhas jovens de pinheira e gravioleira apresentando sintomas típicos de antracnose (Figura 1), em sete áreas de plantios comerciais, localizados nos municípios de Arapiraca, Palmeira dos Índios, Estrela de Alagoas, Igaci, Delmiro Gouveia, Maragogi e Maceió, no Estado de Alagoas (dados em anexo). Em cada área foram amostradas arbitrariamente 30 plantas. Em cada planta foram coletadas três folhas, onde foram retirados apenas uma lesão de cada folha.

Figura 1 - Folhas de graviola (A) e pinha (B) apresentando lesões típicas de antracnose.



Fonte: Costa, JFO, 2014

As amostras foram inicialmente lavadas em água corrente e secas com papel toalha. Uma lesão de cada folha 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% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, e duas lavagens em água destilada esterilizada

(ADE) por 30 segundos cada. Os tecidos foram secos em papel filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), preparados com 200 g de batata, 20 g de dextrose, 17 g de ágar, 1000 mL de água.

As placas contendo o meio de cultura e os fragmentos foram mantidas em 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 a cultura monospórica para os estudos de caracterização molecular, cultural e morfológica. Isolados monospóricos foram obtidos através de diluição seriada de uma solução de esporos, até  $10^{-6}$  da concentração inicial, onde foi depositada 200 µl desta solução em uma placa de Petri contendo meio AA e espalhada uniformemente com auxílio de uma alça de Drigalski previamente esterilizada na chama e resfriada, com duas repetições por isolado. Após 24 horas, o esporo germinado foi transferido para nova placa de Petri contendo meio BDA e mantido por 7 dias em temperatura ambiente.

Após esporulação noventa isolados foram identificados morfológicamente como *Colletotrichum* spp. (SUTTON, 1980). 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 (28°C).

### 3.2.2 Caracterização da patogenicidade

As folhas utilizadas neste teste foram obtidas de plantas de pinheira (var. Crioula) e gravioleira (var. Morada) assintomática cultivadas em campo. As folhas foram lavadas com detergente e água corrente. Após a secagem, foram utilizadas folhas com e sem ferimentos (os ferimentos foram realizados com auxílio de um alfinete esterilizado). O inóculo constituiu de discos de BDA (5mm) retirados das margens de cultura monospórica crescido em meio BDA por sete dias, depositados equidistantes um dos outros sobre a superfície das folhas saudáveis. Também foi realizado o método de inoculação cruzada (isolados de pinha inoculados em folhas de graviola e isolados de graviola em folhas de pinha). Para a testemunha, foram utilizadas apenas disco de BDA sem o patógeno.

Posteriormente, cada folha foi acondicionada separadamente em caixas plástica transparente (gerbox) contendo papel filtro umedecido com 5 mL de ADE. Para evitar contato com a superfície úmida, foram utilizadas placas de Petri estéreis e os pecíolos envoltos por um chumaço de algodão embebido em ADE para manter o vigor da folha e favorecer a germinação das estruturas de reprodução do patógeno. Os experimentos foram mantidos em estufa incubadora Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 25°C  $\pm$  1°C e fotoperíodo de 12 horas até a observação dos sintomas. Isolados patogênicos foram utilizados para utilização na caracterização molecular, morfológica e cultural.

### 3.2.3 Caracterização molecular

#### 3.2.3.1 Extração de DNA

Para obtenção da massa micelial dos isolados de *Colletotrichum*, três discos de BDA contendo o micélio 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,44 mg, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,48 mg, e MnCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0,36 mg) (ZAUZA et al., 2007). As culturas foram incubadas por 5 dias, sob temperatura de 25 $\pm$ 1°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 centrífuga com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 4% (CTAB 4%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 4  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1% v/v), e depois, 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 $\mu$ L de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) e 40  $\mu$ L de CTAB 10% aquecido a 65°C. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi acrescentando 400 $\mu$ L de etanol absoluto.

O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendido com 40  $\mu$ L de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) + RNase (10 $\mu$ g/mL). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de

agarose 0,8% e corados com brometo de etídio e observados sob luz UV. O material foi armazenado sob temperatura de -20°C.

### 3.2.3.2 Amplificação, Purificação e Sequenciamento do DNA

Noventa isolados do estudo foram amplificados com o gene que codifica para a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), como medida inicial da diversidade de espécies. Trinta isolados foram selecionados para representar a gama de diversidade de espécies e origem geográfica e foram posteriormente sequenciados com os genes, chitin syntase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2) e a região ITS-rDNA (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas com tampão 10X,  $MgCl_2$  50 mM, DNTP's 10 mM, 10  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1 $\mu$ L de DNA diluído (1:30). O volume final das reações foi ajustado para 60 $\mu$ L com água Milli-Q autoclavada. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler) nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 2 min (desnaturação inicial); 35 ciclos a 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento), e 72°C por 1 min (extensão); e um ciclo final à 72°C por 10 min, para o gene GAPDH. Para os genes CHS-1, TUB2 e a região ITS consiste em desnaturação inicial de 94°C e 34 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30 s, 72°C for 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%, corados com brometo de etídio e observados sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados usando o kit GFX <sup>TM</sup> PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante e posteriormente enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

Tabela 1- Primers utilizados no estudo.

| Gene  | Primer   | Sequencia (5' - 3')      | Referências                |
|-------|----------|--------------------------|----------------------------|
| GAPDH | GDR      | GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA  | Guerber et al., 2003       |
|       | GDF      | GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT |                            |
| TUB2  | T1       | AACATGCGTGAGATTGTAAGT    | O' Donnel & Cigelnik, 1997 |
|       | Bt2b     | ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC |                            |
| CHS-1 | CHS-354R | TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG | Carbone & Kohn, 1999       |
|       | CHS-79F  | TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG |                            |
| ITS   | ITS1     | TCCGTAGGTGAACCTGCGG      | White et al., 1990         |
|       | ITS4     | TCCTCCGCTTATTGATATGC     |                            |

Fonte: Costa, JFO, 2014

### 3.2.4 Análises Filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software CodonCode 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.

Para identificação dos isolados foi construída uma árvore filogenética com as sequências do gene GAPDH, e um subgrupo de isolados foram escolhidos para confirmar a filogenia separando-os por complexos (gloeosporioides e boninense) com as sequências concatenadas dos genes GAPDH, TUB2, CHS-1 e região ITS juntamente com as espécies adicionais obtidas do GenBank (Tabela 2 e 3). As sequências foram inicialmente alinhadas o software MUSCLE (EDGAR, 2004), disponível no pacote computacional MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2011).

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 BI. Os modelos foram estimados separadamente 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, YANGA, 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. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA, YANG, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 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](http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer)) e nenhuma indicação de falta de convergência foi detectada. A árvore foi visualizada no software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos. As espécies *C. gloeosporioides* CBS 112999 e *C. boninense* CBS 123755 foram utilizadas como grupo externo (outgroup) nas análises do complexo *C. boninense* e *C. gloeosporioides*, respectivamente.

Tabela 2- Isolados do complexo gloeosporioides incluídos na análise 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     | CH-1     |
| <i>C. aenigma</i> *       | C1253                | JX010244                | JX010044 | JX010389 | JX009774 |
|                           | C1256                | JX010243                | JX009913 | JX010390 | JX009789 |
| <i>C. aeshynomenes</i> *  | 3-1-3                | JX010176                | JX009930 | JX010392 | JX009799 |
| <i>C. alatae</i> *        | C1275                | JX010190                | JX009990 | JX010383 | JX009837 |
|                           | C1276                | JX010191                | JX010011 | JX010449 | JX009846 |
| <i>C. alienum</i> *       | C824                 | JX010251                | JX010028 | JX010411 | JX009882 |
|                           | C1189                | JX010217                | JX010018 | JX010385 | JX009754 |
| <i>C. aotearoa</i> *      | C1282                | JX010205                | JX010005 | JX010420 | JX009853 |
|                           | C1252                | JX010201                | JX009968 | JX010423 | JX009766 |
| <i>C. asianum</i> *       | C1315                | JX010406                | JX010053 | JX010406 | JX009867 |
|                           | C1187                | JX010192                | JX009915 | JX010384 | JX009753 |
| <i>C. boninense</i>       | CBS123755            | JX010292                | JX009905 | JQ005588 | JX009827 |
| <i>C. clidemiae</i> *     | C1317                | JX010265                | JX009989 | JX010438 | JX009877 |
|                           | C1254                | JX010274                | JX009909 | JX010439 | JX009777 |
| <i>C. cordylinicola</i> * | C1315                | JX010226                | JX009975 | JX010440 | JX009864 |
| <i>C. dianesei</i> *      | CMM4083              | KC329779                | KC517194 | KC517254 | KJ155469 |
| <i>C. endophytica</i>     | DNCL075              | KF242123                | KF242181 | KF254857 | x        |
| <i>C. fructicola</i>      | ICMP17921            | JX010181                | JX009923 | JX010400 | JX009839 |
| <i>C. fructivorum</i> *   | Coll1414             | JX145145                | x        | JX145196 | x        |
|                           | Coll1002             | JX145126                | x        | JX145177 | x        |
| <i>C. gloeosporioides</i> | ICMP 17821           | JX010152                | JX010056 | JX010445 | JX009818 |
| <i>C. grevilleae</i> *    | CBS 132879           | KC297078                | KC297010 | KC297102 | KC296987 |
| <i>C. horii</i> *         | C1180                | GQ329690                | GQ329681 | JX010450 | JX009752 |
|                           | C1264                | JX010212                | GQ329682 | JX010378 | JX009811 |
| <i>C. hymenocallidis</i>  | CSSN 3               | GQ485601                | GQ856759 | GQ849439 | GQ856729 |
| <i>C. jasmini-sambac</i>  | CLTA-01              | HM131515                | HM131501 | HM153772 | x        |
|                           | LLTA-01              | HM131511                | HM131497 | HM153768 | x        |
| <i>C. kahawae</i> *       | C1266                | JX010231                | JX010012 | JX010444 | JX009813 |
|                           | C1275                | JX010238                | JX010042 | JX010432 | JX009840 |
| <i>C. murrayae</i> *      | GZAAS5.09506         | JQ247632                | JQ247609 | JQ247644 | x        |
|                           | GZAAS5.09538         | JQ247633                | JQ247608 | JQ247645 | x        |
| <i>C. musae</i> *         | CBS116870            | JX010146                | JX010050 | HQ596280 | JX009896 |
|                           | C1266.11             | JX010142                | JX010015 | JX010395 | JX009815 |
| <i>C. nupharicola</i> *   | C1275.24             | JX010187                | JX009972 | JX010398 | JX009835 |
|                           | C1275.25             | JX010189                | JX009936 | JX010397 | JX009834 |
| <i>C. proteae</i> *       | CBS 132882           | KC297079                | KC297009 | KC297101 | KC296986 |
|                           | CBS 134301           | KC842385                | KC842379 | KC842387 | KC842377 |
| <i>C. psidii</i>          | CBS145               | JX010219                | JX009967 | JX010443 | JX009901 |

Tabela 2. Continuação.

|                            |            |          |          |          |          |
|----------------------------|------------|----------|----------|----------|----------|
| <i>C. queenslandicum</i> * | ICMP 1778  | JX010276 | JX009934 | JX010414 | JX009899 |
|                            | C956       | JX010185 | JX010036 | JX010412 | JX009890 |
| <i>C. salsolae</i> *       | C1314      | JX010242 | JX009916 | JX010403 | JX009863 |
| <i>C. siamense</i> *       | C1315      | JX010171 | JX009924 | JX010404 | JX009865 |
| <i>C. syzygicola</i> *     | DNCL021    | KF242094 | KF242156 | KF254880 | x        |
|                            | DNCL018    | KF242093 | KF242155 | KF254879 | x        |
| <i>C. temperatum</i> *     | Coll883    | JX145159 | x        | JX145211 | x        |
|                            | Coll1103   | JX145135 | x        | JX145186 | x        |
| <i>C. theobromicola</i> *  | C1316      | JX010294 | JX010006 | JX010447 | JX009869 |
|                            | C1275      | JX010286 | JX010024 | JX010373 | JX009830 |
|                            | C1270      | JX010289 | JX009962 | JX010380 | JX009821 |
| <i>C. ti</i> *             | ICMP 4832  | JX010269 | JX009952 | JX010442 | JX009898 |
|                            | ICMP 5285  | JX010267 | JX009910 | JX010441 | JX009897 |
| <i>C. tropicale</i> *      | C5101      | JX010264 | JX010007 | JX010407 | JX009870 |
|                            | C1272      | JX010275 | JX010020 | JX010396 | JX009826 |
| <i>C. viniferum</i> *      | YG4        | JN412804 | JN412798 | JN412813 | x        |
|                            | GG4        | JN412802 | JN412800 | JN412811 | x        |
| <i>C. xanthorrhoeae</i> *  | C1271      | JX010261 | JX009927 | JX010448 | JX009823 |
| <i>G. cingulata</i>        | ICMP 10643 | JX010224 | JX009908 | JX010436 | JX009891 |

\* Espécie tipo. TUB-2:  $\beta$ -tubulin; CHS-1: chitin synthase; GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; ITS: partial rDNA-ITS region.

Fonte: Costa, JFO, 2014

Tabela 3- Isolados do complexo boninense incluídos na análise de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.

| Espécies                    | Nº de acesso da cultura | Nº de acesso do GenBank |          |          |          |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|
|                             |                         | ITS                     | GAPDH    | TUB2     | CH-1     |
| <i>C. annellatum</i> *      | CBS 129826              | JQ005222                | JQ005309 | JQ005656 | JQ005396 |
| <i>C. beeveri</i> *         | CBS 128527              | JQ005171                | JQ005258 | JQ005605 | JQ005345 |
| <i>C. boninense</i> *       | CBS 123755              | JQ005153                | JQ005240 | JQ005588 | JQ005327 |
|                             | CBS 123756              | JQ005154                | JQ005241 | JQ005589 | JQ005328 |
| <i>C. brasiliense</i> *     | CBS 128501              | JQ005235                | JQ005322 | JQ005669 | JQ005409 |
|                             | CBS 128528              | JQ005234                | JQ005321 | JQ005668 | JQ005408 |
| <i>C. brassicicola</i> *    | CBS 101059              | JQ005172                | JQ005259 | JQ005606 | JQ005346 |
| <i>C. colombiense</i>       | CBS 129817              | JQ005173                | JQ005260 | JQ005607 | JQ005347 |
| <i>C. colombiense</i> *     | CBS 129818              | JQ005174                | JQ005261 | JQ005608 | JQ005348 |
| <i>C. constrictum</i> *     | CBS 128504              | JQ005238                | JQ005325 | JQ005672 | JQ005412 |
|                             | CBS 128503              | JQ005237                | JQ005324 | JQ005671 | JQ005411 |
| <i>C. cymbidiicola</i>      | CBS 123757              | JQ005168                | JQ005255 | JQ005602 | JQ005342 |
| <i>C. cymbidiicola</i> *    | IMI 347923              | JQ005166                | JQ005253 | JQ005600 | JQ005340 |
|                             | CBS 128543              | JQ005167                | JQ005254 | JQ005601 | JQ005341 |
| <i>C. dacrycarpi</i> *      | CBS 130241              | JQ005236                | JQ005323 | JQ005670 | JQ005410 |
| <i>C. gloeosporioides</i> * | CBS 112999              | JQ005152                | JQ005239 | JQ005587 | JQ005326 |
| <i>C. hippeastri</i>        | CBS 241.78              | JQ005232                | JQ005319 | JQ005666 | JQ005406 |
| <i>C. hippeastri</i>        | CBS 125377              | JQ005230                | JQ005317 | JQ005664 | JQ005404 |
| <i>C. hippeastri</i> *      | CBS 125376              | JQ005231                | JQ005318 | JQ005665 | JQ005405 |
| <i>C. novae-zelandiae</i> * | CBS 128505              | JQ005228                | JQ005315 | JQ005662 | JQ005402 |
|                             | CBS 130240              | JQ005229                | JQ005316 | JQ005663 | JQ005403 |
| <i>C. oncidii</i> *         | CBS 129828              | JQ005169                | JQ005256 | JQ005603 | JQ005343 |
| <i>C. parsonsi</i> *        | CBS 128525              | JQ005233                | JQ005320 | JQ005667 | JQ005407 |
| <i>C. petchii</i> *         | CBS 378.94              | JQ005223                | JQ005310 | JQ005657 | JQ005397 |
|                             | CBS 379.94              | JQ005224                | JQ005311 | JQ005658 | JQ005398 |
| <i>C. phyllanthi</i>        | CBS 175.67              | JQ005221                | JQ005308 | JQ005655 | JQ005395 |
| <i>C. karstii</i> *         | CORCG6                  | HM585409                | HM585391 | HM585428 | HM582023 |
|                             | CBS 125468              | JQ005197                | JQ005284 | JQ005631 | JQ005371 |
|                             | CBS 129834              | JQ005176                | JQ005263 | JQ005610 | JQ005350 |
| <i>C. torulosum</i> *       | CBS 128544              | JQ005164                | JQ005251 | JQ005598 | JQ005338 |
|                             | CBS 102667              | JQ005165                | JQ005252 | JQ005599 | JQ005339 |
| <i>C. citricola</i> *       | SXC151                  | KC293576                | KC293736 | KC293656 | KC293792 |
|                             | SXC152                  | KC293577                | KC293737 | KC293657 | KC293793 |

\* Espécie tipo. TUB-2:  $\beta$ -tubulin; CHS-1: chitin synthase; GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; ITS: partial rDNA-ITS region.

Fonte: Costa, JFO, 2014

### 3.2.5 Estudos morfológicos das espécies de *Colletotrichum*

Trinta isolados de *Colletotrichum* proveniente de pinheira e gravioleira identificados com base nas análises filogenéticas foram utilizados para observações da taxa de crescimento micelial e morfologia da colônia. Para os estudos de caracterização de conídios e apressórios foram utilizados um representante de cada espécie.

Na caracterização da taxa de crescimento micelial um disco de meio BDA contendo o micélio 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 um paquímetro digital, sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 horas e aos sete dias foi observado a coloração 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 conídios e apressórios escolhidos aleatoriamente provenientes das estruturas do patógeno crescidos em meio BDA por dez dias. Para a visualização dos esporos foram utilizadas lâminas de vidro, onde foi depositada uma gota (40 µL) de ADE juntamente com os conídios e observadas em microscópio óptico.

A formação de apressórios foi realizada utilizando 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. Após 48 horas, as imagens dos apressórios foram capturados. Para 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 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).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Caracterização da patogenicidade

Os isolados de *Colletotrichum* foram patogênicos a folhas de graviola e pinha 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). O ferimento é importante para a penetração de algumas espécies de *Colletotrichum* (BAILEY et al., 1992). Estudos realizados com *C. gloeosporioides* em maracujá (*Passiflora edulis* Sims) revelaram que a reprodução dos sintomas da doença ocorreu somente quando houve inoculação com ferimento no limbo foliar (FRANCISCO NETO et al., 1995).

No teste de patogenicidade cruzada, os sintomas foram tardios mesmo nas folhas com ferimento, os sintomas surgiram em até dez dias após a inoculação. Verificando que, os isolados de pinha e graviola causaram maiores lesões da cultura que foi isolado, demonstrando certa preferência por seu hospedeiro.

Figura 2 - Teste de patogenicidade em folhas de pinha (A) e graviola (B).



Fonte: Costa, JFO, 2014

#### 3.3.2 Caracterização molecular

A análise filogenética dos isolados amplificados com o gene *gapdh* permitiu a delimitação de espécies de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos: *gloeosporioides* (Figura 3) e *boninense* (Figura 4). Observa-se que em alguns clados da

árvore do complexo gloeosporioides não foi possível separar os isolados quanto à sua respectiva espécie.

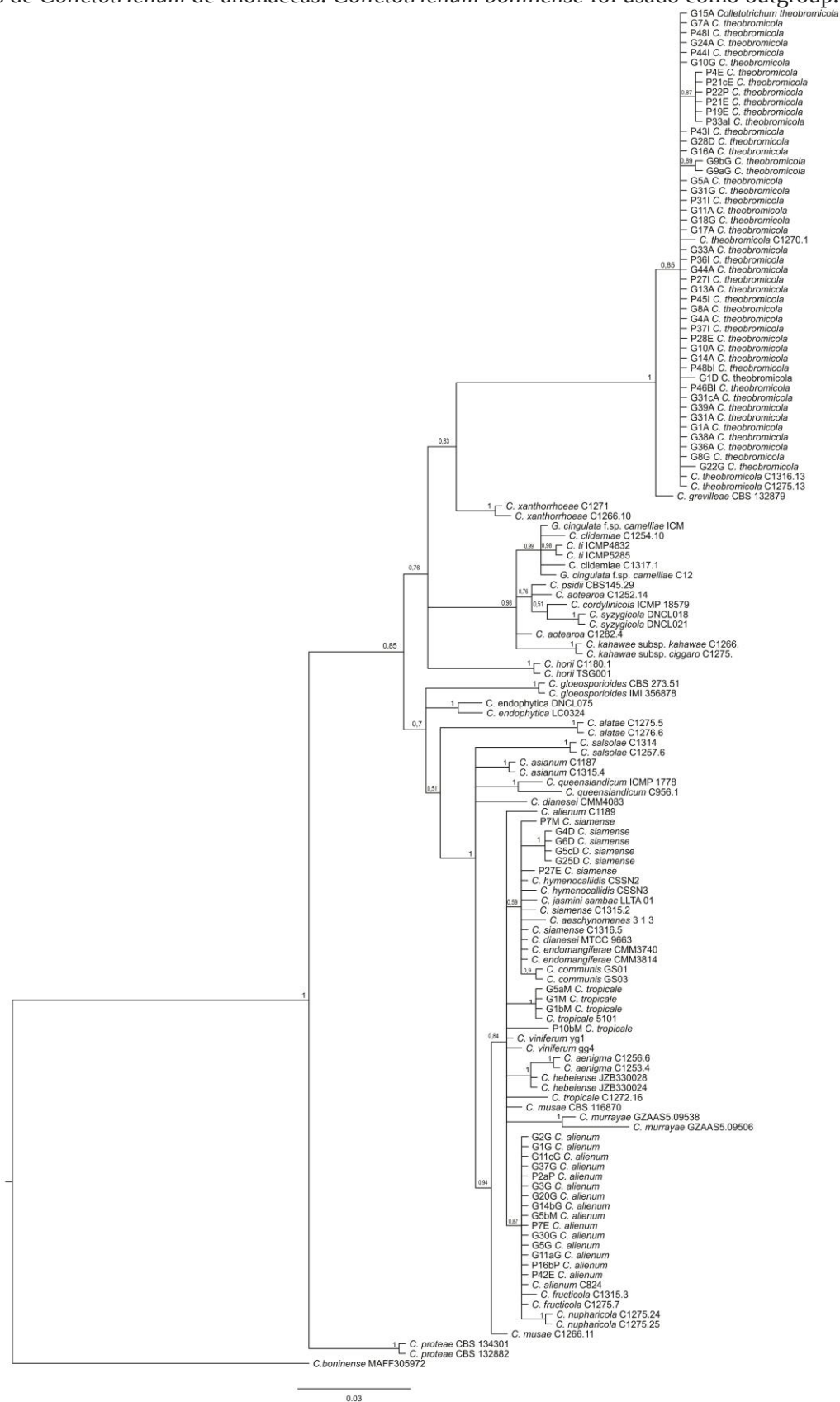
Trinta isolados representantes dos complexos foram utilizados nas árvores filogenéticas concatenadas para o complexo gloeosporioides e boninense com os genes *gapdh*, *tub2*, *chs-1* e região ITS.

A árvore filogenética de Inferência Bayseana concatenada com os genes *gapdh*, *tub2*, *chs-1* e região ITS para o complexo gloeosporioides foram representados por vinte e quatro isolados obtidos de folhas de pinheira e graviroleira com sintomas de antracnose. O alinhamento apresentou 1713 caracteres, nos quais 388 são sítios informativos parsimonia e 1140 sítios conservados. Os limites do locus nos alinhamentos foram: TUB2: 1-725, GAPDH: 725-1035, CHS: 1036-1334 e ITS: 1334-1713. O modelo de substituição selecionado para os genes baseado no Akaike Information Criterion (AIC) está descrito na tabela 4.

Os isolados agruparam-se com as espécies de *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. siamense* e *C. tropicale* confirmando com as espécies previamente descritas anteriormente. O grupo I agruparam-se 11 isolados, o grupo II (3), grupo III (1), grupo IV (9) isolados (Figura 5).

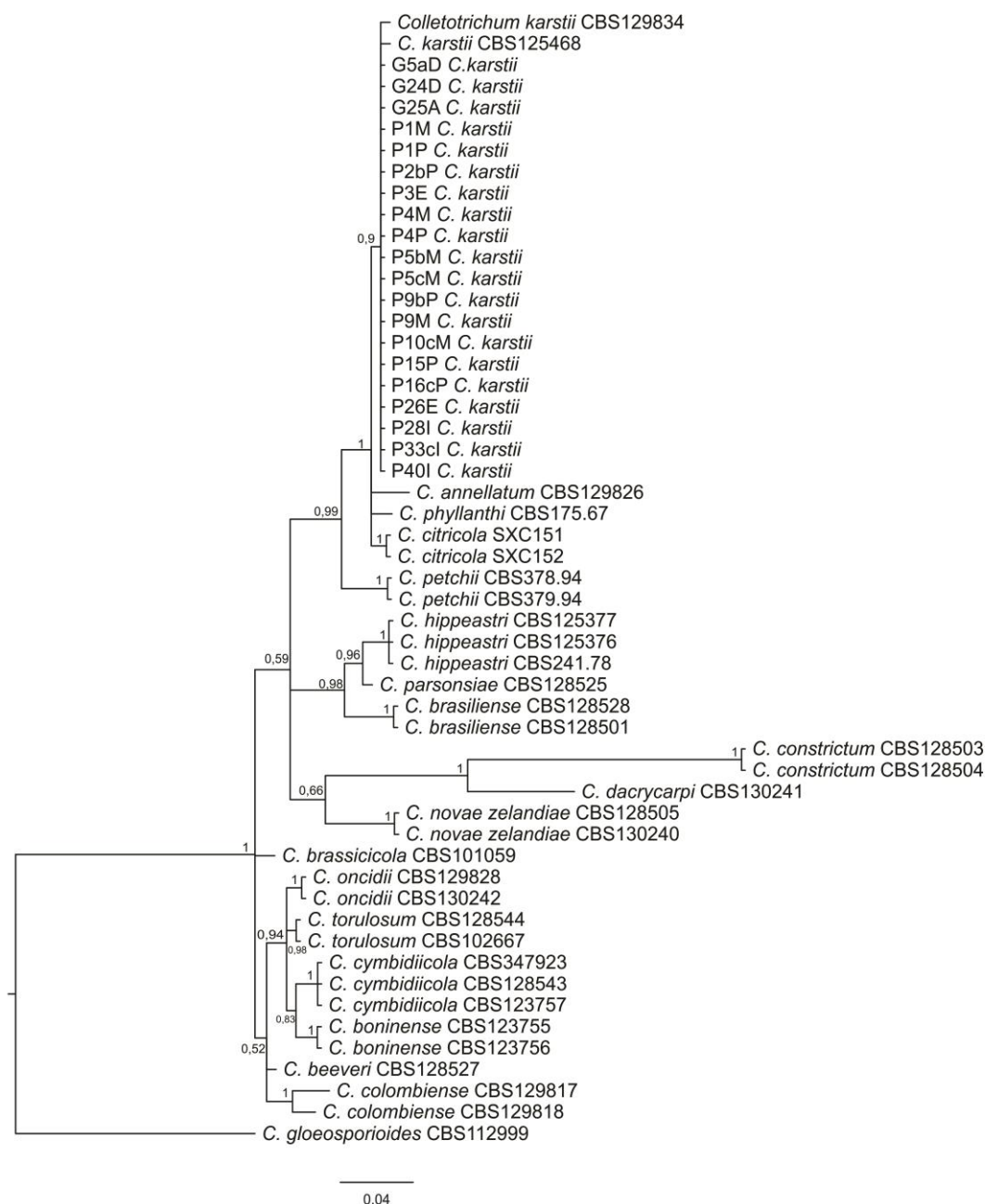
No grupo I estão agrupados 11 isolados de pinha e graviola das áreas de plantio dos municípios de Estrela de Alagoas, Palmeira dos Índios, Maragogi e Maceió, representando o maior clado da árvore, e foram identificados como pertencentes à espécie de *C. fructicola*. Essa espécie foi originalmente descrita causando antracnose em bagas de café (*Coffea arabica* L.) na Tailândia (PRIHASTUTI et al., 2009).

Figura 3 - Árvore filogenética de Inferência Bayseana com isolados de *Colletotrichum* do complexo gloeosporioides, usando o gene GAPDH. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de *Colletotrichum* de anonáceas. *Colletotrichum boninense* foi usado como outgroup.



Fonte: Costa, JFO, 2014

Figura 4 - Árvore filogenética de Inferência Bayseana com isolados de *Colletotrichum* do complexo boninense, usando o gene GAPDH. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de *Colletotrichum* de anonáceas. *Colletotrichum gloeosporioides* foi usado como outgroup.



Fonte: Costa, JFO, 2014

Atualmente *C. fruticola* está associado a diversas culturas de interesse agrícola como: frutos de mamão (*Carica papaya* L.), pimenta (*Capsicum frutescens* L.) e longan (*Dimocarpus longan* Lour.) na Tailândia (PHOULIVONG et al., 2010), cacau (*Theobromae cacao* L.) no Panamá (ROJAS et al., 2010), macieira (*Malus sylvestris* L.)

e morango (*Fragaria vesca* L.) nos Estados Unidos, inhame (*Dioscorea alata* L.) na Nigéria (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012) citrus (*Citrus* spp.) (PENG et al., 2012), gramínes tropicais (MANAMGODA et al., 2013), em lesões foliares de *Amelopsis* sp. (PENG et al., 2012) e mais recentemente foi relatada em frutos de uva (*Vitis* sp. L.) na China (HUANG et al., 2013).

No Brasil existem relatos da ocorrência dessa espécie em macieira (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012; BRAGANÇA, 2013), frutos de goiaba (*Psidium guajava* L.) (BRAGANÇA, 2013) e em frutos e folhas de mangueira (*Mangifera indica* L.) (LIMA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014). *C. fructicola* apesar de estar associado à várias culturas agronomicamente importantes, não se têm relato infectando anonáceas no mundo.

Quatro isolados agruparam-se no grupo II, todos provenientes do pomar localizado no município de Maceió, esses foram identificados como *C. tropicale*. Essa espécie foi descrita por Rojas et al. (2010) a partir de frutos de cacau em florestas tropicais do Panamá, e mais recentemente em *Annona muricata* no Panamá e em Lichia (*Litchi chinensis* Sonn) (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012), gramínea (*Terpsichore taxifolia* L.) em Porto Rico (DOYLE et al., 2013).

*Colletotrichum tropicale* é um patógeno comum associado a *A. muricata* e *T. cacao*, no Panamá (UDAYANGA et al., 2013). Trabalhos recentes relataram a ocorrência dessa espécie infectando frutos de manga no nordeste do Brasil, utilizando marcadores multilocus (LIMA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014).

O grupo III está representado por um isolado, localizado no pomar do município de Delmiro Gouveia, agrupando com a espécie de *C. siamense*. A espécie *C. siamense* foi originalmente descrita a partir de frutos de café assintomaticos na Tailândia, sendo um patógeno geograficamente diversificado, pois são encontrados em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (PRIHASTUTI et al., 2009; YANG et al., 2009). O primeiro relato dessa espécie ocorreu no Norte da Austrália em oito espécies de plantas: café, cacau, pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), figueira (*Ficus carica* L.), jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), ameixa-amarela (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl), hotelã (*Mentha* sp. L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (JAMES et al., 2014). *C. siamense* é uma espécie descrita recentemente e portanto se tem muito poucos estudos sobre sua epidemiologia (JAMES et al., 2014).

Udayanga et al. (2013), identificaram que a espécie *C. siamense*, causava sintomas de antracnose em variedades de frutas tropicais de pré e pós-colheita coletados

a partir de hortas e pomares na Tailândia, incluindo as culturas do Ficus (*Ficus racemosa* L.), manga, café, condessa (*Annona reticulata* L.). Os mesmos autores ainda afirmam que *C. fructicola* e *C. siamense* são espécies dominantes em frutas tropicais amostrados nos mercados locais na Tailândia. Essas espécies também esta bastante diversificada nos pomares brasileiros como em goiaba, manga, abacate (*Persia americana* Mill), pêssego (*Prunus persica* L.), maçã (*Malus domestica* (Borkh.) Borkh.), e caju (*Anacardium occidentale* L.) (BRAGANÇA, 2013).

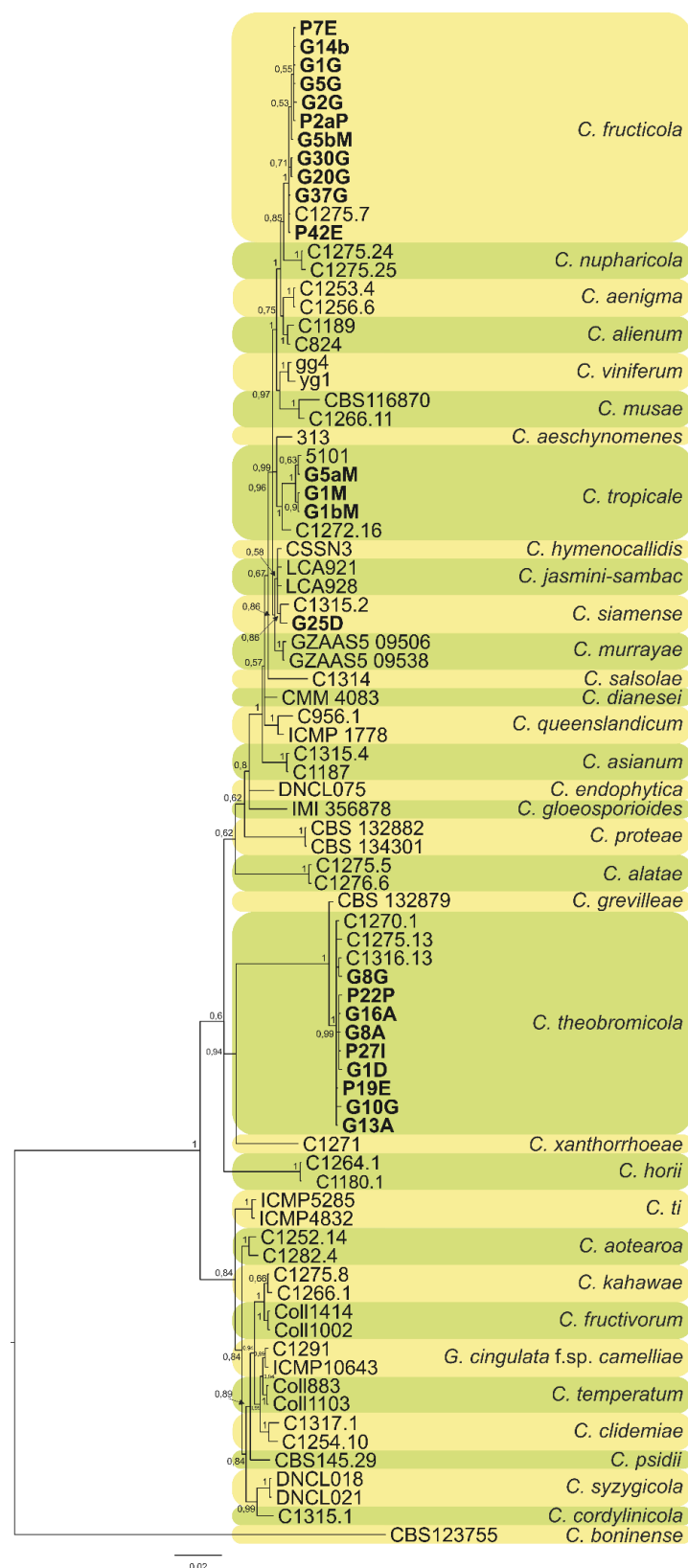
O grupo IV apresentou 9 isolados, esses foram agrupados com a espécie *C. theobromicola* de acordo com dados filogenéticos e observa-se que essa espécie está presente em todas as áreas de plantio de anonáceas amostradas no trabalho.

A espécie *C. theobromicola* foi descrita pela primeira vez em frutos de cacau por Rojas et al. (2010). Atualmente, encontra-se distribuídas em vários países como Israel, Austrália, México, Nova Zelândia, Panamá, Estados Unidos (WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012). No Brasil foi relatada apenas em acerola (*Malpighia emarginata* DC) (BRAGANÇA, 2013).

James et al., 2014 identificaram *C. theobromicola* em plantas de cafeeiro exibindo sintomas de antracnose nas folhas, caules e flores no final da estação seca no norte da Austrália, afirmando ser a primeira identificação dessa espécie na cultura no café. Weir, Johnston, Damm (2012), em suas pesquisas, consideram *C. fragariae* como sinonímia de *C. theobromicola*. Porém os autores utilizaram o nome *C. theobromicola* para identificação desses isolados, relatando que a espécie tipo de *C. fragariae* fica em um clado de bootstrap com suporte alto contendo uma ampla gama de hospedeiros de várias partes do mundo, incluindo a espécie tipo de *C. theobromicola*. Essa espécie foi associada à cultura de paupasa (*Annona diversifolia* Saff.) no México e em folhas de graviroleira (*Annona muricata* L.) no Panamá (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; UDAYANGA et al., 2013; ROJAS et al., 2010), os dados desse trabalho corroboram com os encontrados por outros autores.

Villanueva-Arce et al., 2005; 2008, observaram a ocorrência da espécie *C. fragariae* causando sintomas de antracnose em frutos de cherimólia (*Annona Cherimola* Mill.) quando utilizaram apenas sequencias da região ITS. Kamei et al., 2014 trabalhando com a combinação dos primers ITS1 e ITS4, relataram duas espécies, *C. boninense* e *C. magna* causando sintomas de antracnose em folhas de pinha e graviola.

Figura 5 - Árvore filogenética de Inferência Bayseana com 24 isolados de *Colletotrichum* do complexo gloeosporioides, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, CHS-1, TUB-2 e ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de *Colletotrichum* de anonáceas. *Colletotrichum boninense* foi usado como outgroup.



Fonte: Costa, JFO, 2014

Seis isolados agrupados com a espécie *C. karstii* através do gene *gapdh* foram escolhidos para representar o complexo boninense usando análise multilocus com os genes *gapdh*, *tub2*, *chs-1* e a região ITS para confirmar a filogenia (Figura 6). Após o alinhamento obteve 1651 caracteres, nos quais 327 são sítios informativos parsimonia e 1189 sítios conservados. Os limites do locus nos alinhamentos foram: GAPDH: 1-311, ITS: 312-869, CHS: 870-1149, TUB2: 1150-1651. O modelo de substituição selecionado para os genes baseado no Akaike Information Criterion (AIC) está descrito na tabela 4.

A espécie *C. karstii* foi primeiramente descrita infectando folhas de orquídeas na China, sendo considerada um importante patógeno da família *Orchidaceae* (YANG et al., 2011; JADRANE et al., 2012) e em folhas de citrus com sintomas de antracnose através de análise morfológicas multilocus (PENG et al., 2012). Tozze et al., 2010, relataram a ocorrência de *C. boninense* em frutos de maracujá, posteriormente, Damm et al. (2012), a partir de análise com o gene *gapdh*, confirmaram que a espécie que causava antracnose em maracujá era *C. karstii*.

Alguns autores citaram *C. boninense* sendo o agente causal da antracnose em plantas das famílias *Proteacea* (LUBBE et al., 2004, 2006; CROUS et al., 2004) e *Agavaceae* (FARR et al., 2006). No entanto, Damm et al. (2012) identificaram como sendo *C. karstii* o agente causal. Na cultura das anonáceas *C. karstii* foi relatada em frutos de cherimólia, através da análise multilocus dos genes *act*,  $\beta$ -tubulina, *its*, *gapdh*, *cal*, *tub2*, *chs-1*, no México e Nova Zelândia (DAMM et al. 2012). Huang et al. (2013), trabalhando com amostras de folhas e partes de tecido assintomático de citrus na China, através de métodos moleculares identificaram a espécie *C. karstii* como causador de antracnose nesta cultura.

A espécie *C. karstii* é considerada a espécies mais diversificada do complexo boninense, causando doença em várias culturas, como citrus, maracujá, tomateiro (*Lycopersicum esculentum* L.), bananeira (*Musa* spp.), entre outras. No Brasil, foi relatada em *Bombax aquaticum* (Aubl.) K.Schum, pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (DAMM et al., 2012), frutos de manga com sintomas de antracnose (LIMA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014) e mais recentemente, em macieira (VELHO et al., 2014).

Espécies de *Colletotrichum* estão associadas à antracnose em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo frutas tropicais cultivados e selvagens (UDAYANGA et al., 2013). A espécie *C. gloeosporioides* foi associada à anonácea pela primeira vez no

Brasil no trabalho de Freire, Cardoso, 1997. Posteriormente, Takahashi (2008), verificou em seus estudos com atemóia através da caracterização patogênica, cultural e morfológica que as espécies *C. gloeosporioides*, *C. musa* e *C. acutatum* além de causar antracnose nos frutos jovens, também causava lesões nos ramos, folhas e flores, podendo ocorrer infecções conjunta de mais de uma espécie em condições de campo. No entanto, não se tem nenhum outro relato dessas espécies causando antracnose nessa cultura, provando que caracterização morfológica e patogênicas são insuficientes para determinar espécies do gênero *Colletotrichum*.

Observa-se também nesse estudo que uma mesma planta pode apresentar mais de uma espécie de *Colletotrichum*, é o caso dos isolados de graviola (G5aD) e pinha (P33cI) que pertencem a espécie *C. karstii* e os isolados de graviola (G5cD) e pinha (P33aI) que pertencem as espécies *C. siamense* e *C. theobromicola*, respectivamente. Outro caso é o dos isolados do pomar Maceió G5aM que pertence a espécie *C. tropicale* e G5bM a espécie *C. fructicola*, provando assim, a diversidade de espécies encontradas em uma única planta.

A associação de diferentes espécies de *Colletotrichum* causando sintomas de antracnose em uma mesma cultura já foi relatada (FREEMAN, KATAN, SHABI, 1998; ÁLVAREZ et al., 2004), especialmente as espécies de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, em frutos de goiaba (PERES et al., 2002), *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. capsici* em maracujá (ALAHAKOON, BROWN, SREENIVASAPRASAD, 1994; TARNOWSKI, PLOETZ, 2010); *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. fragariae* em morango e pimenta (HOWARD et al., 1992; SANHUEZA, CALEGARIO, 2006; KIM et al., 2009; PHOULIVONG, et al, 2010; THAN et al., 2008; ÁLVAREZ et al. 2004) e o mesmo pode estar ocorrendo nos pomares de anonáceas no Brasil, necessitando, portanto, estudos mais detalhados relacionados às espécie de *Colletotrichum* nessa cultura.

As espécies de *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. karstii*, já foram relatados como agente causal de antracnose na cultura das anonáceas. Portanto, os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com outros estudos já realizados anteriormente.

Sequências da região ITS estão disponíveis para todas as espécies de *Colletotrichum*, no entanto, há necessidade de sequenciar outras regiões (HYDE et al., 2014). Atualmente, estudos usando a filogenia multilocus incluindo os genes, actina (ACT), chitin sintase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2) calmodulina (CAL), gliceraldeído-3-

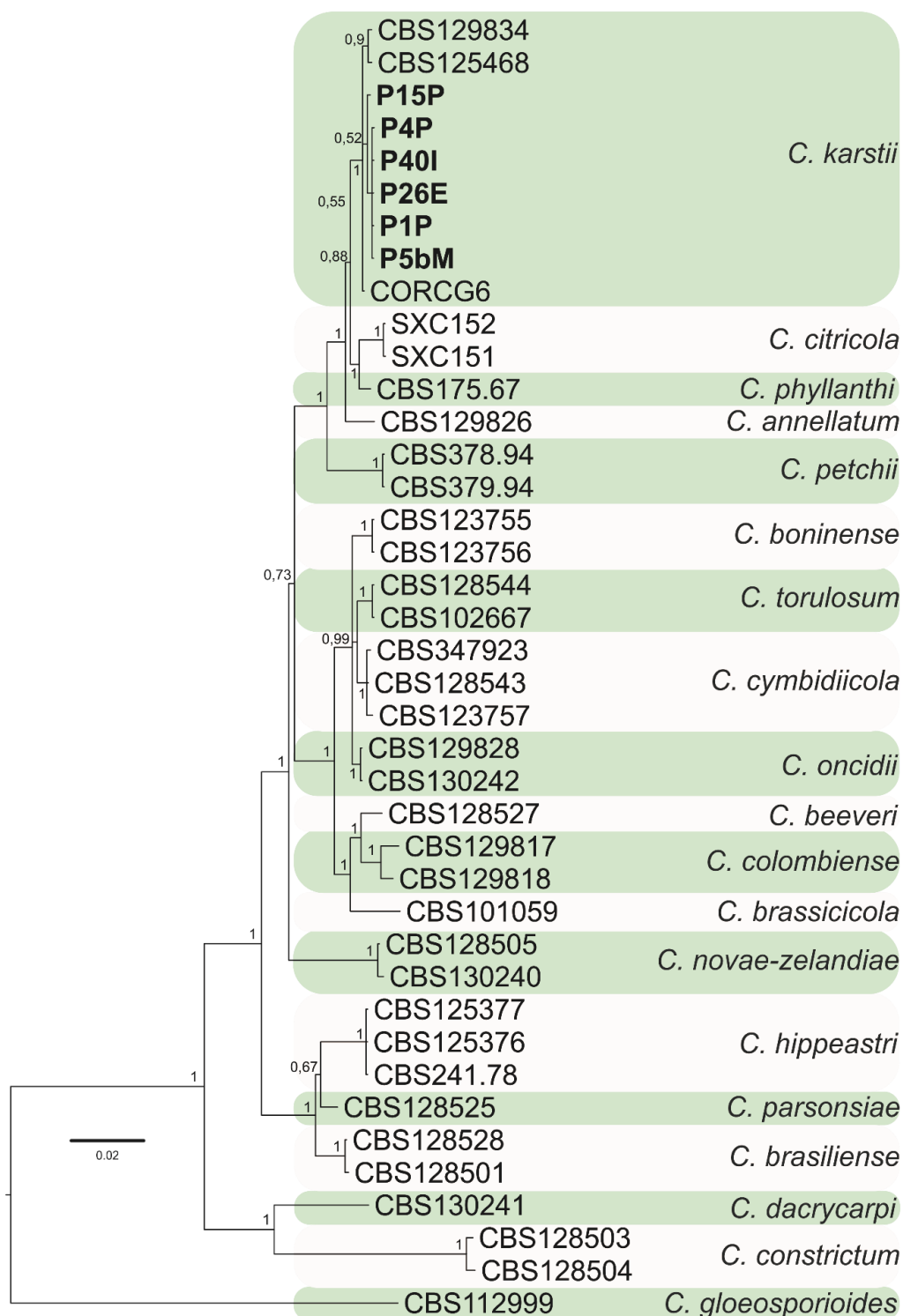
fosfato-desidrogenase (GAPDH), histamina (HIS3), glutamina sintetase (GS), DNA lyase (apn2), e genes da região Intergenômica (ApMat), estão sendo usados para identificar espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009; WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012; PENG et al., 2012; DOYLE et al., 2013; SHARMA et al., 2013). No entanto, não existe entre os micologistas um acordo para qual marcador deve ser usado para separar as espécies (SHARMA et al. 2013). Identificação de fungos ao nível de espécie é um componente fundamental de muitos esforços de pesquisa em ciências da vida (BEGEROW et al., 2010).

Tabela 4 - Modelo de substituição selecionado para os genes através do programa MrModeltest 2.3.

| <b>Gene</b> | <b>Complexo gloeosporioides</b> | <b>Complexo boninense</b> |
|-------------|---------------------------------|---------------------------|
| GAPDH       | HKY+I                           | HKY+G                     |
| ITS         | SYM+G                           | SYM+I+G                   |
| TUB2        | HKY+G                           | HKY+I                     |
| CHS-1       | K80+I+G                         | GTR+I                     |

HKY- Hasegawa, Kishino e yano; SYM - Symmetrical Model; GTR - General time reversible;  
K80 - Kimura 2-parâmetros; B - Distribuição gama; I - proporção de sítios invariáveis  
Fonte: Costa, JFO, 2014

Figura 6 - Árvore filogenética de Inferência Bayseana com 6 isolados de *Colletotrichum* do complexo boninense, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, CHS-1, TUB-2 e ITS. A árvore mostra as relações filogenéticas de espécies de *Colletotrichum* de anonáceas. *Colletotrichum gloeosporioides* foi usado como outgroup.



Fonte: Costa, JFO, 2014

### 3.3.3 Estudos morfológicos das espécies de *Colletotrichum*

Os isolados das espécies de *Colletotrichum* apresentaram-se heterogêneos quanto a coloração e agruparam-se em cinco morfogrupos (Figura 7). O morfogrupo I compreendem os isolados que apresentaram micélio esverdeado, bordas brancas e reverso esverdeado com branco, morfogrupo II isolados com micélio branco e reverso branco. Isolados que apresentaram o micélio cinza claro, bordas brancas, reverso cinza agrupou-se ao morfogrupo III. Colônias com aspectos cinza escuro, reverso cinza escuro pertence ao morfogrupo IV e colônias com micélio róseas pertencem ao morfogrupo V. As espécies *C. karstii* e *C. fructicola* agruparam-se aos morfogrupos I, II e III. *C. tropicale* agrupou-se nos morfogrupos II e III. A espécie *C. siamense* ao morfogrupo II e *C. theobromicola* aos morfogrupos I, III, IV e V.

Observou-se a presença de setores em alguns isolados, identificados pela presença de áreas claras em colônias que normalmente exibiam coloração escura, ou áreas escuras em colônias que exibiam coloração clara. Isolados de cucurbitáceas apresentaram pequeno número de setores, este fato pode estar relacionado com a utilização de culturas monospóricas (SUSSEL, 2005). Kuramae-Izioka et al. (1997), também relataram a formação de setores em isolados monospóricos de *C. gloeosporioides*.

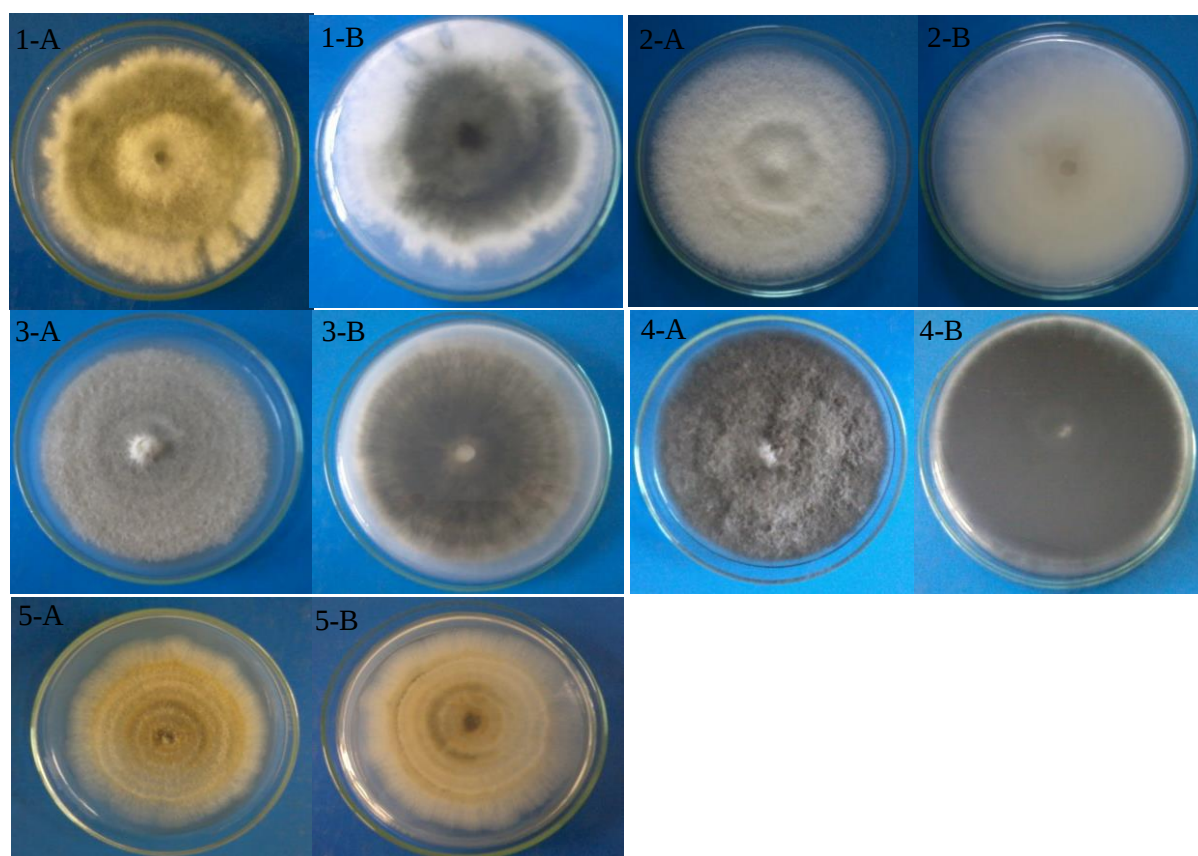
As características culturais observadas nos isolados das espécies de *Colletotrichum* provenientes de pinheira e gravioleira assemelha-se as encontradas por vários autores com Sutton (1992); Damm et al., 2012; Sutton (1980;1992) e Weir, Johnston, Damm (2012) que descrevem as colônias do gênero *Colletotrichum* como sendo bastante variáveis, com micélio branco-gelo, acinzentado a cinza escuro, com reverso branco ao cinza ou cinza escuro, cinza e micélio aéreo branco, reverso incolor a laranja com manchas escuras e conídios em massa alaranjada. Além disso, as características culturais sofrem mudanças com a influência das condições de cultivo (COUTO, MENEZES, 2004).

As médias de crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* estão descritas na tabela 5, variando estatisticamente para algumas espécies. Observa-se que *C. siamense* foi o que obteve a maior média (1.34cm/dia) e *C. fructicola* a menor média (0.90 cm/dia). Apesar de alguns grupos apresentarem similaridade com algumas espécies de *Colletotrichum*, a identificação com base em características culturais possui caráter parcial. As análises de coloração das colônias são muito subjetivas, podendo ter

interpretações distintas. Muitos fatores como temperatura, luminosidade e meio de cultura, podem afetar a estabilidade das colônias e aspecto (MENEZES, 2002). Damm et al. (2012) afirmam que a identificação de espécies de *Colletotrichum* é difícil se for baseada apenas em dados morfo culturais.

A aparência macroscópica das culturas é muitas vezes divergentes dentro de uma espécie e não são significativas para classificação e diferenciação, onde na maior parte dos casos provavelmente reflete no local de armazenamento das amostras examinadas (DAMM et al., 2012; KAMEI et al., 2014; HAYER, 2010). No entanto, o mesmo padrão de cor é apontado para várias espécies do gênero *Colletotrichum*, como observado nos trabalhos de Couto, Menezes (2004) e Souza, Souza, Mendes-Costa (2007) em que espécies de *Colletotrichum*, apresentaram a mesma variação de cor da colônia.

Figura 7 - Aspecto dos seis morfogrupos de isolados de *Colletotrichum* cultivados em meio BDA, observadas ao 7º dia. Placas A: frente e B: verso.



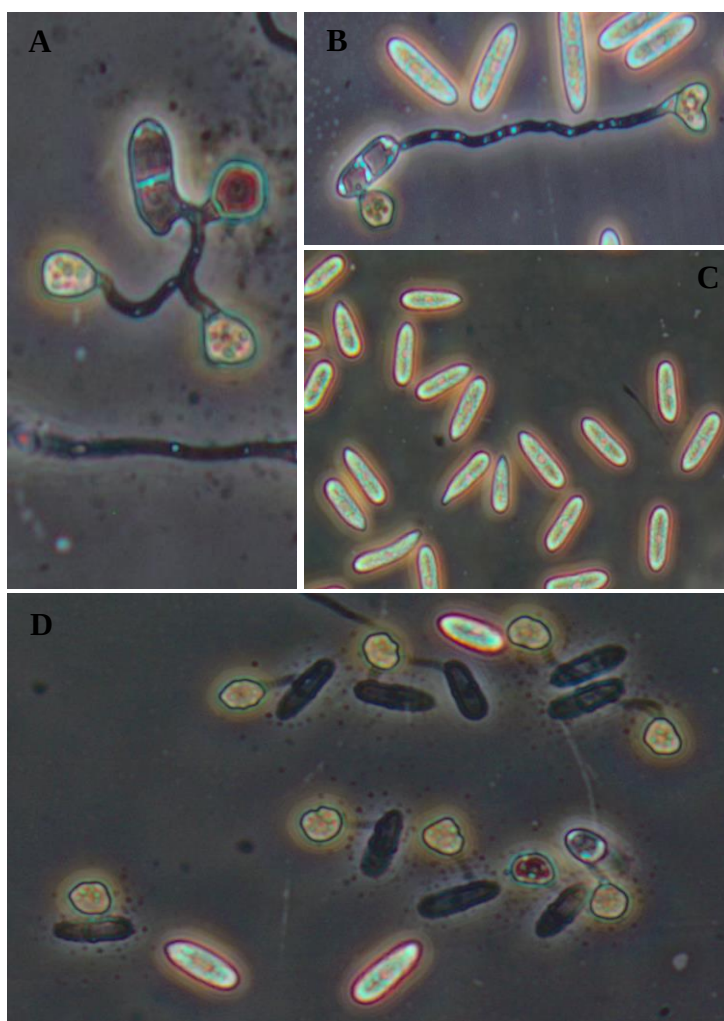
Fonte: Costa, JFO, 2014

Observações morfológicas das espécies de *Colletotrichum* estão mensurados na tabela 5, onde estatisticamente houve diferença nas médias para as variáveis analisadas. No geral, os conídios apresentaram-se hialinos, unicelulares e gutulados. Alguns conídios após a germinação emitiram até quatro tubos germinativos com apressórios, sendo esta característica típica do gênero *Colletotrichum* (MENEZES, 2006). Os apressórios, apresentaram-se melanizados. A pigmentação está relacionada com a capacidade de penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2006).

Os conídios e apressórios de espécies de *Colletotrichum* provenientes de sintomas de antracnose em folhas de pinheira e graviroleira, foram separados baseados nas observações descritas por alguns autores como Sutton (1980;1992) e Weir, Johnston, Damm (2012). A espécie *C. theobromicola* apresentaram conídios retos, cilíndricos com ápices arredondados, sendo um mais estreito que o outro, com valores médios de comprimento e largura  $X=16.55 \times 4.82\mu\text{m}$  (Figura 8). Rojas et al. (2010), observaram que os conídios de *C. theobromicola* em cacau apresentavam comprimento e largura de 16.0-5.0 $\mu\text{m}$ .

Valores para conídios superiores aos encontrados neste trabalho já foram descritos por Mackenzie et al. (2008) (19.2 - 20.5 x 5.2 - 6.0  $\mu\text{m}$ ), Villanueva-Arce, Yáñez-Morales, Hernández-Anguiano (2008) (13.3 - 20 x 3.3 - 4,4  $\mu\text{m}$ ). Nos estudos de Sharma et al., 2013 com manga relatam conídios variando de 14.5-18.7  $\mu\text{m}$  de comprimento e 4.5 e 5.5 $\mu\text{m}$  de largura. Os apressórios apresentaram formatos irregulares e os valores encontrados para comprimento e largura  $X= 8.04\text{-}5.73\mu\text{m}$ .

Figura 8 - Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *Colletotrichum theobromicola*. A. apressórios (G22G); B-C-D. conídios e apressórios (G10A; P27I; P46aI), respectivamente.



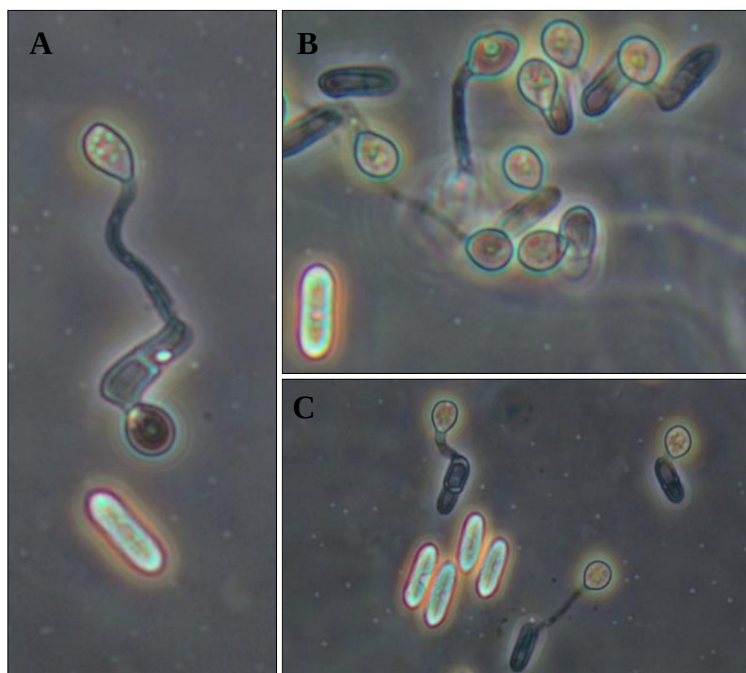
Fonte: Costa, JFO, 2014

A espécie *C. tropicale* e *C. siamense* apresentaram formato de conídios curtos e largos com extremidades arredondados, com uma leve contração perto do centro. As médias de comprimento e largura dos conídios foram de 12.76 - 4.76 $\mu$ m e 13.55 - 4.42 $\mu$ m para as espécies *C. tropicale* e *C. siamense*, respectivamente (Tabela 5). Os apressórios, os formatos predominantes foram ovóides (Figura 9) e a média paracomprimento e largura foi de 7.20- 5.56 $\mu$ m para *C. siamense* e 8.63-6.15 $\mu$ m para *C. tropicale*.

Weir, Johnston, Damm (2012), relatam que *C. siamense* e *C. tropicale* são espécies geneticamente semelhantes e compartilham uma série de características morfológicas. Resultados semelhantes para conídios de *C. tropicale* e *C. siamense*

foram encontrados por Álvarez et al. (2014), na cultura da pinha na Colômbia. Sharma et al., 2013, estudando *C. siamense* na cultura da manga, observaram conídios menores 10.2-3.6  $\mu\text{m}$ , que encontrados em anonácea.

Figura 9 - Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *C. tropicale* e *C. siamense*. A-B-C. conídios e apressórios (G5aM; G1bM).



Fonte: Costa, JFO, 2014

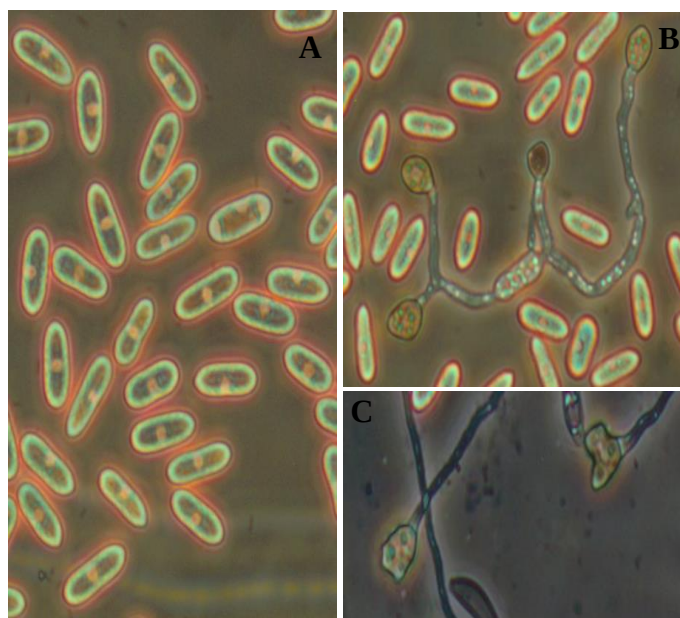
Os conídios retos, cilíndricos, com ápices arredondados nas duas extremidades, apresentando uma leve cicatriz em sua base (Figura 10a), característicos de espécies do complexo boninense (MORIWAKI et al., 2003; DAMM et al., 2012), a qual pertence a espécie *C. karstii*.

As dimensões médias dos conídios foram de 12.96-5.23 $\mu\text{m}$  para o comprimento e largura, respectivamente (Tabela 5). O formato e tamanho dos conídios foram similares aos descritos por LIMA et al. (2013), para *C. karstii*, associada a frutos de manga. Huang et al., 2013, observaram tamanhos de conídios variando de 13.7-16.1 x 5.9-6.9 $\mu\text{m}$  em folhas de citrus. Os apressórios apresentaram as formas globosas a irregulares com prevalência para o formato globoso (Figura 10b) e a média para comprimento e largura foi de 8.80-6.44 $\mu\text{m}$ . Peng et al., 2012 encontraram valores

médios semelhantes para conídios (15.19-6.20  $\mu\text{m}$ ) e apressórios (8.55-8.80  $\mu\text{m}$ ) em folhas de citrus com sintomas de antracnose na China.

As médias dos conídios e apressórios obtidos neste estudo também corroboram com o trabalho de Velho et al., 2014, em macieira no Brasil. Damm et al. (2012), relatam que a variabilidade morfológica de *C. karstii* é alta, com diferenças no tamanho de conídios tornando-se a identificação difícil baseando-se apenas em dados morfológicos.

Figura 10 - Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *Colletotrichum karstii*. A. conídios (G5aD); B. conídios e apressórios (G5aD); C. apressórios (P40I).



Fonte: Costa, JFO, 2014

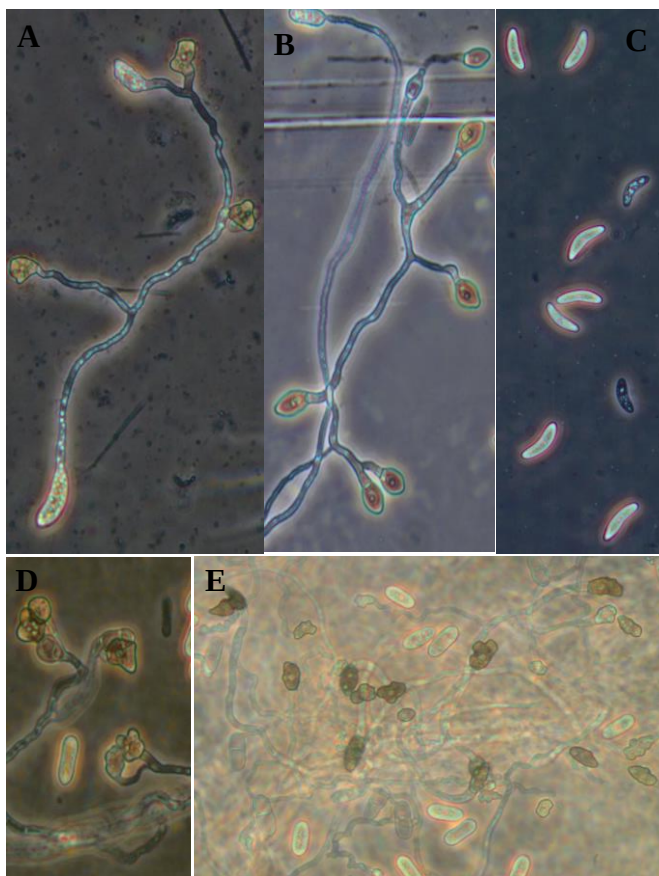
Os conídios compridos com as duas extremidades afiladas, curvados, curtos arredondados e hialinos foram agrupados com *C. fructicola*. Os valores médios para comprimento e largura dos conídios foram de 17.96-4.81 $\mu\text{m}$ . Os apressórios apresentaram-se globosos, clavados, irregulares (Figura 11), as médias de comprimento e largura foram de 7.43-5.85 $\mu\text{m}$  (Tabela 5).

Peng et al., 2012 encontrou resultados semelhantes para conídios ( $X = 12.56\mu\text{m}$ ) e apressórios ( $X = 7.99\mu\text{m}$ ) em frutos de uva. Prihastuti et al., 2009, caracterizaram os conídios *C. fructicola* em frutos de café na Tailândia como, cilíndrico, ligeiramente

arredondados e hialinos medindo (9.7-14 x 3-4.3µm) e os apressórios como ovóides e clavados medindo (4.7-8.3 x 3.5-5µm). Yang et al., 2009 também observaram apressórios clavados e ovóides em isolados de *C. fructicola* a partir de lesões em espécies da família *Amaryllidaceae*.

O formato dos conídios e apressórios são de grande importância na identificação das espécies, mas não deve ser considerado o único parâmetro, uma vez que o patógeno pode sofrer influências do ambiente, apresentando alterações na estabilidade das características, sendo necessário a utilização conjunta de outros métodos para um melhor esclarecimento (GUNNELL, GUBLER, 1992; FREEMAN, KATAN, SHABI, 1998; MENEZES, 2006; CAI et al., 2009).

Figura 11 - Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *Colletotrichum fructicola*. A. conídio germinando (P6P); B. Apressorio (G3G); C. conídios; D-E. conídios e apressórios (G14bG; G1G).



Fonte: Costa, JFO, 2014

Tabela 5 - Médias de comprimento e largura de conídios e apressórios, velocidade de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum*.

| Espécies                | Conídios                       |                             | Apressórios                   |                              | TCM cm/dia   |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|
|                         | Comprimento (µm)               | Largura (µm)                | Comprimento (µm)              | Largura (µm)                 |              |
| <i>Colletotrichum</i>   |                                |                             |                               |                              |              |
| <i>C. theobromicola</i> | <b>16.55b</b><br>(11.3-18.9)   | <b>4.82b</b><br>(3.79-5.86) | <b>8.04bc</b><br>(5.41-11.02) | <b>5.73ab</b><br>(4.19-7.76) | <b>1.08b</b> |
| <i>C. fructicola</i>    | <b>17.96c</b><br>(10.53-22.8)  | <b>4.81b</b><br>(3.34-6.44) | <b>7.43ab</b><br>(5.92-9.35)  | <b>5.85ab</b><br>(4.04-7.09) | <b>0.90a</b> |
| <i>C. siamense</i>      | <b>13.55a</b><br>(12.01-15.40) | <b>4.42a</b><br>(3.08-5.46) | <b>7.20a</b><br>(4.10-10.75)  | <b>5.56a</b><br>(3.73-7.19)  | <b>1.34c</b> |
| <i>C. tropicale</i>     | <b>12.76a</b><br>(10.21-15.87) | <b>4.76b</b><br>(3.38-5.74) | <b>8.63cd</b><br>(5.51-11.31) | <b>6.15bc</b><br>(4.27-9.28) | <b>1.16b</b> |
| <i>C. karstii</i>       | <b>12.96a</b><br>(8.66-17.53)  | <b>5.23c</b><br>(4.08-5.87) | <b>8.80d</b><br>(5.92-10.71)  | <b>6.44c</b><br>(4.22-9.28)  | <b>1.09b</b> |

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

TCM= Taxa de crescimento micelial em cm.

Fonte: Costa, JFO, 2014

### 3.4 CONCLUSÕES

As características culturais e morfológicas não devem ser utilizadas como únicas ferramentas para identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*.

As espécies *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii*, *C. siamense* e *C. theobromicola* foram identificadas como agentes causais da antracnose em folhas de *A. muricata* e *A. squamosa* no estado de Alagoas.

Este é o primeiro relatado mundial da ocorrência de *C. fructicola* em folhas de *A. muricata* e *A. squamosa*.

## REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, E., OSPINA, C. A., MEJÍA, J. F., LLANO, G. A. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) em guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. **Fitopatología Colombiana**. v. 28, p. 1-8, 2004.
- ÁLVAREZ, E., GAÑÁN, L., ROJAS-TRIVIÑO, A., MEJÍA, J.F., LIANO, G.A., GONZÁLEZ, A. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. **Plant Pathol.** v.139, p.325-338, 2014.
- ALAHAKOON, P.W., BROWN, A.E., SREENIVASAPRASAD, S. Genetic characterisation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates obtained from mango. **International Journal of Pest Management**. v. 40, p. 225-229, 1994.
- ANDRADE, E. M., UESUGUI, C. H., UENO, B., FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 32, p.21-31, 2007.
- BAILEY, J. A., O'CONNELL, R. J., PRING, R. J., NASH, H. C. 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.
- BEGEROW, D., NILSSON, H., UNTERSEHER, M., MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Appl. Microbiol. Biot.** 87, 99-108. 2010.
- BRAGANÇA, C.A.D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. University of São Paulo “Luiz de Queiroz” College of Agriculture. Piracicaba. 2013. 69p:il Tese (Doutorado). Escola superior “Luiz de Queiroz”.
- BRAGA SOBRINHO, R. B. Potencial de exploração de anonáceas no Nordeste do Brasil. 17ª Semana da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza-CE. 2010.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.70, p. 181-184. 1967.

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

CANNON, P.F., DAMM U, JOHNSTON, P.R., WEIR, B.S. *Colletotrichum*- current status and future directions. **Stud Mycol.** v.73, p.181-213, doi:10.3114/sim0014. 2012.

CARBONE, I., KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia.** v.91, p.553-556. 1999.

COLATTO, U. L. D. **Reação de progênes de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*).** Dissertação (Mestrado em Agronomia) -Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2010.

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

CROUS, P.W. et al. MycoBank: na online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in Mycology.** v. 50, p.19-22. 2004.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Stud Mycol.** v. 73, p.1-36. 2012.

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.

DOYLE, V. P., OUDEMANS, P.V., REHNER, S.A., LITT, A. Habitat and Host Indicate Lineage Identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from Wild and Agricultural Landscapes in North America. **PLoS ONE** 8(5): e62394. doi:10.1371/journal.pone.0062394. 2013.

EDGAR, R.C., MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics.** v.5, p.1-19. 2004.

FARR, D.F., AIME, M.C., ROSSMAN, A.Y., PALM, M.E., Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. **Mycol Res.** v. 110, p. 1395-1408. 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5. 0. In: Reunião Anual Da Região Brasileira Da Sociedade Internacional De Biometria, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. p.255-258. 2000.

FRANCISCO NETO, E.; OLIVEIRA, J. C. de; CENTURION, M. A. P. C.; NAKAMURA, K. Influência da idade da folha, da luz e do método de inoculação na infecção de *Passiflora* por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 1, p. 25-30, 1995.

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

FREIRE, F. das C. O.; CARDOSO, J. E. **Doenças das anonáceas**. In: JOSÉ, A. R.; VILAS BOAS, I.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. (eds.). Anonáceas: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). Vitória da conquista: Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, p. 196-213, 1997.

GLASS, N.L., DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**. v. 61, p.1323-1330. 1995.

GUERBER, J.C, LIU, B. CORRELL, J.C., JOHNSTON, P.R., Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, v. 95, p. 872-895. 2003.

GUIMARÃES, G. R. **Diversidade e caracterização morfo cultural, biológica, bioquímica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.** Monografia (Especialização)-Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Urutaí, 2011.

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

HAYER, J. F. S. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, 2010.

HOWARD, C. M., MAAS, J. L., CHANDLER, C. K., ALBREGTS, E. E. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. **Plant Disease**. v. 76, p. 976-981, 1992.

HUANG, F. et al. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. **Fungal Diversity**. v.61, p. 61-74, 2013.

HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F., NIELSEN, R., BOLLBACK, J. P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v.294, p. 2310-2314. 2001.

HUELSENBECK, J.P., LARGET, B., MILLER, R. E., RONQUIST, F.. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. **Syst. Biol.** v.51, p. 673-688. 2002.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I. **Fungal Diversity**. v. 67, p. 21-125 DOI 10.1007/s13225-014-0298-1. 2014.

JADRANE, I. et al. First Report of flower anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in white Phalaenopsis orchids in the United States. **Plant Dis.** v. 96, p.1227. 2012.

JAMES, R.S., RAY, J., TAN, Y. P., SHIVAS, R. G. *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory. Australia. **Australasian Plant Dis. Notes** DOI 10.1007/s13314-014-0138-x. 2014.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. téc - **Embrapa Cerrados Planaltina**. Embrapa Cerrados Ministério da Agricultura e do Abastecimento. n. 16. p.1-33 jun. ISSN 1517-0187. 2001.

JUNQUEIRA, N. T. V., JUNQUEIRA, K. P. **Principais doenças de anonáceas no Brasil: Descrição e Controle**. v. 36, edição especial, p. 55-64, Janeiro 2014.

KAMEI, S. H. et al. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.36, ed. Especial. Janeiro, 2014.

KIM, W. G., HONG, S.K. CHOI, H.W., LEE, Y.K., Ocurrence of Anthracnose on highbush blueberry caused by *Colletotrichum* species in Korea. **Micobiology** Dec, 37 (4): 310-312. 2009.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 4, p. 323-329, 1997.

LIMA, N.B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible Brazil. **Fungal Diversity**. v.61, p.75-88. 2013.

LEMOS, E.E.P. **Panorama de las anonas cultivadas em Brasil; saramuyo, guanábana y atemoya** (ISBN 97866077510919). In: Alma Rosa Gonzalez Esquinca; Lorena Mercedes Luna-Cazáres; Javier Gutiérrez-limenez; Maria Adelina Schile-Guzmán; Dolores Guadalupe Vidal-López (org.). Anonáceas, plantas antiguas estudios recientes. 1 Ed. Tuxtla Gutiérrez: Unicach, 2011.

LOPEZ, A. M. Q. Doenças das anonáceas e do urucuzeiro, p. 73-77. In KIATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (eds.), **Manual de Fitopatologia**. v.2, Doenças das plantas cultivadas, 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 663p., 2005.

LUBBE, C.M. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae. **Mycologia** 96:1268–1279. 2004.

LUBBE, C.M, et al. Pathogenicity of *Colletotrichum* species to Protea cultivars. **Australas Plant Path.** v. 35, p. 37-41. 2006.

MACKENZIE, S. J. et al. *Colletotrichum fragariae* is a pathogen on hosts other than strawberry. **Plant Dis.** v.92, p.1432-1438. 2008.

MANAMGODA, D. S. et al. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. **Fungal Diversity**. v.61, p.107-115 DOI 10.1007/s13225-013-0256-3. 2013.

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

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.

MILLS, P. R., SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98, p.137-143, 1992.

MORIWAKI, J., SATO, T., TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience**. v. 44, p.753. 2003.

NYLANDER, J.A.A. MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, **Uppsala University**. 2004.

NOGUEIRA, E. A., MELLO, N. T. C., MAIA, M. L. Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 2, fev. 2005.

O'DONNELLK, CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNAITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetic Evolution** 7:103-116. 1997.

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

PENG, L. et al. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Mycoscience**. v.53, p.29-41. 2013.

PERES, N.A.R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 128-134, 2002.

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. **Fungal Divers**. v. 39, p.89-109. 2009.

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.

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.

RIBEIRO, G. S. et al. Aspectos da biologia floral relacionados à produção de frutos de pinha (*Annona squamosa* L.). Acta Scientiarum. **Biological Sciences**. v. 29, p.369-373, 2007.

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. **Mycologia** 102:1318–1338. 2010.

SANHUEZA, R. M. V., CALEGARIO, F. F. **Produção de morangos no sistema semi-hidropônico**. Embrapa uva e vinho. Sistemas de Produção. 2006. Acesso em 20 de outubro de 2011. Disponível em:  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidroponico/doencas.htm>>.

SHARMA, G. ApMat gene can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Divers**. v. 61, p.117-138. 2013.

SILVA, D.N. et al. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. **Mycologia** . v.104, p. 396-409. 2012.

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 ago. 2012.

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. **Ciência e Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago. 2007.

SUSSEL, A.A.B., **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas**. Dissertação. Piracicaba. São Paulo. 2005.

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

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.

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

TARNOWSKI, T.L.B., PLOETZ, R.C., First report of *Colletotrichum boninense*, *C. capsici*, and a *Glomerella* sp. as causes of postharvest anthracnose of passion fruit in Florida. **Plant Disease**. v. 94, p.786. 2010.

THAN, P.P. et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, v.57, p.562-572, 2008.

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

TOZZE Jr. H.J. et al. First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** 5, p. 70-72. 2010.

UDAYANGA, D. et al. What are the common antracnose pathogens of tropical fruits. **Fungal Diversity**. v.61, p. 165-179. 2013.

VIEIRA, W. A. S. et al. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**. DOI 10.1007/s13225-014-0293-6. 2014.

VELHO, C. et al. **First Report of *Colletotrichum karstii* Causing *Glomerella* Leaf Spot on Apple**. Santa Catarina State, Brazil. January. v.98, nº 1. p.157. 2014.

VILLANUEVA-ARCE, R. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. **Agrociência**, v. 39, p.93-106, 2005.

VILLANUEVA-ARCE, R. et al. Espécies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Agrociência**, v.42, p.689-701, 2008.

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

WHITE, T. J, BRUNS, T. LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York, USA: p. 315-322. 1990.

YANG, Y.L. et al. *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. **Cryptog Mycolog.** v. 32, p.229-253. 2011.

YANG, Y.L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. **Fungal Divers.** 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.

#### 4 EPIDEMIOLOGIA COMPARATIVA DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS À ANTRACNOSE DE ANONÁCEAS NO ESTADO DE ALAGOAS.

##### RESUMO

Antracnose em anonáceas, causada por espécies do gênero *Colletotrichum* é um dos fatores limitantes à produção devido ao ataque severo nas folhas, frutos flores e pecíolo. Conhecendo a importância desta enfermidade para a cultura, avaliou-se a influência de seis temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C) na intensidade da antracnose induzida pelas espécies de *Colletotrichum*, a sensibilidade das espécies de *Colletotrichum* in vitro aos fungicidas tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina nas concentrações de 0.5, 1 e 10 µg de i.a. ml<sup>-1</sup> e o teste de sensibilidade in vitro de espécies de *Colletotrichum* a azoxistrobina na presença do ácido salicilhidroxâmico (SHAM). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises de variância e as comparações de médias foram realizados com o programa SISVAR. As espécies de *Colletotrichum* apresentaram maior agressividade à temperatura de 25°C. *Colletotrichum tropicale* foi a espécie que obteve maior desenvolvimento micelial na concentração de 10µg i.a. ml<sup>-1</sup> quando comparada com as outras espécies. Os fungicidas difenoconazole e tiofanato metílico obtiveram um melhor desempenho no controle in vitro das espécies de *Colletotrichum*, porém, todas as espécies apresentaram crescimento reduzido na presença dos fungicidas independente do princípio ativo. O fungicida azoxistrobina na presença do ácidosalicilhidroxâmico inibiu a rota alternativa das espécies de *Colletotrichum*.

**Palavras-chave:** Fungicidas. Ácido salicilhidroxâmico. *Annona squamosa*.

**EPIDEMIOLOGY COMPARATIVE *Colletotrichum* SPECIES ASSOCIATED WITH ANNONACEAE OF THE ANTHRACNOSE ALAGGOAS STATE.**

**ABSTRACT**

Anthracnose in Annonaceae, caused by *Colletotrichum* species, is one of the factors limiting production in this culture due to severe attack on the leaves, flowers and fruit petiole. Given the importance of this disease for culture, the influence of six different temperatures (10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C) in the intensity of Anthracnose induced by *Colletotrichum* species; the *in vitro* sensitivity of *Colletotrichum* species in the presence of the methyl thiophanate, difenoconazole and azoxystrobin fungicides at 0.5, 1 and 10 g ml<sup>-1</sup> concentrations; and *in vitro* susceptibility test of *Colletotrichum* species to azoxystrobin in the presence of salicilhidroxâmico acid (SHAM), have been evaluated. The means were compared by Tukey test at 5% probability. Analyses of variance and mean comparisons were performed with the SISVAR program. *Colletotrichum* species showed more aggressive at 25 ° C. *Colletotrichum tropicale* was the species with highest mycelial growth in the concentration of 10mg ml<sup>-1</sup> while compared with other species. The difenoconazole and thiophanate methyl fungicides showed the best *in vitro* control of *Colletotrichum* species, however, all species showed reduced growth in the presence of fungicides independent of their ingredient active. The fungicide azoxystrobin in presence of ácidosalicilhidroxâmico inhibited the mycelial growth of *Colletotrichum* species.

**Keywords:** Fungicides. Salicilhidroxâmico Acid. *Annona squamosa*.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A família Annonaceae é constituída por 135 gêneros e cerca de 2.300 espécies. Entre as espécies de maior importância comercial destaca-se a pinha (*Annona squamosa* L.) (CHATROU et al. 2004).

O Nordeste do Brasil destaca-se como principal produtor de pinha, sendo o estado da Bahia o maior produtor com plantios irrigados e bom nível tecnológico, com área total de 3.500 hectares cultivados e produção de 20,8mil toneladas (DONADIO, 1997; LEMOS, 2011). A fruta geralmente é consumida in natura, no entanto, pode ser obtido sucos, doces, licores, geleias, marmeladas e sorvetes (LEAL, 1990).

Dentre as doenças que afetam as anonáceas, destacam-se principalmente aquelas causadas por fungos, nas folhas e nos frutos (JUNQUEIRA et al., 2002). A antracnose, cujo agente causal são espécies do gênero *Colletotrichum*, é considerada de elevada importância econômica no Nordeste do Brasil, devido as grandes perdas na produção (SERRA, SILVA, 2004; MILANESI et al., 2009).

O gênero *Colletotrichum* apresenta uma ampla distribuição geográfica, em ambientes quentes e úmidos dos trópicos, causando danos em diversas culturas (SOARES, LOURENÇO. AMORIM, 2008). Os sintomas de antracnose em anonáceas são caracterizados, nas folhas, por manchas de coloração pardo-escura ou preta, com o centro mais claro, de contorno irregular, distribuídas por todo o limbo foliar. As folhas ficam deformadas e, em ataques mais severos, ocorre desfolhamento (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 2014).

A temperatura exerce grande influência no desenvolvimento dos fungos do gênero *Colletotrichum*, tanto no crescimento micelial pelo diâmetro das lesões desenvolvidas sobre o hospedeiro quanto na esporulação e germinação de conídios e formação de apressórios que é favorecido por temperaturas de 25°C e um período de 12 a 18 horas de umidade (POLTRONIERI, 2012; TAVARES, SOUZA, 2005; LOPEZ, 2005). Estudos dos efeitos do ambiente no desenvolvimento do patógeno muitas vezes podem auxiliar na elaboração de estratégias de manejo de doenças. A temperatura e umidade na superfície da planta são fatores que afetam o progresso da doença em plantas (SILVEIRA et al., 2001) e são capazes de funcionar como reguladores da velocidade com que se desenvolvem as epidemias (POLTRONIERI, 2012).

A busca de tecnologias torna-se necessário para o aumento da produção agrícola, com o objetivo de combater as doenças, e o uso de produtos químicos é a tecnologia

mais utilizada até o momento. No entanto, alguns fungicidas atuam controlando ampla gama de doenças fúngicas e são denominados de fungicidas com modo de ação não específico. Por outro lado, outros produtos apresentam espectro limitado de atividade contra um ou dois grupos específicos de fitopatógenos e são conhecidos como fungicidas com modo de ação específico. A especificidade dos fungicidas, principalmente dos sistêmicos, faz com que haja alto risco de resistência adquirida pelo patógeno (RODRIGUES et al., 2007; ZAMBOLIM et al., 2007).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a influência da temperatura na intensidade da doença induzida pelas espécies de *Colletotrichum*, o efeito de fungicidas e do ácido salicidroxâmico sobre o crescimento micelial destas espécies.

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Isolados fúngicos

Para todos os experimentos foram utilizados 26 isolados de cinco espécies de *Colletotrichum* (*C. theobromicola*, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. tropicale* e *C. karstii*) obtidos de sintomas de antracnose em folhas de pinheira e gravioleira (Tabela 6).

Os isolados foram identificados por inferência Bayseana baseados nas análises multilocus da região do espaço interno transcrito (ITS) e nas sequencias parciais dos genes gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), chitin synthase (CHS),  $\beta$ -tubulina (TUB2).

Tabela 6 - Isolados das cinco espécies de *Colletotrichum* obtidos de folha de pinheira (var. Crioula) e gravioleira (var. Morada), provenientes de plantios nos municípios de Alagoas.

| Isolados | Espécie                             | Município           |
|----------|-------------------------------------|---------------------|
| G1A      | <i>Colletotrichum theobromicola</i> | Arapiraca           |
| G8A      | <i>C. theobromicola</i>             | Arapiraca           |
| G1D      | <i>C. theobromicola</i>             | Delmiro Gouveia     |
| G8G      | <i>C. theobromicola</i>             | Maragogi            |
| G10G     | <i>C. theobromicola</i>             | Maragogi            |
| P19E     | <i>C. theobromicola</i>             | Estrela de Alagoas  |
| P22P     | <i>C. theobromicola</i>             | Palmeira dos Índios |
| P27I     | <i>C. theobromicola</i>             | Igaci               |
| P46bI    | <i>C. theobromicola</i>             | Igaci               |
| P42E     | <i>Colletotrichum fructicola</i>    | Estrela de Alagoas  |
| P7E      | <i>C. fructicola</i>                | Estrela de Alagoas  |
| P16bP    | <i>C. fructicola</i>                | Palmeira dos Índios |
| P2aP     | <i>C. fructicola</i>                | Palmeira dos Índios |
| G2G      | <i>C. fructicola</i>                | Maragogi            |
| G11aG    | <i>C. fructicola</i>                | Maragogi            |
| G20G     | <i>C. fructicola</i>                | Maragogi            |
| G1bM     | <i>Colletotrichum tropicale</i>     | Maceió              |
| G5aM     | <i>C. tropicale</i>                 | Maceió              |
| P7M      | <i>Colletotrichum siamense</i>      | Maceió              |
| P27E     | <i>C. siamense</i>                  | Estrela de Alagoas  |
| G25D     | <i>C. siamense</i>                  | Delmiro Gouveia     |
| G24D     | <i>Colletotrichum karstii</i>       | Delmiro Gouveia     |
| P1P      | <i>C. karstii</i>                   | Palmeira dos Índios |
| P5bM     | <i>C. karstii</i>                   | Maceió              |
| P26E     | <i>C. karstii</i>                   | Estrela de Alagoas  |
| P40I     | <i>C. karstii</i>                   | Igaci               |

Fonte: Costa, JFO, 2014

#### 4.2.2 Influência de diferentes temperaturas na intensidade da antracnose induzida por espécies de *Colletotrichum*

A avaliação da influência da temperatura na intensidade da antracnose induzida pelas espécies de *Colletotrichum* utilizadas neste teste foram obtidas de plantas de pinheira (var. Crioula) e gravioleira (var. Morada) assintomáticas.

As folhas foram lavadas, desinfetadas, inoculados e acondicionados em caixas plásticas (gerbox) contendo papel filtro umedecido com 5 mL de água destilada autoclavada. Para evitar contato com a superfície úmida, foram utilizados placas de Petri estéreis e os pecíolos envoltos por um chumaço de algodão embebido em água destilada autoclavada para manter o vigor da folha e favorecer a germinação das estruturas de reprodução do patógeno. Foi aplicado o método da folha destacada, onde discos de BDA (5mm) retirados das bordas de cultura monospórica com sete dias de crescimento, contendo estruturas do patógeno foram depositados equidistantes um dos outros sobre a superfície das folhas saudáveis. Cada isolado foi inoculado separadamente nas folhas com ferimentos provenientes dos seus respectivos hospedeiros. Nas testemunhas foram utilizados apenas disco de BDA sem o patógeno.

O experimento foi mantido em estufa incubadora BOD com temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C  $\pm$  1°C no escuro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos, em arranjo fatorial triplo (2x5x6), representados por duas espécies hospedeiras, cinco espécies de *Colletotrichum* e seis temperaturas, sendo cada repetição representada por uma folha. A virulência dos isolados foram avaliados aos dez dias após a inoculação, pela medição do diâmetro da lesão (cm) em duas direções perpendiculares.

#### 4.2.3 Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum*

A sensibilidade das cinco espécies de *Colletotrichum* a fungicidas foi determinada através das seguintes formulações comerciais: tiofanato metílico (Cercobin 700 WP, 700 g Kg<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i.a), Iharabras, São Paulo, SP, Brasil), difenoconazole (Score EC, 250 g l<sup>-1</sup> i.a., Syngenta, São Paulo, SP, Brasil) e azoxistrobina (Amistar 500 WG, 500 g kg<sup>-1</sup> i.a. Syngenta, São Paulo, SP, Brasil). Os fungicidas foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados ao meio de cultura de batata dextrose ágar (BDA) fundente (45°C), para alcançar as concentrações

de 0.5 µg de i.a. ml<sup>-1</sup>, 1 µg de i.a. ml<sup>-1</sup> e 10 µg de i.a. ml<sup>-1</sup>. Em todas as concentrações, incluindo a testemunha, a concentração final do DMSO no meio de cultura foi de 0.1% (v/v). Discos de micélio (5 mm diâmetro) de cada isolado foram removidos da margem de colônia com 7 dias de crescimento em meio BDA e depositados em meio BDA sintético suplementado com os fungicidas. Para testemunhas foi utilizado placas de Petri contendo meio de cultura BDA sintético suplementado com DMSO onde foram depositados discos do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 45 tratamentos em arranjo fatorial triplo, com cinco placas (repetições) por combinação 5 espécies de *Colletotrichum* x 3 fungicidas x 3 concentrações. Após sete dias de incubação a 25°C no escuro, o diâmetro médio de cada colônia foi mensurado em duas direções perpendiculares e obtido o diâmetro médio da colônia.

#### 4.2.4 Teste de Sensibilidade ao Ácido Salicilhidroxâmico (SHAM)

O teste de sensibilidade in vitro de espécies de *Colletotrichum* a azoxistrobina (Amistar 500 WG, 500 g kg<sup>-1</sup> i.a. Syngenta, São Paulo, SP, Brasil) com e sem a presença do ácido salicilhidroxâmico (SHAM), produto utilizado junto ao fungicida como um inibidor da respiração alternativa foi avaliado através do diâmetro médio de cada colônia obtidos em duas direções perpendiculares. O fungicida foi dissolvido em DMSO para alcançar a concentração de 10 µg de i.a. ml<sup>-1</sup> e o SHAM foi dissolvido em metanol para atingir uma concentração final de 100µg i.a. ml<sup>-1</sup>, ambos foram adicionado ao meio BDA fundente (45°C). Em todas as concentrações, incluindo a testemunha, a concentração final do DMSO e do metanol no meio de cultura foi de 0.1% (v/v).

Discos de micélio (5 mm diâmetro) de cada isolado foram removidos da margem de colônia com 7 dias de crescimento em meio BDA e depositados em meio BDA sintético suplementado com o fungicida e o SHAM. Para as testemunhas foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA sintético suplementado com DMSO onde foram depositados discos do patógeno. O delineamento foi inteiramente casualizado com 15 tratamentos representados por cinco espécies de *Colletotrichum*, uma concentração de fungicida e uma concentração de fungicida + SHAM. Após sete dias de incubação a 25°C no escuro, o diâmetro médio de cada colônia foi mensurado em duas direções perpendiculares e obtido o diâmetro médio da colônia.

#### 4.2.5 Análise dos dados

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).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Influência de diferentes temperaturas na intensidade da antracnose induzida por espécies de *Colletotrichum*

Os isolados de *Colletotrichum* inoculados em folhas de seus respectivos hospedeiros apresentaram resultados significativos ao nível de 5% de probabilidade (Figura 12), induzindo a formação de lesões em todas as temperaturas avaliadas, confirmando que as espécies *C. theobromicola*, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. karstii* e *C. tropicale* causam sintomas típicas de antracnose nessas culturas.

O maior diâmetro da lesão foi observado na temperatura de 25°C para todas as espécies de *Colletotrichum*, sendo essas reduzidas a medida que aumentava ou diminuía a temperatura. *C. tropicale* e *C. siamense* foram as espécies que apresentaram as maiores lesões 2.60 e 2.45cm, respectivamente, mostrando ser patógenos bastante agressivos nas condições testadas. No entanto, a temperatura que menos favoreceu o crescimento do patógeno foi a 10°C. A espécie *C. theobromicola* foi a espécie menos agressiva em todas as temperaturas avaliadas.

Observações feitas por Maia et al. (2011), em espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose em manga (*Mangifera indica* L.) observaram melhor taxa de crescimento micelial na faixa de temperatura variando de 20°C a 25°C. Moraes (2008), avaliando a incidência de *C. gloeosporioides* e o diâmetro das lesões em frutos de goiaba (*Psidium guajava* L.) em ponto de colheita, observaram que o diâmetro máximo da lesão na temperatura de 25°C e a maior incidência da doença (100%) ocorreu aos 10 dias após a inoculação, a 30°C.

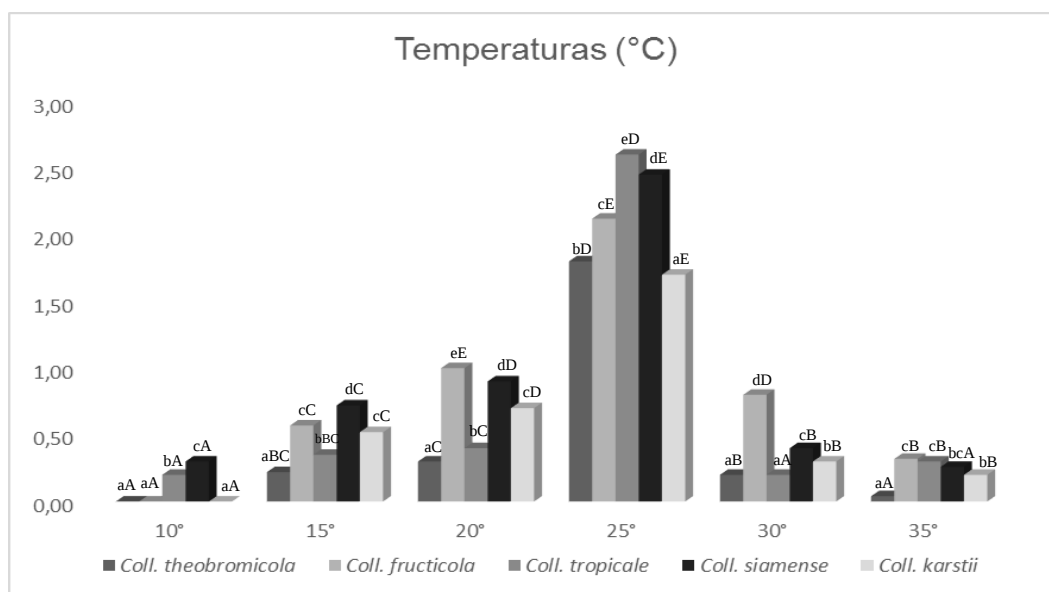
Lima et al., 2014, observaram que a maior virulência das espécies de *Colletotrichum* em frutos de manga foi verificada nas temperaturas de 25 e 30°C, os autores ainda afirmam que a diferença constatada entre as espécies de *Colletotrichum* em manga quanto a temperatura ótima para virulência pode estar associada a requerimentos específicos para germinação de esporos e formação de apressórios.

O crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolados de frutos de atemóia obteve o melhor crescimento entre as faixas de temperatura de 20 a 25°C (TAKAHASHI et al., 2009). A temperatura é uma das principais variáveis climáticas responsáveis pela infecção e colonização de espécies do gênero *Colletotrichum* e

determina a rapidez e extensão da infecção no hospedeiro (LEITE, AMORIM, 2002; ARAÚJO et. al., 2006).

Vários autores relatam que espécies de *Colletotrichum* causam severas infecções em diferentes hospedeiros sob temperaturas de 24 a 31°C (WILSON, MADDEN, ELLIS, 1990; SUTTON, 1992; JONHSON, MILIESZKY, 1993; VINNERE, 2004). Os fungos exigem uma faixa de temperatura ótima para esporular, sendo reduzida sob baixas temperaturas e à medida que a temperatura se eleva aumenta a esporulação, até o ponto ideal para causar a infecção (POLTRONIERI, 2012; COSTA; CARVALHO, 2011). A principal característica que indica a viabilidade dos esporos é a germinação e para que ela ocorra, é preciso de uma temperatura adequada e água em quantidade suficiente (COSTA; CARVALHO, 2011).

Figura 12 - Influência da temperatura (tamanho da lesão) em folhas de anonáceas (*A. muricata* e *A. squamosa*) de cinco espécies de *Colletotrichum* associados a antracnose no estado de Alagoas.



Fonte: Costa, JFO, 2014

#### 4.3.2 Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum*

Os valores da inibição do crescimento micelial in vitro das espécies de *Colletotrichum* aos três fungicidas utilizados, em diferentes concentrações estão mensurados na figura 13.

Observa-se que os fungicidas apresentaram diferença estatística em todas as concentrações para todas as espécies, indicando uma interação semelhante das espécies de *Colletotrichum* com os fungicidas utilizados. As espécies de *Colletotrichum* estudadas apresentaram certa resistência ao fungicida azoxistrobina, sendo a espécie *C. fructicola* a que apresentou a maior resistência e *C. karstii* maior suscetibilidade, mesmo na maior concentração de 10µg do princípio ativo. O tiofanato metílico e o difenoconazole tiveram desempenho semelhante com algumas diferenças na efetividade das concentrações e em algumas das espécies testadas. A concentração mais efetiva em todas as espécies de *Colletotrichum* foi com 10µg para todos os princípios ativos. No entanto, nenhum fungicida nas doses testadas mostra-se altamente eficiente na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum*.

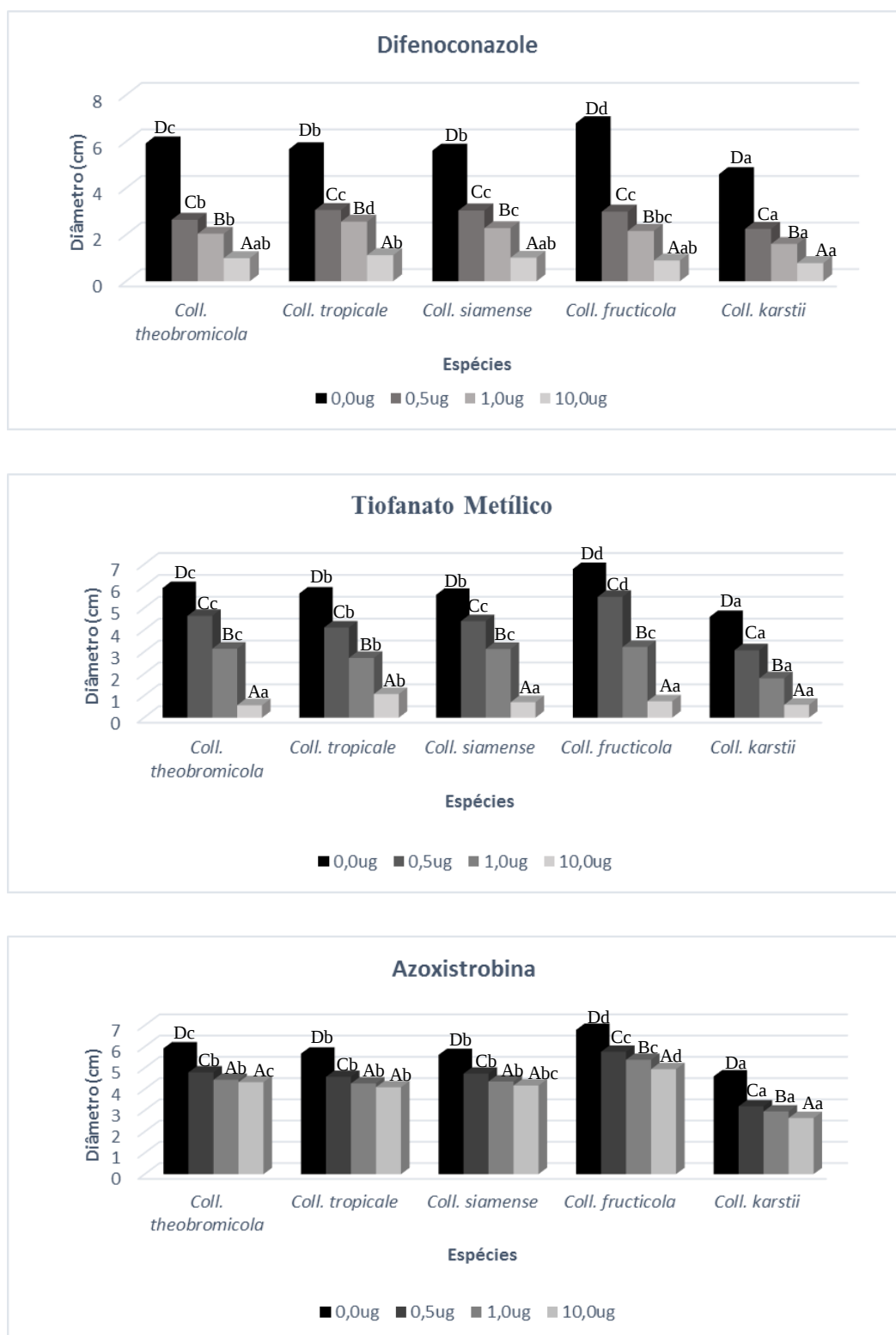
O fungicida tiofanato metílico reduziu o crescimento micelial da espécie *C. acutatum* em concentrações de 50 e 100ppm (KOSOSKI et al., 2001). O difenoconazole foi considerado eficiente no controle de *C. gloeosporioides* proveniente de sintomas de antracnose na goiabeira em testes in vitro (FISCHER et al., 2012).

A ação do fungicida azoxistrobina no controle in vitro de *C. acutatum* e *Glomerella psidii* provenientes de frutos de goiaba foi classificada como pouco eficiente por Fircher et al., 2012 e se mostrou eficiente em condições de campo no controle da antracnose em frutos de manga (SALES JÚNIOR et al., 2004). Lima et al., 2013 observou que dentre os fungicidas avaliados, azoxistrobina na concentração de 10µg i.a. ml<sup>-1</sup>, proporcionou as menores reduções do crescimento micelial em seis espécies de *Colletotrichum* provenientes de frutos de manga, sendo que a espécie *C. tropicale* foi a que obteve maior crescimento, corroborando com os dados desse trabalho.

Sensibilidade in vitro de fungos fitopatogênicos foram avaliados por Ishii et al., 2007, onde observaram que dois isolados da espécie *Mycovellosiella natrassii* provenientes de berinjela eram altamente resistentes ao fungicida azoxistrobina mesmo quando a concentração era de 100µg i.a.ml<sup>-1</sup>. No entanto, as espécies *Corynespora cassicola* (pepino), *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de isolados de morango e videira, apresentaram baixa sensibilidade ao mesmo fungicida. Contudo, essa sensibilidade relatada na literatura por alguns autores está relacionada apenas com algumas espécies fúngicas. É o caso dos patógenos estudados nesse trabalho, onde apresentaram uma pequena resistência a azoxistrobina in vitro. Esse fato deve estar relacionado a rota alternativa adquirida por algumas espécies de fungos.

Diferenças associadas ao hospedeiro de origem e na intensidade de exposição aos fungicidas podem gerar uma resistência diferenciada entre as espécies (TOZZE JÚNIOR, 2006). O comportamento diferenciado entre as espécies provavelmente representa características próprias das mesmas e que pode ser útil na distinção de espécies (FISCHER et al., 2012).

Figura 13 - Sensibilidade de cinco espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose de anonáceas aos fungicidas difenoconazole, tiofanato metílico, e azoxistrobina nas concentrações 10, 1 e 0.5  $\mu\text{g}$  de i.a.ml<sup>-1</sup> aos 7 dias de crescimento micelial (cm). As barras representam as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5%.



Fonte: Costa, JFO, 2014

#### 4.3.3 Teste de Sensibilidade ao Ácido Salicilhidroxâmico (SHAM)

As espécies de *Colletotrichum* na presença do fungicida azoxistrobina (10µg i.a.ml<sup>-1</sup>) acrescido do SHAM (100µg i.a.ml<sup>-1</sup>), apresentaram crescimento micelial reduzido quando comparado com a testemunha e o fungicida na mesma concentração sem a presença do SHAM. Não foi possível observar o controle total para os patógenos estudados. Contudo, *C. tropicale* foi a espécie que apresentou maior crescimento micelial e, as espécies que proporcionou as menores reduções foram *C. theobromicola*, *C. fructicola* e *C. karstii* (Figura 14).

A inibição do crescimento micelial utilizando apenas o SHAM não excedeu 30% no controle do crescimento micelial dos isolados de *C. graminicola* na dose de 10 µg ml<sup>-1</sup>. No entanto, apenas um dos isolados foi significativamente mais sensível à azoxistrobina quando o SHAM estava presente (AVILA-ADAME, OLAYA, KÖLLER, 2003). Alterações morfológicas não foram observadas na estrutura das células estudadas por Inoue et al., (2012), ou seja, nos componentes mitocondriais e membranas das organelas, em espécies tratadas com azoxistrobina associado ao SHAM por 4 dias. Observou-se mitocôndrias intactas, o que sugere que o tratamento com azoxistrobina associado ao SHAM não é suficiente para afetar a integridade mitocondrial.

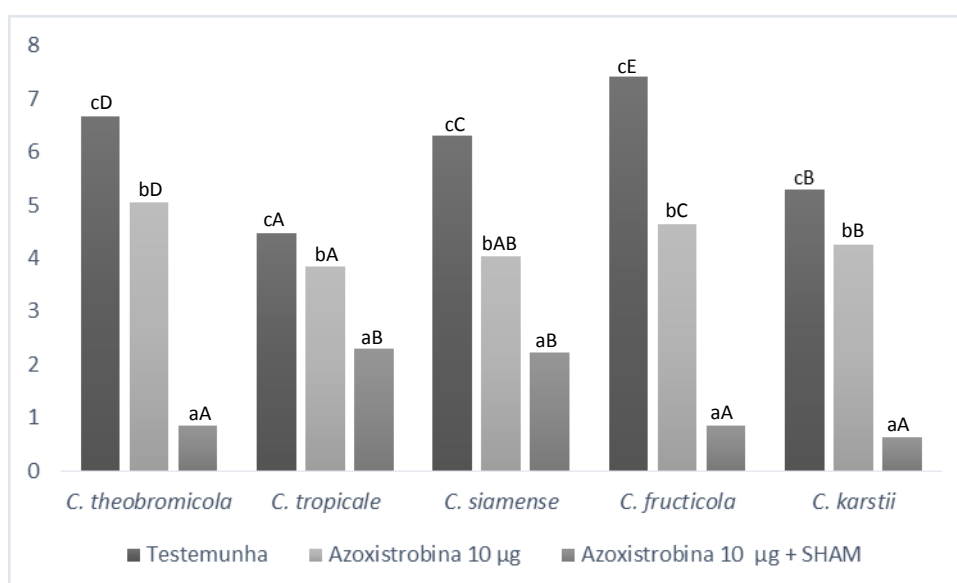
Mutações e outros mecanismos de resistência foram estudados por Fernández-Ortuño et al., (2008), observando a ocorrência de respiração alternativa in vitro onde forneceu suporte energético à célula fúngica, mas em condições de campo isso foi limitado devido ao baixo rendimento do processo e a grande quantidade de energia que é demandada, sendo a respiração alternativa insuficiente para a célula fúngica.

Resultados dos testes de sensibilidade in vitro com isolados de *Cercospora Zeae-maydis* sugere que esse patógeno pode usar a via de respiração alternativa para superar a inibição da germinação de esporos causado pelo fungicida da QoI, sendo importante incluir o SHAM nos ensaios in vitro (BRADLEY, PEDERSEN, 2011).

A sensibilidade de fungos aos fungicidas pode ser evitada de um modo geral, através de estratégias de manejo de doenças, tais como: usar sempre a dose do produto recomendada pelo fabricante; aplicar o produto em mistura com um ou mais fungicidas de modo de ação diferente e usar apenas quando for estritamente necessário aplicar somente produtos com diversidade química, ou seja, uso de

diferentes tipos de fungicidas com modo de ação diferente para controle de doenças e adotar o uso de técnicas integradas de manejo de doenças. A estratégia do manejo integrado de doenças é a mais recomendada como estratégia anti-resistência de fungos aos fungicidas (PARREIRA, NEVES, ZAMBOLIM, 2009).

Figura 14 - Sensibilidade de cinco espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose de anonáceas ao fungicida azoxistrobina na concentração 10µg de i.a.ml<sup>-1</sup> na presença e ausência de SHAM (100µg de i.a.ml<sup>-1</sup>), aos 7 dias de crescimento micelial (cm). As barras representam as médias e os valores seguidos pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na linha e valores seguidos pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na coluna pelo teste de Tukey ao nível de 5%.



Fonte: Costa, JFO, 2014

Para uma melhor compreensão do efeito da temperatura sobre a intensidade da doença, o efeito dos fungicidas difenoconazole, tiofanato metílico e azoxistrobina, bem como o efeito do ácidosalicilhidroxâmico, há necessidade de estudos complementares sobre os requerimentos específicos de temperatura e umidade, para germinação de esporos e apressórios, bem como a melhor concentração do princípio ativo para um controle das espécies de *Colletotrichum* prevalentes nos pomares de anonáceas em Alagoas.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Todas as espécies de *Colletotrichum* testadas apresentaram maiores lesões à temperatura de 25°C.

Os fungicidas difenoconazole e tiofanato metílico apresentaram as maiores taxas de inibição do crescimento micelial em todas as espécies de *Colletotrichum*.

O fungicida azoxistrobina inibiu o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* na presença do ácido salicíhidroxâmico (SHAM).

## REFERÊNCIAS

AVILA-ADAME, C.; OLAYA, G.; KÖLLER, W. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. **Plant Disease**, v.87, n.12, p.1426-1432, 2003.

ALVES, S.B.; NOGUEIRA, N.L. **Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Londrina. Resumos. p.170. 1984.

ARAÚJO, D. V. et al. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia brasileira**, vol.31, n.1, p. 35-40. 2006.

BEDENDO, I. P., AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. Piracicaba, v. 01, Cap. 7, p. 133-147, 2011.

BRADLEY, C.A., PEDERSEN, D.K. Baseline sensitivity of *Cercospora zea-maydis* to quinone outside inhibitor fungicides. **Plant Dis**, vol.95, p.189-194, 2011.

CHATROU, L.W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **London**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.

COLE, G.T., HOCH, H.C. The fungal spore and disease initiation in plants and animals, New York, **Plenum Press**, p.72. 1991.

COSTA e CARVALHO, R.R. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. **Scientia Plena**. v. 7, n. 9. 2011.

DONADIO, L.T. **Situação atual e perspectiva das anonáceas.** In: JOSÉ, A.R. SOUZA, I. V. B., MORAIS, O. M., REBOUÇAS, T. N. H. Anonáceas: mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). 1ª Ed. Vitória da Conquista, Bahia: DFZ/UESB, p. 7-19. 1997.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v.11, n.1, p.1-10, 2008.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5. 0. In: Reunião Anual Da Região Brasileira Da Sociedade Internacional De Biometria, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. p.255-258. 2000.

FISCHER, I.H. et al. Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 1, p. 2753-2766, 2012

INOUE, K. et al. Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiol Lett.** p. 83-90, 2012.

ISHII, H. et al. Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. **Phytopathology**. V. 97, p. 1458-1466, 2007.

JOHNSON, D. A., MILIESZKY, E.R. Effect of wounding and wetting duration on infection of potato foliage by *Colletotrichum cocodes*. **Plant Disease**, v.77, p.13-17, 1993.

JUNQUEIRA, N.T.V. et al. Controle das doenças da gravioleira. In: ZAMBOLIM L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H.(Eds.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. v.1. Viçosa. 2002. p.405-445.

JUNQUEIRA, N. T. V., JUNQUEIRA, K. P. **Principais doenças de anonáceas no Brasil: Descrição e Controle**. v. 36, edição especial, p. 55-64, Janeiro 2014.

KOSOSKI, R.M.et al. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26, p. 662-666, 2001.

LEAL, F. Sugar apple. In: NAGY, S., SHAW, P. E., WARDOWSKI, W.F. **Fruits of tropical and subtropical origin. Composition, properties and uses**. Lake Alfred: FSS. p.149-158. 1990.

LEITE, R.M.V.B.C., AMORIM, L. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de alternaria em girassol. **Summa Phytopathologica**. Botucatu. v.28, p.14-19, 2002.

LE MOS, E.E.P. **Panorama de las anonas cultivadas em Brasil; saramuyo, guanábana y atemoya** (ISBN 97866077510919). In: Alma Rosa Gonzalez Esquinca; Lorena Mercedes Luna-Cazáres; Javier Gutiérrez-limenez; Maria Adelina Schile-

Guzmán; Dolores Guadalupe Vidal-López (org.). Anonáceas, plantas antigas estudios recientes. 1 Ed. Tuxtla Gutiérrez: Unicach, 2011.

LIMA, N.B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**. v. 61, p.75-88, 2013.

LIMA, N.B. et al. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **Eur J Plant Pathol**. v. 140, 2014.

LOPEZ, A. M. Q. **Doenças das anonáceas e do urucuzeiro**. p. 73-77. In: KIATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (eds.), Manual de Fitopatologia. v.2, Doenças das plantas cultivadas, 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 663p., 2005.

MAIA, F. G. M. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. Isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 27, n. 2, p. 205-210, Mar./Abr. 2011.

MILANESI, P. M. Ação fungitóxica de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.16, n.1, p.01-13, 2009.

MORAES, S. R. G. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Catálogo USP, 2008.

RODRIGUES, M.B.C. et al. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.3, p.323-327, 2007.

PARREIRA, F.D., NEVES, W.S., ZAMBOLIM, L., Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 3, n. 2, p. 24, 2009.

POLTRONIERI, T.P.S. **Patogenicidade, efeito da temperatura no desenvolvimento e controle de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causadores da antracnose da Juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia Aplicada). Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2012.

SALES JÚNIOR, R. et al. Utilização de azoxistrobina no controle da antracnose da mangueira. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, p.193-196. 2004.

SILVEIRA, N.S.S. et al. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inoculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. v.26, p.33-38. 2001.

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.

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.

SOARES, A.R., LOURENÇO, S.A., AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e período de molhamento. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.4, p.265-272, 2008.

SOUSA GOMEZ, D.R. **Caracterização de isolados de *Beauveria* spp. e determinação das exigências térmicas e hídricas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.** Piracicaba: 1990. 98p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1990.

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

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

TOZZE JUNIOR, H. J., MELLO, B. A., MASSOLA-JUNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**. Botucatu.v.32, n.1, p. 77-79. 2006.

VINNARE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. Comprehensive summaries of uppsala dissertations from the faculty of Science and technology, **Uppsala**. v. 917. 72p. 2004.

WILSON, L.L., MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. Influence temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruits by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p.111-116. 1990.

ZAMBOLIM, L., VENÂNCIO, S.V., OLIVEIRA, S.H.F. Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas. Visconde do Rio Branco: **Suprema Gráfica e Editora**.168p. 2007.

## **ANEXOS**

O trabalho foi escrito de acordo com o padrão ufal de normatização.

Padrão UFAL de normalização / organizadores: Enildo Marinho Guedes ... [et al.]. – Maceió :EDUFAL, 2012. 55 p. Bibliografia. p. 49 Anexos: p. 50-55. ISBN: 1. Trabalhos científicos - Normalização. 2. Metodologia científica. 3. Trabalhos acadêmicos.

Procedência, hospedeiro e georreferência dos isolados de *Colletotrichum* sp. de anonáceas utilizados no estudo.

| Isolados | Procedência     | Hospedeiro | Georreferência             |
|----------|-----------------|------------|----------------------------|
| G1A      | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G4A      | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G5A      | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G7A      | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G8A      | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G10A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G11A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G13A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G15A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G14A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G16A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G17A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G24A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G25A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G31cA    | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G33A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G39A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G31A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G44A     | Arapiraca       | Graviola   | S 9°47'54.6" W 36°36'0.5"  |
| G1D      | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G4D      | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G6D      | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G5aD     | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G5cD     | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G6D      | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G24D     | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G25D     | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G28D     | Delmiro Gouveia | Graviola   | -                          |
| G1G      | Maragogi        | Graviola   | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G2G      | Maragogi        | Graviola   | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G3G      | Maragogi        | Graviola   | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G5G      | Maragogi        | Graviola   | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G8G      | Maragogi        | Graviola   | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G9aG     | Maragogi        | Graviola   | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |

|       |                     |          |                            |
|-------|---------------------|----------|----------------------------|
| G9bG  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G10G  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G11aG | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G11cG | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G14bG | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G22G  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G18G  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G20G  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G30G  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G31G  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| G37G  | Maragogi            | Graviola | S 8°54'03.2" W 35°18'48.9" |
| P1P   | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P2aP  | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P2bP  | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P4P   | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P9bP  | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P15P  | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P16cP | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P16bP | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P22P  | Palmeira dos Índios | Pinha    | S 9°27'36.1" W 36°38'15.3" |
| P27I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P28I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P31I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P33aI | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P33cI | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P36I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P37I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P40I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P43I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P44I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P45I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P46bI | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P48I  | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P48bI | Igaci               | Pinha    | S 9°24'54.9" W 36°40'09.8" |
| P3E   | Estrela de Alagoas  | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P4E   | Estrela de Alagoas  | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P7E   | Estrela de Alagoas  | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |

|       |                    |          |                            |
|-------|--------------------|----------|----------------------------|
| P19E  | Estrela de Alagoas | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P21E  | Estrela de Alagoas | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P21cE | Estrela de Alagoas | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P26E  | Estrela de Alagoas | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P28E  | Estrela de Alagoas | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P42E  | Estrela de Alagoas | Pinha    | S 9°25'48.2" W 36°43'16.6" |
| P1M   | Maceió             | Pinha    | S 9°34'22.1" W 35°38'46.2" |
| P4M   | Maceió             | Pinha    | S 9°34'22.1" W 35°38'46.2" |
| P5bM  | Maceió             | Pinha    | S 9°34'22.1" W 35°38'46.2" |
| P5cM  | Maceió             | Pinha    | S 9°34'22.1" W 35°38'46.2" |
| P9M   | Maceió             | Pinha    | S 9°34'22.1" W 35°38'46.2" |
| P10cM | Maceió             | Pinha    | S 9°34'22.1" W 35°38'46.2" |
| G5bM  | Maceió             | graviola | S 9°34'22.1" W 35°38'46.2" |

---