



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



JULIANA FERREIRA DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Colletotrichum **AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO-FAVA NO**
ESTADO DE ALAGOAS

RIO LARGO - AL

2012

JULIANA FERREIRA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Colletotrichum AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO-FAVA NO
ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Iraíldes Pereira Assunção

Co-orientador: Dr. Jean Herllington Araújo Monteiro

RIO LARGO - AL

2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

L732c

Lima, Juliana Ferreira de.

Caracterização morfofocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* agente causal da antracnose do Feijão-Fava no estado de Alagoas / Juliana Ferreira de Lima. – 2013.

52 f. : il.

Orientadora: Iraíldes Pereira Assunção.

Co-orientador: Jean Herllington Araújo Monteiro.

Dissertação (Mestrado em Agronomia : Produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.

Bibliografia: f. 44-52.

1. *Phaseolus lunatus* L. 2. *Colletotrichum truncatum*. 3. DNA ribossomal.
4. Patogênicos – Caracterização genética. I. Título.

CDU: 632.4:633.35

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA FERREIRA DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO-FAVA NO ESTADO DE ALAGOAS

Dissertação defendida e aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção de Plantas, da Universidade Federal de Alagoas, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientadora:

.....
Prof. Dra. Iraíldes Pereira Assunção
(CECA/UFAL)

Examinadores:

.....
Dr. Jean Herllington Araújo Monteiro
(Bolsista PRODOC/CAPES)

.....
Prof. Dra. Maria de Fátima Silva Muniz
(CECA/UFAL)

.....
Prof. Dr. Júlio Alves Cardoso Filho
(CECA/UFAL)

Rio Largo, AL, 29 de Maio de 2012

Ao marido Frederico Monteiro Feijó e
minha filha Bianca Ferreira Feijó (8
meses de idade) pela força de todos os
dias e o amor.

OFEREÇO

À Deus e a família pela ajuda moral, em
especial aos meus pais Antônio Ferreira
de Lima e Diva Gomes de Lima.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas - UFAL pela oportunidade de me iniciar nas entrelinhas da vida acadêmica.

Ao Mestrado em Agronomia da UFAL que tanto me permitiu desafiar situações adversas e colher frutos saborosos pelos ensinamentos adquiridos.

Aos Professores Iraíldes Pereira Assunção, Gaus Silvestre de Andrade Lima e Jean Herllington Araújo Monteiro, pelas orientações, ensinamentos, amizade e dedicação ofertada durante a minha permanência no programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFAL.

Aos membros da banca avaliadora, doutores Jean Herllington Araújo Monteiro, Maria de Fátima Muniz e Júlio Alves Cardoso Filho pela importantíssima contribuição para melhoria deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa.

Ao meu irmão Manoel Ferreira de Lima (Jânio), pela contribuição financeira e amizade.

A minha irmã, Gelva de Lima Barbosa, por cuidar de minha filha nos momentos difíceis que auxiliaram no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos amigos do laboratório Frederico Monteiro (marido), Wellington, Antônio Duarte, Sarah, Jaqueline e Edilene, por compartilhar o ambiente de trabalho tornando-o prazeroso e pela amizade durante todo o período de desenvolvimento dos trabalhos.

Aos meus sobrinhos, Jailton Jr. e Jéssica Hellen pela amizade verdadeira.

RESUMO

Vinte culturas monospóricas de *Colletotrichum*, isolados de folhas de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), foram caracterizadas quanto à morfologia dos conídios e apressórios, coloração das colônias, presença de setas, crescimento das colônias, sensibilidades ao Maxim, PCR com *primers* táxon-específicos a *Colletotrichum* e análise de filogenética. Os vinte isolados foram identificados como *Colletotrichum truncatum* com base na morfologia dos conídios e apressórios, tendo a maioria dos isolados a forma dos conídios tipo falcado e apressórios globoso, clavado e/ou ovalado. Presenças de setas, cor da colônia, sensibilidade ao Maxim e velocidade de crescimento variaram conforme os isolados e sofreram influência do meio de cultura usado. Todos os isolados foram patogênicos ao feijão-fava pelo método da folha destacada. PCR com *primers* específico confirmou a identidade de 11 *C. truncatum*. A caracterização genética com primmer ITS 1 e ITS 4 foram eficientes na identificação molecular de 60% dos isolados de *C. truncatum*. Assim, estudos utilizando outros marcadores moleculares fazem-se necessários para uma análise mais aprofundada da variabilidade genética entre isolados dessa espécie de fungo.

Palavra-chave: *Phaseolus lunatus* L. *C. truncatum*. DNA ribossomal.

ABSTRACT

Twenty monoconidial cultures of *Colletotrichum* isolated from leaves of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.), were characterized morphology by conidial and appressoria, colony color, presence of setae, growth rate of colony, sensitivities to Maxim, PCR with taxon *Colletotrichum*-specific primers and phylogenetic analysis. Twenty isolates were identified as *Colletotrichum truncatum* based on morphology of conidia and appressoria, and most isolated way of conidia and appressoria globose type falcado, clavate and / or oval. Presence of setae, color of colony, sensitivities to Maxim, growth rate were variable among isolates and influenced by the culture medium. All isolates were pathogenic to lima bean and applied by the leaf highlighted method. PCR with specific primers confirmed the identity of 11 *C. truncatum*. Genetic characterization with Primer ITS 1 and ITS 4 were effective in molecular identification of 60% of the isolates of *C. truncatum*. Thus, studies using other molecular markers are needed to make further analysis of genetic variability among isolates of this species of fungus.

Keyword: *Phaseolus lunatus* L. *C. truncatum*. ribosomal DNA.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Produto comercial, ingrediente ativo, grupo químico, classe e modo de ação dos fungicidas utilizados nos testes de sensibilidade “in vitro” do fungo <i>Colletotrichum truncatum</i> , isolado do feijão-fava.....	29
Tabela 2	Isolado, local de origem, órgão de isolamento, ano de coleta e teste de patogenicidade dos 20 isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> provenientes do feijão-fava.....	31
Tabela 3	Comprimento e largura de conídios, apressórios e Setas de isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> do feijão-fava, quando cultivados em meio AvA a 25±1 °C e fotoperíodo de 12 horas, aos 7 dias de incubação.....	33
Tabela 4	Índice de crescimento micelial (ICM), grupo de coloração e topografia da colônia de isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> oriundos do feijão-fava.....	36
Tabela 5	Tamanho dos pares de bases e Identificação molecular dos isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i> causadores da antracnose no feijão-fava.....	39
Tabela 6	Efeito do fungicida Maxim na dose 5 µL/100mL em meio de BDA no crescimento micelial de <i>Colletotrichum truncatum</i> agente causal da antracnose do feijão-fava.....	43

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Municípios do estado de Alagoas produtores da fava utilizados no experimento para isolamento de <i>Colletotrichum truncatum</i>	24
Figura 2	Folha do feijão-fava com sintomas da antracnose causada por <i>Colletotrichum truncatum</i>	32
Figura 3	Seta (A), Conídios (B) e apressórios (C) de <i>Colletotrichum truncatum</i> , agente causal da antracnose do feijão-fava.....	34
Figura 4	Dados referentes a caracterização cultural e os grupos de características culturais (GCC) dos isolados de <i>Colletotrichum truncatum</i>	37
Figura 5	Árvore filogenética mostrando a relação entre isolados de <i>C. truncatum</i> e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1 e ITS4), utilizando o método de neighbor-joining. Uma análise de bootstrap foi feita com 1000 repetições..	40
Figura 6	Sensibilidade a fungicida Maxim, Vitavax e Folicur realizado com os isolados ICT 07 <i>Colletotrichum truncatum</i> agente causal da antracnose do feijão-fava.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Importância da cultura do feijão-fava	13
2.2 Problemas fitossanitários da cultura do feijão-fava	14
2.3 Antracnose	14
2.3.1 <i>Colletotrichum</i> spp.	15
2.4 Variabilidades fenotípicas e genotípicas de espécies de <i>Colletotrichum</i>	167
2.4.1 Caracterização morfológica e Cultural	17
2.4.2 Caracterização molecular	19
2.4.3 Sensibilidade a fungicidas	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados	23
3.2 Teste de patogenicidade	24
3.3 Caracterização cultural	25
3.3.1 Avaliação	25
3.3.2 Análise dos dados	25
3.4 Caracterização morfológica	26
3.4.1 Avaliação	26
3.4.2 Análise dos dados	27
3.5 Identificação molecular	27
3.5.1 Extração de DNA	27
3.5.2 Reação de PCR	28
3.5.3 Análise Filogenética	28
3.6 Sensibilidade a fungicidas	28
3.6.1 1º etapa	29
3.6.1.1 Avaliação	29
3.6.2 2º Etapa	30
3.6.3 Avaliação	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Teste de patogenicidade	30
4.2 Caracterização morfológica e cultural	32

4.3 Identificação molecular.....	37
4.5 Sensibilidade a fungicida	41
5 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O feijão-fava, *Phaseolus lunatus* L., pertencente à Família Fabaceae, está entre uma das quatro espécies pertencentes ao gênero *Phaseolus* explorada comercialmente, sendo a segunda espécie mais plantada. Essa leguminosa se destaca na alimentação humana pela sua utilização como fonte de proteínas para grande parte da população mundial, e em especial nos países onde o consumo de proteína para o animal é limitado (OLIVEIRA et al., 2004; VIEIRA, 1992a).

No Brasil é conhecido vulgarmente como fava, feijão-fava ou feijão-lima. É cultivada em quase todo o território nacional com grande importância econômica nos estados do nordeste por pequenos produtores, onde é cultivada em consórcio com o milho, mandioca entre outras culturas (VIEIRA, 1992b).

O consumo do feijão-fava é inferior ao consumo do feijão comum, acredita-se que as principais razões para essa limitação seja a tradição do consumo do feijão comum, a palatabilidade e o tempo de cocção mais longo. Embora sua utilização tenha pouca relevância, o feijão-fava tem uma capacidade de adaptação mais ampla que o feijão-comum (*P. vulgaris*). As principais razões para o cultivo limitado e a baixa produtividade da cultura são atribuídas ao fato da produção ser oriunda apenas de pequenos produtores e a falta de recursos tecnológicos (LYMMAN, 1983; SANTOS et al., 2002; AZEVEDO et al., 2003)

A cultura do feijão-fava pode ser afetada por várias doenças dentre essas, destacam-se as causadas por fungos e vírus. O rendimento da cultura pode ser severamente afetado por essas doenças. Entre estas, destacam-se o mosaíco dourado do feijoeiro (RAMOS SOBRINHO, 2010) e a antracnose (CARVALHO et al., 2010).

De acordo com Carvalho et al., (2010) a antracnose do feijão-fava tem sido frequentemente observada em campos de produção na região Nordeste do Brasil. A doença afeta as folhas, ramos e vagens, ocasionando perdas significativas. Nas folhas a antracnose afeta as nervuras causando escurecimento com manchas deprimidas e formato elíptico, seguidas de

necrose na superfície, tanto na face adaxial quanto na abaxial (PAULA JÚNIOR et al., 1995).

Entre as medidas preventivas para o controle da doença tem-se recomendado o uso de práticas culturais. Outra opção é o uso de produtos químicos, que muitas vezes torna-se inviável para o pequeno produtor devido ao aumento expressivo dos custos de produção, levando o produtor a procurar alternativas como a utilização de genótipos resistentes.

Nesse sentido, objetivou-se neste trabalho, determinar características morfológicas, culturais, genéticas e sensibilidade a fungicida do agente causal da antracnose do feijão-fava no estado de Alagoas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura do feijão-fava

O feijão-fava (*P.lunatus*) também conhecido como feijão-lima é uma Fabaceae, pertencente ao gênero *Phaseolus*. É cultivada e comercializada na América do Norte, América do Sul, Europa, leste e oeste da África e sudeste da Ásia (BAUDOIN, 1988). Contudo tem maior adaptação a regiões de climas quentes e úmidos (LYMMAN,1983).

Nos Estados Unidos a fava é produzida no sul do país, seu consumo se dá no estado de maturação ou verde, na forma de conservas (grãos enlatados ou congelados e empacotados), muito apreciada pela população, superando o consumo de grãos secos (VIEIRA, 1992a). No Brasil, os grãos são predominantemente consumidos ainda em estado verde e após cozimento. O feijão-fava possui grande importância na alimentação humana e animal, devido ao seu valor nutricional, com teor de proteína aproximado de 26,70%. A planta pode ser utilizada também como adubo verde e como cultura de cobertura na proteção do solo contra a erosão causada pelas chuvas (VIEIRA, 1992b).

No Brasil, em 2010, foram produzidas 7300 t. de grãos secos do feijão-fava, em uma área plantada de 29.800 ha, onde só o nordeste representa 95,99% da área plantada. O maior produtor é o Estado da Paraíba com produção de 2.800 t. Alagoas não representa muito na composição produtiva da região, ocupando a última posição no ranking, com produção de 118 t (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA -

IBGE, 2010). No entanto a importância da cultura para subsistência das famílias rurais do Estado pode ser facilmente verificada em visitas às pequenas propriedades.

2.2 Problemas fitossanitários da cultura do feijão-fava

Na cultura do feijão-fava são relatadas inúmeras doenças, dentre elas, as doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e fitovírus (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; CIAT, 1980; RACHIE et al., 1980).

No Brasil existem poucos relatos relacionados às doenças do feijão-fava, devido à falta de pesquisas realizadas por de órgãos responsáveis, com isso a exploração comercial da cultura torna-se inviável, sendo cultivada apenas por pequenos produtores como agricultura de subsistência (CARVALHO et al., 2010).

Dentre as doenças que atacam o feijão-fava a antracnose, é a mais comum, sendo verificada sua ocorrência em todas as áreas de cultivo. Quando o ataque ocorre nas folhas (nervuras, pecíolos), ramos, pedúnculo e vagens são ocasionados redução da produção e depreciação do valor comercial dos grãos (EMBRAPA, 2003).

2.3 Antracnose

As antracnoses, causadas por *Colletotrichum* spp. são doenças frequentes que ocorrem em diferentes espécies de plantas cultivadas (LOPEZ, 2001) e são considerados fitopatógenos de grande importância pois, causam severas perdas em muitas culturas tropicais, subtropicais e temperadas. De modo geral, os cereais, as fruteiras e as hortaliças são gravemente afetadas por essa doença, culminando com consideráveis perdas de produção. Os danos de pós-colheita em frutos é o que causa perdas econômicas mais significativas aos produtores (FREEMAN, KATAN, SHABI 1998; FREEMAN et al., 2000).

De acordo com Carvalho et al., 2010, a antracnose na cultura do feijão-fava é causada pelo fungo *C. truncatum*. Devido às condições climáticas

favoráveis da região Nordeste que apresenta o maior índice da doença. Pode ser vista com frequência nos plantios dos pequenos produtores e até mesmo nos experimentos de pesquisa, o que provoca grandes problemas, causando danos à cultura, com perda da produção quando o ataque acontece principalmente no início do desenvolvimento da planta (CARVALHO et al., 2010).

Os sintomas são observados em toda parte aérea da planta, ao longo das nervuras, na fase inferior das folhas e em brotos jovens. Nas sementes contaminadas as lesões são pequenas de coloração marrom-escuras e deprimidas, de tamanhos variáveis e até mesmo de cor negra quando são observadas nos cotilédones. No hipocótilo apresenta lesões alongadas, superficiais ou deprimidas, causando o estrangulamento e a morte das plântulas. No caule e no pecíolo as lesões têm formato elíptico, são deprimidas e escuras. Os sintomas mais característicos desta doença são as lesões necróticas, de coloração marrom-escura nas nervuras da face abaxial das folhas, com escurecimento, que causa necrose nas áreas adjacentes. Nas vagens, os sintomas são as lesões arredondadas de coloração avermelhada, deprimidas e de tamanho variável, formando acérvulos do patógeno, uma espécie de massa esbranquiçada a rósea, com várias setas (PAULA JÚNIOR et al., 1995).

Para a antracnose do feijoeiro comum, as práticas de controle recomendadas são: a rotação de cultura com gramíneas, resistência varietal, sementes sadias e produtos químicos, usados principalmente para o tratamento de sementes, bem como o uso de variedades resistentes (BIANCHINI et al., 2005). Como não há registro de material resistente à antracnose do feijão-fava, recomenda-se que sejam utilizadas sementes sadias e uso de produtos químicos para controle da doença (CARVALHO et al., 2010).

2.3.1 *Colletotrichum* spp.

O ciclo de vida de *Colletotrichum* passa pelos estágios de hemibiotrófico, biotrófico e necrotrófico. No início do parasitismo o fungo produz um apressório melanizado e com a penetração hifas primárias não causam a morte das

células. Nesse estágio de infecção é chamado de biotrófico. Em seguida as hifas secundárias são formadas e se espalham por toda célula matando o hospedeiro, esta é a fase necrotrófica, o início desta fase acontece entre 48 a 72 horas depois do início da inoculação se as condições ambientais forem favoráveis (MUNCH et al., 2008).

Espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* são fungos mitospóricos que apresentam micélio desenvolvido, septado e ramificado (AGRIOS, 2005). O gênero *Glomerella* Spauld. & H. Schrenk (Ascomycota) corresponde à fase sexuada de *Colletotrichum* (INDEX FUNGORUM, 2004).

As condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo são temperaturas moderadas de 13 a 27° C, sendo a ideal 21° C, com a umidade relativa do ar acima de 91%, por período de seis a nove horas. Estas condições favorecem a disseminação da doença (CARVALHO et al., 2010).

A disseminação desse fungo pode ocorrer a longas distâncias, através de sementes contaminadas. A infecção e o desenvolvimento dos sintomas da doença podem aparecer em todos os órgãos aéreos da planta, desde o início do seu desenvolvimento, podendo causar tombamento de pré e pós-emergência (BLACK et al., 1991).

Os conídios produzidos nos acérvulos ficam envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz provavelmente protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES 2002). Segundo Mishra & Siradhana (1979) os conídios não constituem estruturas de sobrevivência porque sua viabilidade diminui rapidamente. Entretanto, o micélio pode permanecer viável por longo período em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda como infecções latentes.

A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa. No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia (MENEZES 2002).

Algumas espécies são mais específicas a um determinado hospedeiro, como por exemplo, *C. lindemuthianum* em feijoeiro. Por outro lado, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, podem ocorrer em diferentes famílias de hospedeiros, indicando que uma espécie pode causar doença em vários hospedeiros, bem como um único hospedeiro pode ser atacado por diferentes espécies de *Colletotrichum*, as quais induzem sintomas semelhantes aos da antracnose. Neste último caso, a identificação do agente etiológico, baseado somente em caracteres morfológicos, pode ser de difícil conclusão. Assim, a aplicação conjunta com outros métodos de identificação pode possibilitar uma diferenciação correta (MENEZES, 2006).

2.4 Variabilidade fenotípica e genotípica de espécies de *Colletotrichum*

2.4.1 Caracterização morfológica e cultural

Estudos de identificação do gênero *Colletotrichum* têm sido baseados principalmente em critérios morfológicos e culturais (SUTTON, 1992; TALHINHAS et al., 2002; PERES et al., 2002; ANDRADE et al., 2007). Entre as características culturais mais utilizadas, estão a taxa de crescimento micelial e a coloração da colônia. Estas características são consideradas úteis para distinção entre espécies do gênero, tais como *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (TOZZE JÚNIOR et al., 2006)

Características como morfologia de conídios, setas e teleomorfo, a coloração da colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento têm sido usadas para diferenciar espécies morfológicamente semelhantes, como *C. capsici*, *C. dematium*, *C. truncatum*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* entre outros (SUTTON, 1992).

De acordo com Sutton (1992), *C. acutatum* demonstra forma dos conídios retos, fusiformes e extremidades afiladas, o comprimento varia de 8,5 e 16,5 μm e largura de 2,5 e 4,0 μm , o que diferencia de *C. gloeosporioides* que apresenta os conídios retos, cilíndricos e ápices arredondados, o comprimento varia de 12 e 17 μm e largura 3,5 e 6 μm . A forma estrutural, dos

conídios afilados apenas em uma das extremidades confirma o trabalho realizado por Vinniere (2004), em isolado de *C. gloeosporioides*.

De acordo com, Photita et al., (2005) em pesquisa, demonstrou diferenças importantes em características dos grupos morfológicos de *Colletotrichum* spp. no tamanho dos conídio e taxa de crescimento do micélio em meio BDA. Em *C. truncatum* o comprimento dos conídios variaram entre 20 a 31µm e largura de 3 a 4 µm, sendo diferente de *C. gloeosporioides* e de *C. musae*. A temperatura 25 a 28°C para *C. truncatum* favorece a germinação e a taxa de crescimento micelial que varia de 5,7 a 7,4mm/dia.

De acordo com Carvalho (2009) os isolados de *C. truncatum* no feijão-fava apresentaram as estruturas dos conídios hialinos, unicelulares, falcado e extremidades afiladas e vários acérvulos com setas asseptadas de coloração marrom-escuro. O comprimento dos conídios variou entre 18,31–26,63 µm e a largura ficou 2,01–4,06 µm.

Essas características morfológicas dos isolados estão de acordo com as descritas, para *C. truncatum* que confirma o trabalho realizado por Sutton (1980) ocorrendo variação na largura dos conídios que foi menor. Outros trabalhos confirmando a morfologia de isolados do gênero *Colletotrichum*, Tozze Júnior et al., (2006) mostrou que alguns dos isolados de *C. gloeosporioides* demonstrou uma largura média dos conídios, sendo inferior ao valor mínimo citado por Sutton (1992) de *Colletotrichum* sp. Outros trabalhos relacionados às características dos conídios demonstram a limitação desta característica para fins taxonômicos, principalmente quando os isolados são cultivados em meios artificiais (BUENO, 2005)

Os apressórios apresentaram formato ovalado em todos isolados, os apressórios clavados e irregulares, produziram lateralmente tubos germinativos curtos (COUTO & MENEZES, 2004; MAFACIOLI et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; HARADA et al., 2008; TOMIOKA et al., 2008).

Os tipos de meios usados para crescimento dos isolados *C. truncatum* propiciam uma variação na coloração das colônias, ou seja, isso acontece de acordo com a composição do meio. No meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a cor da colônia varia de cinza-claro a cinza-esverdeado, com pouco micélio aéreo e

submerso, apresentado formato estrelado, com grande produção de conídios em massa mucilaginosa de coloração branca a amarelo claro. O meio Feijão-Dextrose-Ágar (FDA) favorece inicialmente a formação de colônias com micélio aéreo flocoso, a coloração apresenta-se branco-acinzentado nas bordas e escuro na parte central. Com o amadurecimento das colônias, o micélio cobre os conídios apresentando massa de cor variando de amarela-claro a salmão (CARVALHO, 2009). As cores das colônias podem variar de acordo com o meio utilizado em que o isolado vai ser submetido (MAYONJO & KAPOORIA, 2003; SERRA et al., 2008).

Outras características culturais como produção de microescleródios e setas também são utilizadas na caracterização de espécies desse gênero. *C. coccodes*, espécie que produz estruturas do tipo microescleródios, enquanto que a produção de setas depende da umidade relativa do ambiente. Desta forma, a última característica não deve ser utilizada para taxonomia de *Colletotrichum* (TOZZE JÚNIOR, MASSOLA JÚNIOR, 2007)

Observada as características de isolados de *C. truncatum* nos meios FDA e BDA, foi constatada variabilidade nas colônias, indicando claramente que essas características podem ser alteradas de acordo com o meio utilizado. De acordo com, Carvalho (2009) alguns isolados no meio FDA apresentam um crescimento maior e maiores apressórios. No meio BDA ocorreu uma maior produção de conídios. A germinação dos conídios em BDA variou com maior percentual de germinação, comparado ao meio FDA (CARVALHO, 2009).

Mesmo não sendo seguros, os trabalhos envolvendo a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*, os métodos morfológicos e culturais devem ser utilizados. Porém outras técnicas mais recentes mais precisas devem ser acrescentadas aos estudos, tais como as técnicas baseadas em ácidos nucléicos.

2.4.2 Caracterização molecular

A taxonomia tradicional de organismos representam uma área importante da micologia na distinção de fungos mitospóricos. A identificação e classificação dos fungos têm como base características morfométricas,

fisiológicas e culturais de populações de fungos. Entretanto alguns pontos podem dificultar a identificação de espécies de *Colletotrichum* como: similaridade morfológica e tipo de substrato a ser utilizado no cultivo (SUTTON, 1992; SUTTON, 1980).

Nesse contexto, o desenvolvimento da biologia molecular possibilitou a criação de várias técnicas baseadas na análise do DNA, que permitem a detecção de polimorfismo utilizando marcadores moleculares a fim de melhorar a identificação de espécies e até mesmo a reclassificação de grupos heterogêneos (THOMPSON et al., 2006). O uso de ferramentas apropriadas tem sido bastante útil na diferenciação das espécies de *Colletotrichum* (LOPEZ, 2001). Dentre essas técnicas podem ser citadas o dsRNA, RAPD, RFLP, cariótipos moleculares e sequenciamento.

Nos últimos anos, a utilização da sistemática molecular está revolucionando a visão evolutiva dos fungos mitospóricos. Os loci comumente utilizados em sistemática molecular de fungos são o rDNA ribossomal nuclear e mitocondrial (18S, 28S, ITS, IGS, mtSSU, mtLSU), bem como genes codificadores de proteínas, como RNAs polimerases (RPB1 e RPB2). (SCHMITT et al., 2000). Estes loci têm sido utilizados em estudos filogenéticos para diferenciar populações de *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *C. kahawae*, *C. magna* e *C. orbiculare* (CORRELL et al., 1993; FREEMAN et al., 1993; HODSON et al., 1993;. SREENIVASAPRASAD et al., 1993;. SHERRIFF et al., 1994; BROWN et al., 1996; JOHNSTON & JONES, 1997).

Estudos utilizando marcadores moleculares para a análise de espécies de *Colletotrichum* têm demonstrado a existência de grande variabilidade deste fungo em campos de produção de feijão em regiões distintas (SILVA, 2004). Dentre os marcadores empregados, o ITS (espaçador transcrito interno), tem sido mais utilizado para detectar divergência evolutiva recente dentro de espécies de *Colletotrichum* (FREEMAN et al., 2000; FORD et al., 2004). Além disso, primers específicos da espécie foram identificadas de acordo com dissimilaridades na sequência das regiões ITS de isolados representativos de *Colletotrichum* a partir de espécies diferentes (MILLS et al., 1992; HODSON et

al., 1993.; SREENIVASAPRASAD et al., 1993;. BROWN et al., 1996;. JOHNSTON & JONES, 1997; FORD et al., 2004).

A comparação de sequências da região ITS 1 do rDNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero levaram ao desenvolvimento de oligonucleotídeos (*primers*) específicos, Calnt2/ITS4 e o CgInt/ITS4, para a diferenciação entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por PCR (reação da polimerase em cadeia). A técnica foi utilizada com sucesso em diversas culturas como pêssego, mamão, maracujá, citros, manga, morango (BROWN et al., 1996; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; PERES et al., 2002; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; ANDRADE et al., 2007).

Atualmente, oito genes têm sido sequenciados a fim de identificar espécies de *Colletotrichum*, tais como: actina, quitina sintetase (CARBONE & KOHN, 1999), calmodulina (O'DONNELL, et al., 2000; WEIR et al., 2012) β -tubulina-2 (O'DONNELL & CIGELNIK, 1997), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (TEMPLETON et al., 1992), glutamina sintetase (STEPHENSON et al., 1997; WEIR et al., 2012), ITS 1 e 4 (WHITE et al., 1990) e magnésio superóxido dismutase (MARIWAKI & TSUKIBOSHI 2009). O sequenciamento desses genes possibilitou a identificação de vinte e duas espécies e uma subespécie dentro do complexo *Colletotrichum* (DAMM et al., 2012).

A caracterização patogênica também tem sido utilizada por muitos pesquisadores. Sabe-se que, tanto uma espécie pode causar doença em vários hospedeiros, bem como um único hospedeiro pode ser atacado por diferentes espécies, sugerindo a patogenicidade cruzada como um método complementar para a diferenciação de espécies (PERES et al., 2002).

2.4.3 Sensibilidade a fungicidas

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir as altas produtividade e qualidade de produção, visadas pela agricultura moderna (KIMATI, 2011). A aplicação de fungicidas é em muitos casos, o método mais utilizado para controle da antracnose em diversas culturas, entre elas, a cultura do feijoeiro (BIANCHINI et al., 2005) e feijão-fava (CARVALHO et al., 2010).

A utilização contínua de produtos químicos para o controle de pragas e doenças de plantas, pode promover a seleção de populações resistentes aos produtos utilizados (SALES JÚNIOR et al., 2007). Em vários países são relatados casos de resistência de *Colletotrichum* a fungicidas, inclusive no Brasil, há relatos de *Glomerella cingulata* em maçã ao composto benomil (FORTES, 1985), *C. fragariae* do morangueiro (TANAKA et al., 1997) e resistência de isolados de *C. lindemuthianum* ao benomil e outros fungicidas do grupo dos benzimidazóis (MARINGONI & BARROS, 2002).

Certas espécies, no entanto, podem ser menos sensíveis aos fungicidas. Podem-se citar como exemplo, diferenças na sensibilidade entre algumas espécies de *Colletotrichum*, como por exemplo: *C. acutatum*, que é citado como menos sensível a benomil, captana e propiconazol, e mais sensível a miclobutanil e tebuconazol do que *C. gloeosporioides* (TOZZE JÚNIOR, 2007; VINNIERE, 2004)

Dentre os diversos atributos genéticos, a sensibilidade a compostos químicos tem sido empregada para estudos de variabilidade entre isolados de *Colletotrichum* de diferentes origens (SHABI et al., 1994; BERNSTEIN et al., 1995).

Em estudos com isolados de *Colletotrichum*, associados a frutos de pessegueiro (*Prunus persica*), foi possível inserir os isolados em dois grupos distintos: o primeiro, formado por representantes da espécie *Colletotrichum acutatum*, apresentou colônias de coloração rósea, crescimento rápido em meio BDA e crescimento satisfatório em meio complementado com benomyl; o segundo grupo, de isolados da espécie *C. gloeosporioides*, caracterizou-se por colônias de cor acinzentada, cresceu mais lentamente em BDA e não se desenvolveu em meio com o mesmo fungicida. Confirmando a importância do método de sensibilidade a fungicidas para a caracterização de populações de espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* (BERNSTEIN et al., 1995).

Estudos com isolados pertencentes a diferentes espécies de *Colletotrichum* apresentaram sensibilidade diferenciada a fungicidas sistêmicos. Isolados de *C. gloeosporioides* e *C. boninense* foram mais sensíveis aos benzimidazóis (Carbendazim e tiabendazol), enquanto que isolados de *C. acutatum* foram mais sensíveis a azoxistrobina, por outro lado,

isolados de *C. coccodes* tiveram a menor sensibilidade para os fungicidas acima relacionados (TOZZE JÚNIOR, 2007).

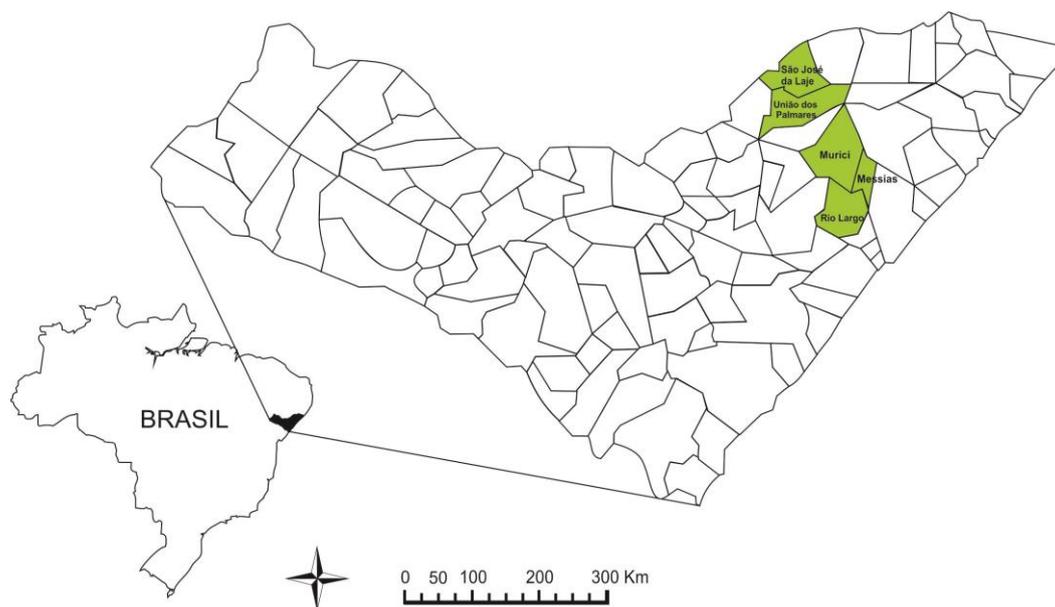
Além dos princípios ativos serem importantes para definição de estratégias de controle químico para muitas doenças no campo, esses compostos também são úteis para separação de espécies fúngicas. Entretanto, se faz necessário mais estudos envolvendo a caracterização das novas espécies de *Colletotrichum* que vêm sendo recentemente relatadas (WEIR, et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados

Para a condução do experimento, foram utilizados 20 isolados de *Colletotrichum* obtidos do feijão-fava oriundos de cinco municípios do estado de Alagoas (Figura 1). A partir de folhas e vagens com sintomas de antracnose foi realizado o isolamento do patógeno, através do método indireto. Pequenas amostras da área sintomática foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubadas em B.O.D. a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, durante sete dias. Após a incubação, evidenciado o crescimento micelial, partes das colônias foram transferidas para tubos de ensaio com meio de cultura BDA e mantido a 4 °C.

Figura 1. Municípios do estado de Alagoas produtores de fava utilizados no experimento para isolamento de *Colletotrichum* spp.



FONTE: Autor, 2012.

A partir dos isolamentos foram obtidos culturas monospóricas dos isolados, espalhando-se os conídios contidos em uma gota de água (3 a 4%) na superfície do meio Ágar-Água (AA) contido em placa de Petri. Após 24 e 36 horas de incubação, à temperatura de 25 ± 1 °C, as placas foram examinadas ao microscópio óptico e os esporos individuais e germinados foram transferidos para placas contendo BDA. Após a obtenção da cultura monospórica, os isolados foram preservados a 10 °C, em tubos de ensaio contendo BDA.

3.2 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado com folhas destacadas do feijão-fava assintomáticas. As folhas foram esterilizadas superficialmente com etanol (70%), ferido com agulha estéril e em seguida foi inoculada uma gota de 20 µL da suspensão de conídios de *Colletotrichum* (2×10^6 conídios/mL). Folha controle foi inoculada com 20 µL de água-destillada-estéril (ADE). As folhas foram depositadas em gerbox, seguido da deposição de um chumaço de algodão estéril e 10 mL de ADE e mantidos em B.O.D. a 25 ± 1 °C em fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias de inoculação foram examinadas para o

desenvolvimento de lesões. Após 14 dias, os esporos a partir de folhas doentes foram assepticamente transferidos e cultivados em placas de BDA e incubadas a 25 ± 1 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz durante 7 dias. As culturas resultantes foram avaliadas a colônia e morfologia dos esporos para confirmar os postulados de Koch.

3.3 Caracterização cultural

Para a condução deste ensaio foram utilizados os 20 isolados monospóricos de *Colletotrichum* (Tabela 2). Foi avaliada a característica morfológica da colônia de cada isolado. Discos de BDA contendo micélio (5 mm de diâmetro) foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura AvA (30 g de aveia, 17 g de ágar e 1000 mL de água). As placas contendo os discos foram incubadas em B.O.D. a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por sete dias.

3.3.1 Avaliação

Foram feitas leituras diárias de dois diâmetros ortogonais das colônias, com auxílio de um paquímetro digital MK-DC - 6" (150 mm), durante sete dias. As médias obtidas dos diâmetros serviram para o cálculo do Índice de Crescimento Micelial – ICM (mm/dia). No oitavo dia, foi observado visualmente o aspecto morfológico de cada colônia. Para isso levou-se em consideração a topografia, a coloração da colônia e posição do micélio em relação ao substrato.

3.3.2 Análise dos dados

De posse dos dados, foram calculados o Índice de Crescimento Micelial (ICM) segundo a fórmula:

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} \dots + \frac{C_n}{N_n}$$

em que:

ICM= índice de crescimento micelial

C_1 = crescimento micelial no primeiro dia

N_1 = número de dias

Os valores médios do índice de crescimento micelial foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa empregado foi o STATISTIX 9.0.

3.4 Caracterização morfológica

Neste ensaio foram verificados a forma e o tamanho dos conídios dos 20 isolados monospóricos de *Colletotrichum*. Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de AvA. Após a repicagem, as placas foram mantidas a 25 ± 1 °C, incubadas em B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro. Após 16 dias foram obtidas suspensões de conídios. Para isso os conídios foram removidos de cada placa com uso de 20 mL de ADE e filtrados em gaze. Posteriormente, retirou-se uma gota de 25 μ L e depositada em uma lâmina. Em seguida, transferida para uma placa de Petri contendo duas camadas de papel filtro e um suporte de plástico (canudo - VITALINA[®]). Em cada placa foi depositado, 10 mL de ADE e fechada com plástico PVC.

As placas foram incubadas em temperatura ambiente no escuro. No intervalo de 6 horas, foi verificada a esporulação e formação dos apressórios. Com a suspensão dos conídios, foram confeccionadas lâminas semi-permanentes para observação dos isolados quanto à forma e tamanho dos conídios e apressórios em microscópio óptico.

3.4.1 Avaliação

As lâminas de cada isolado foram avaliadas, sendo caracterizados a forma e o tamanho de 50 conídios. Quanto à dimensão, efetuou-se a medição do comprimento e largura de 50 conídios por lâmina. Sendo esses avaliados em sistema de vídeo-câmara acoplado a um microscópio óptico. As mensurações das dimensões reais de cada conídio foram realizadas indiretamente por meio da mensuração da imagem dos mesmos. A imagem de aumento de 400x do microscópio óptico (NIKON[®] ECLIPSE 50i) foi projetada

em monitor televisivo através de sistema de câmara de vídeo (DIGITAL BEL-PHOTONICS® – S/N: T504304, 5,0 MP) acoplado ao microscópio óptico. As imagens foram registradas com auxílio do software: BELVIEW v 7.1.1.2 e posteriormente realizadas as mensurações dos conídios, apressórios e setas de cada isolado utilizando o software.

3.4.2 Análise dos dados

Para a análise dos dados foram obtidos os valores médios de comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios, apressórios e setas de cada isolado e plotados em planilhas no EXCEL.

3.5 Caracterização Molecular

3.5.1 Extração de DNA

Os fungos foram transferidos para o laboratório de Fitopatologia Molecular/CECA/UFAL. Dando início ao procedimento de extração de DNA foi utilizando uma porção de micélio de cada fungo, e transferido para um almofariz separadamente, em seguida, colocado em ultra freezer A -80 °C por um período de 30 minutos após este tempo é retirado e posteriormente, macerado com o pistilo até ficar o mais líquido possível. Em seguida, adicionou 990 µL de tampão de extração (50 mM de Tris-HCl pH 7,2; 50 mM de EDTA e 3% de SDS) + 10 µL de mercapto etanol; e distribuiu em dois tubos de 1,5 cada amostra ficou por 30 minutos em banho-maria a 65°C; e centrifugando a 15.000 rpm por 15 minutos; retirou a fase aquosa e colocou em novos tubos; com a adição de 600µL de CIA (24:1) + 200 µL de CTAB 10%; foi levado para agitar no vórtex; e mais uma vez centrifugar a 15.000rpm por 15 minutos; retirou-se a fase aquosa com cuidado para não ir com sujeira e em seguida transferiu para novos tubos; adicionando 400 µL de isopropanol e misturou com a inversão dos tubos; deixou no freezer por 2 horas; levando para centrifugar a 15.000 rpm por 10 minutos; fez o descarte do sobrenadante e adicionou 400 µL de etanol 70%; mais uma vez retornou para a centrifuga a 15.000 rpm por 5 minutos e descartou o sobrenadante; adicionando 400 µL de etanol absoluto; retorna a

centrifuga 15.000 rpm por 5 minutos e descarta o sobrenadante; colocou os tubos para secar em papel toalha a temperatura ambiente até que o álcool que evapora-se e adicionou 40 µL de TE levando para colocar em banho-maria a 37°C até que o pellet se dissolva; (Doyle & Doyle, 1997).

3.5.2 Reação de PCR

Baseado em trabalhos anteriores, para a amplificação por PCR da região ITS (espaçador transcrito interno) do DNA ribossomal (rDNA), foram utilizados os primers ITS1 e ITS4.

Os produtos de PCR provenientes da região ITS foram purificados com utilizando a GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). O sequenciamento dos isolados realizado pela Macrogen Inc (Seul, Coréia do Sul) diretamente a partir dos produtos de PCR purificados. As sequências nucleotídicas obtidas foram utilizadas nas análises filogenéticas.

3.5.3 Análise Filogenética

As sequências geradas foram editadas no programa DNAMAN versão 6 e posteriormente submetidas ao algoritmo BLASTn (NCBI-www.ncbi.nlm.nih.gov) para a atribuição preliminar dos isolados em nível de espécie.

Para análise filogenética, as sequências foram inicialmente alinhadas utilizando o software MUSCLE disponível no pacote computacional MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2007). O alinhamento das sequências serviu como base para reconstrução filogenética por Neighbor-joining, utilizando o modelo de substituição Tamura-Ney (1993). A confiabilidade da árvore gerada foi obtida a partir 1000 repetições bootstrap. Sequências de outras espécies fúngicas disponíveis no GenBank foram incluídas nas análises. A árvore foi utilizada com a finalidade de determinar o estado taxonômico dos isolados obtidos nesse trabalho.

3.6 Sensibilidade a fungicidas

Foram realizados experimentos “in vitro” para determinar a sensibilidade a fungicida. Os produtos avaliados com o ingrediente ativo, grupo químico, classe e modo de ação, encontram-se na Tabela 1. O experimento foi conduzido em duas etapas, a primeira foi realizada com cinco fungicidas, quatro doses e um isolado de *Colletotrichum* e a segunda foi realizada com apenas um fungicida e uma dose.

Tabela 1. Produto comercial, ingrediente ativo, grupo químico, classe e modo de ação dos fungicidas utilizados nos testes de sensibilidade “in vitro” do fungo *Colletotrichum* spp. isolado do feijão-fava.

Fungicida	Ingrediente ativo (i.a.)	Grupo químico	Classe	Modo de ação	
				Sítio primário de ação	Processo afetado
Derosal 500	Carbendazim	Benzimidazol	Sistêmico	Tubulina	Mitose
Benlate	Benomil	Benzimidazol	Sistêmico	Divisão celular dos fungos	Inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs)
Vitavax-Thiram 200	Carboxina e Tiram	Carboxamidas e Ditiocarbonato	Sistêmico e contato	Oxidação de succinato	Respiração
Maxim	Fludioxonil + metalaxyl-M	Benzimidazol e Metalaxil	Sistêmico e contato	Tubulina e polimerase de RNA ribossomal	Mitose e síntese de proteína
Folicur	Tebuconazole	Triazóis	Sistêmico	Membrana celular dos fungos	Inibidores de Biossíntese de esteróis (IBEs)

FONTE: Autor, 2012.

3.6.1 1º etapa

Neste ensaio utilizou-se o isolado ICT 07 (Tabela 2). O isolado foi cultivado em meio BDA e mantido em B.O.D. a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por sete dias. Após este período, disco de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio fúngico foi transferido para o centro de placa de Petri contendo BDA + fungicida nas dosagens de (0 µL, 1 µL, 3 µL, 5 µL e 10 µL) por 100 mL de BDA selecionados para estudo.

3.6.1.1 Avaliação

O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento, cada placa correspondendo a uma repetição. Foram realizadas

avaliações no sétimo dia após a incubação. Comparando-se o crescimento micelial de cada tratamento com a testemunha, calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) (MENTEN et al., 1976):

$$\text{PIC} = \frac{\text{cresc. do diâmetro da testemunha} - \text{cresc. do diâmetro da tratamento}}{\text{cresc. do diâmetro da testemunha}} \times 100$$

A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi efetuada mediante análise de regressão.

3.6.2 2º Etapa

Foram utilizados 20 isolados de *Colletotrichum*, crescidos em meio BDA + 5 µL de fungicida e mantidos em B.O.D. a 25±1 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por sete dias. Todos os dias foram realizadas medições do diâmetro ortogonais de cada tratamento. Após nove dias de incubação os dados foram catalogados e registrados em planilha do EXCEL.

3.6.3 Avaliação

Foram realizadas três repetições por tratamento, cada placa correspondendo a uma repetição, adotando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nas duas etapas foi empregado o programa STATISTIX 9.0 para análise dos dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de patogenicidade

Todos os isolados empregados neste estudo foram patogênicos às folhas do feijão-fava destacadas (Tabela 2). Os primeiros sintomas apresentaram aos cinco dias após a inoculação. Foram observadas manchas avermelhadas que se iniciaram nas nervuras na fase abaxial da folha. Na fase adaxial as lesões apresentaram-se deprimidas, grandes e avermelhadas sobre as quais se formam os acérvulos do patógeno, com aspecto de massa

esbranquiçada e numerosas setas, e grande quantidade de conídios (Figura 2). Este resultado corrobora com os realizados por Mendes & Bergamin Filho, (1986); Rios et al., (2001); Mafacioli et al., (2006, 2008) e Serra et al., (2008) que reforçam a importância da técnica da folha destacada em estudos com fungos fitopatogênicos.

Tabela 2. Isolado, local de origem, órgão de isolamento, ano de coleta e teste de patogenicidade dos 20 isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes do feijão-fava.

Isolado	Local de origem	Órgão de isolamento	Localização		Coleta
			N	W	
ICT 01	Messias –AL	Vagem	09° 25' 01,2"	35° 50' 21,0"	2012
ICT 02	Messias –AL	Vagem	09° 25' 01,2"	35° 50' 21,0"	2012
ICT 03	São José da Laje –AL	Vagem	09° 03' 14,8"	36° 02' 00,7"	2012
ICT 04	São José da Laje –AL	Vagem	09° 03' 14,8"	36° 02' 00,7"	2012
ICT 05	União dos Palmares –AL	Vagem	09° 04' 02,4"	36° 02' 22,8"	2012
ICT 06	União dos Palmares –AL	Vagem	09° 04' 02,4"	36° 02' 22,8"	2012
ICT 07	Murici –AL	Folha	09° 17' 05,4"	35° 57' 42,9"	2012
ICT 08	Murici –AL	Folha	09° 17' 05,4"	35° 57' 42,9"	2012
ICT 09	Murici –AL	Folha	09° 17' 05,4"	35° 57' 42,9"	2012
ICT 10	Murici –AL	Folha	09° 17' 05,4"	35° 57' 42,9"	2012
ICT 11	Murici –AL	Vagem	09° 19' 55,1"	35° 53' 49,2"	2012
ICT 12	Murici –AL	Vagem	09° 19' 55,1"	35° 53' 49,2"	2012
ICT 13	Murici –AL	Folha	09° 19' 55,1"	35° 53' 49,2"	2012
ICT 14	Murici –AL	Folha	09° 19' 55,1"	35° 53' 49,2"	2012
ICT 15	Messias –AL	Vagem	09° 23' 31,6"	35° 50' 12,6"	2012
ICT 16	Messias –AL	Vagem	09° 23' 31,6"	35° 50' 12,6"	2012
ICT 17	Messias –AL	Vagem	09° 23' 31,6"	35° 50' 12,6"	2012
ICT 18	Rio Largo –AL	Folha	09° 28' 01,9"	35° 49' 42,4"	2011
ICT 19	Rio Largo –AL	Folha	09° 28' 01,9"	35° 49' 42,4"	2011
ICT 20	Rio Largo –AL	Semente	09° 28' 01,9"	35° 49' 42,4"	2012

[†]Teste de patogenicidade realizado em folhas sadias do feijão-fava

FONTE: Autor, 2012

Figura 2. Folha do feijão-fava com sintomas da antracnose causada por *Colletotrichum* spp.



FONTE: Autor, 2012.

4.2 Caracterização morfológica e cultural

As características morfológicas estão apresentadas na Tabela 3. Os isolados de *Colletotrichum* apresentaram conídios hialinos, unicelulares, forma falcado com ápices afilados e dispostos em acérvulos com setas asseptadas de coloração marrom escuro (Figura 3). O tamanho dos conídios variou de 17,18 - 22,64 μm para o comprimento e 2,19 - 2,47 μm para a largura, observando-se variações entre os isolados (Tabela 3). Os conídios do isolado ICT 11 apresentaram o menor comprimento (16,77 μm), enquanto o isolado ICT 20 a maior largura (2,59 μm). Avaliando a morfometria dos conídios, pode-se verificar a alta variabilidade entre os isolados. Resultados semelhantes foram obtidos por Mayonjo & Kapooria (2003), que também encontraram consideráveis variações no comprimento (15 - 31 μm) e largura (2 - 7,6 μm) analisando isolados de *C. truncatum* patogênico da soja. Tozze Júnior et al., (2006) verificaram que grande parte dos isolados de *C. gloeosporioidese* *C. acutatum* apresentaram comprimento e largura média dos conídios, inferiores ao valor mínimo encontrados neste estudo.

Os apressórios apresentaram-se de cor escura (melanizado) e forma ovalada e clavada, podendo ter algumas variações, com formato globoso (Figura 3). Suas dimensões variaram de 8,79 - 11,27 μm de comprimento 5,22 - 7,88 μm de largura. As setas foram abundantes em todos os isolados, apresentaram comprimento de 2,75 - 5,35x 50,70 - 83,95 μm . De acordo com Sutton (1992), a identificação de espécies de *Colletotrichum* é baseada em características morfológicas do fungo, podendo ser usados também características culturais das colônias dos isolados de *Colletotrichum* e testes de patogenicidade.

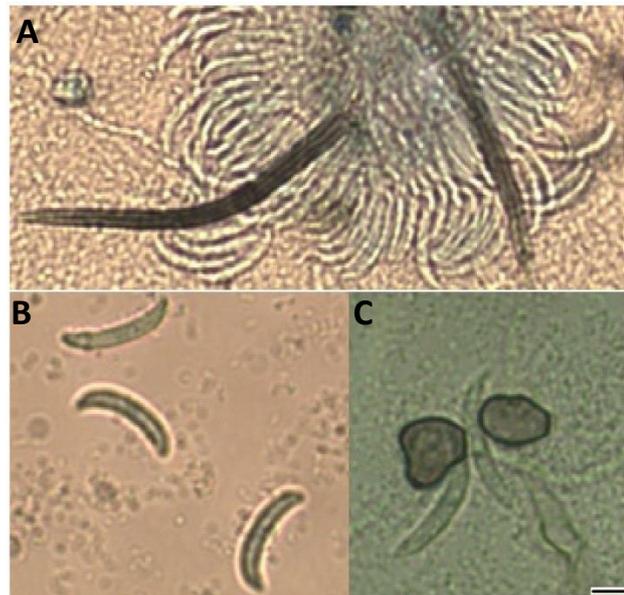
Tabela 3. Comprimento e largura de conídios, apressórios e setas de isolados de *Colletotrichum* spp. do feijão-fava, quando cultivados em meio AvA a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas, aos 7 dias de incubação.

Isolado	Conídio			Apressório			Seta
	Formato	Tamanho (μm)	Relação ^a (C/L)	Formato	Tamanho (μm)	Relação (C/L)	
ICT 01	Falcado	2,22-16,87	7,81	Globoso ^b	7.61-10,80	1,42	+
ICT 02	Falcado	2,42-18,72	7,86	Clavado	7.54-10,54	1,40	+
ICT 03	Falcado	2,58-19,97	7,85	Clavado	5.78-9,55	1,63	+
ICT 04	Falcado	2,29-16,53	7,47	Clavado	5.92-9,55	1,60	+
ICT 05	Falcado	2,47-16,99	7,06	Globoso	5.91-11,55	1,95	+
ICT 06	Falcado	2,59-22,07	8,69	Globoso	6.07-10,57	1,75	+
ICT 07	Falcado	2,61-16,54	6,36	Clavado	5.58-9,18	1,68	+
ICT 08	Falcado	2,44-17,18	7,09	Clavado	6.06-10,97	1,80	+
ICT 09	Falcado	2,42-21,77	9,17	Clavado a Ovalado	7.35-10,45	1,39	+
ICT 10	Falcado	2,51-21,83	8,69	Ovalado	5.78-8,79	1,53	+
ICT 11	Falcado	2,19-16,77	7,76	Ovalado	-5.9-11,04	1,97	+
ICT 12	Falcado	2,28-15,54	7,08	Clavado	5.22-10,48	1,96	+
ICT 13	Falcado	2,47-21,00	8,63	Clavado	6.17-9,84	1,59	+
ICT 14	Falcado	2,32-18,82	8,11	Clavado a Globoso	7.09-11,16	1,47	+
ICT 15	Falcado	2,49-18,22	7,80	Ovalado	-11,12-6.69	1,72	+
ICT 16	Falcado	2,35-18,17	7,22	Globoso	7.10-10,96	1,42	+
ICT 17	Falcado	2,54-17,86	7,13	Clavado	7.26-10,20	1,44	+
ICT 18	Falcado	1,94-19,51	10,3	Clavado	7.39-10,62	1,43	+
ICT 19	Falcado	2,08-16,41	7,97	Clavado a circular	7.39-11,27	1,40	+
ICT 20	Falcado	2,22-22,69	10,29	Globoso	7.88-12,48	1,58	+

^a = Relação entre comprimento e largura dos conídios, apressórios e setas observados nos isolados estudados; ^b = Formato dos apressórios predominante nos isolados estudados

FONTE: Autor, 2012.

Figura 3. Seta (A), conídios (B) e apressórios (C) de *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose do feijão-fava. Barra = 16 µm.



FONTE: Autor, 2012.

Em relação às características culturais das colônias em meio AvA a temperatura de 25 ± 1 °C são apresentados na Tabela 4 e Figura 4. Os 20 isolados avaliados neste estudo, apresentaram-se heterogênicos em relação à coloração das colônias. Diante deste resultado, observações e descrições das culturas, permitiu agrupá-las em 8 grupos distintos (Tabela 4). O cultivo no meio (AvA) possibilitou a observação de características culturais distintas na população de *Colletotrichum* avaliadas. Em relação à produção de micélio aéreo, observou-se variação de crescimento micelial reduzido a abundante. Os isolados (ICT 01, ICT 02, ICT 04, ICT 08, ICT 10, ICT 14, ICT 17 e ICT 18) apresentaram a formação de massas de conídios de cor alaranjada a marrom escuro em meio (AvA).

No grupo I foram inseridos dos isolados (ICT 01 e ICT 02) representando 10% do total de isolados avaliados. O GCC II representou o maior grupo (5 isolados) correspondendo a 25%. Os isolados ICT 06 e ICT 07 foram inseridos no grupo III e os isolados ICT 08 e ICT 14 e os ICT 09 e ICT 10 agrupados nos GCC IV e V, respectivamente. Os grupos VI e VII foram formados por três isolados cada. Por fim, o GCC VIII foi composto por apenas um isolado (ICT 20).

Em relação á topografia da colônia, os isolados apresentaram três padrões distintos: (a) micélio aéreo reduzido (colônias com crescimento micelial rente ao meio de cultura), (b) micélio aéreo moderadamente abundante (colônias com crescimento micelial aéreo de até 3 mm de altura), (c) micélio aéreo abundante (colônias com crescimento micelial aéreo acima de 3 mm de altura).

A maioria dos isolados apresentou micélio aéreo moderadamente abundante, referente a 60% dos isolados avaliados. Micélios aéreos abundantes e reduzidos corresponderam a 35 e 5%, respectivamente. A diferença na coloração da colônia e da topografia do micélio dos isolados do gênero *Colletotrichum* pode ser devida à influência das condições de cultivo as quais os isolados foram submetidos (MAYONJO & KAPOORIA, 2003; SERRA et al., 2008).

Os dados referentes ao índice de crescimento micelial (ICM), estão apresentados na Tabela 4. Os isolados ICT 10 e ICT 16 apresentaram os menores ICM, que corresponderam a 3,83 e 3,93, respectivamente. Esses isolados não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram dos demais isolados analisados. Dois isolados (ICT 07 e ICT 08) apresentaram índice de crescimento micelial na faixa de 7,13 enquanto que os demais apresentaram índice de crescimento micelial variando entre 6,66 a 4,7. De acordo com os autores Peres et al., 2002; Tozze Júnior, 2007; Vinniere, 2004; Freeman; Katan; Shabi, 1998; Couto; Menezes; Coelho, 2002; Andrade et al., 2007 *C. gloeosporioidese* e *C. acutatum* crescem em ritmo mais lento do que os isolados avaliados neste estudo.

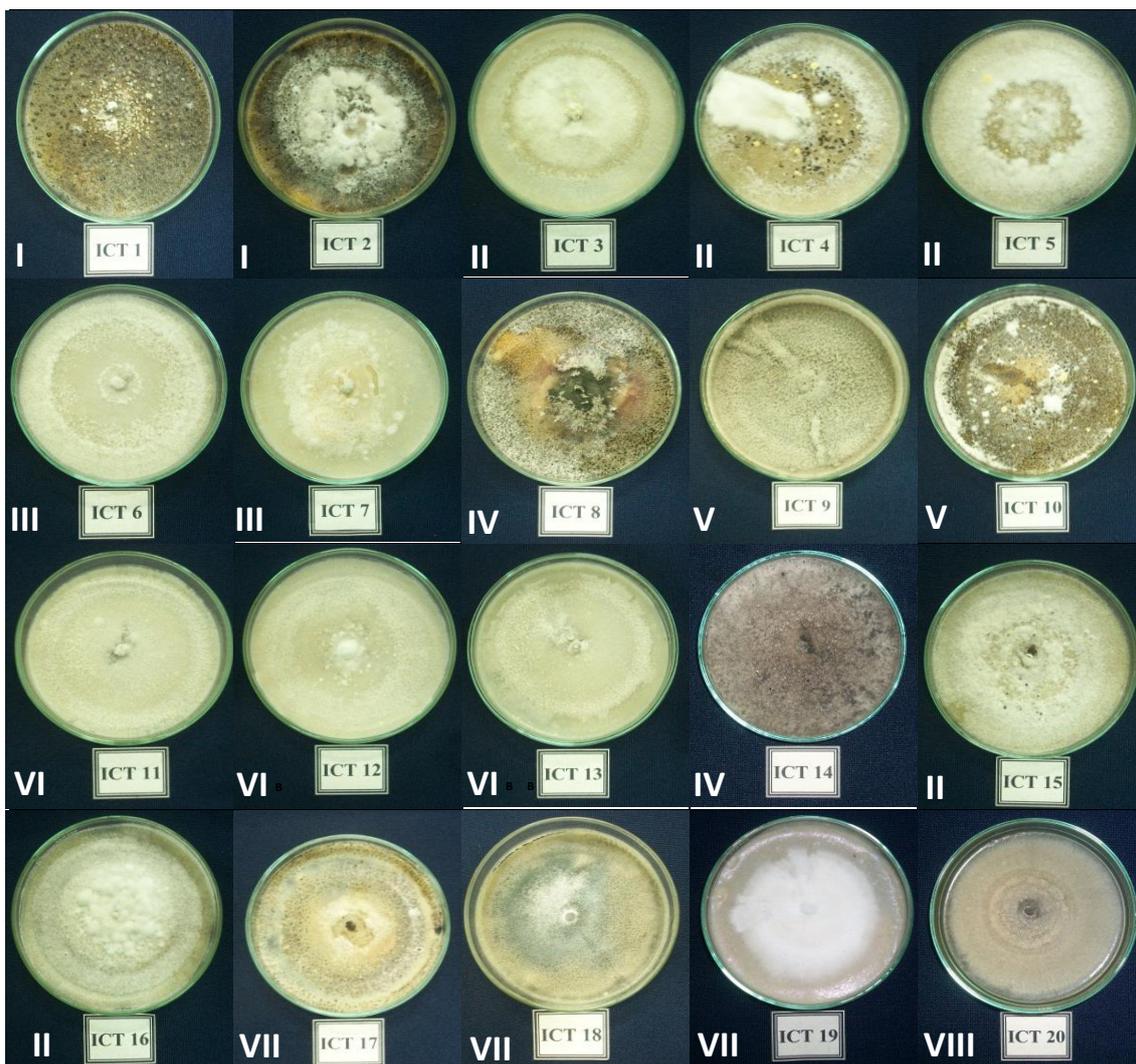
Tabela 4. Índice de crescimento micelial (ICM), grupo de coloração e topografia da colônia de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos do feijão-fava.

Isolado	ICM		Cor da colônia	Topografia da colônia	GCC ^a
ICT 01	6,66	B	Branco no centro e cinza claro nas bordas com abundante esporulação	Micélio aéreo moderadamente abundante	I
ICT 02	5,70	FG			
ICT 03	5,93	DEF	Branco no centro e nas bordas com abundante esporulação	Micélio aéreo abundante	II
ICT 04	5,46	GH			
ICT 05	6,40	BC			
ICT 15	6,23	CD			
ICT 16	3,93	K	Branco e creme no centro e nas bordas com esporulação	Micélio aéreo abundante	III
ICT 06	5,26	H			
ICT 07	7,13	A	Branco e creme no centro e nas bordas	Micélio aéreo moderadamente abundante	IV
ICT 08	7,13	A	Cinza escuro no centro e cinza claro e creme nas bordas com abundante esporulação		
ICT 14	4,40	J	Marrom no centro e nas bordas com concentração de esverdeado nas margens	Micélio aéreo moderadamente abundante	V
ICT 09	3,20	L			
ICT 10	3,83	K	Creme no centro e nas bordas	Micélio aéreo moderadamente abundante	VI
ICT 11	4,80	IJ			
ICT 12	4,70	IJ			
ICT 13	5,80	EFG	Branco no centro e creme nas bordas com esporulação	Micélio aéreo moderadamente abundante	VII
ICT 17	6,36	BC			
ICT 18	6,13	CDE			
ICT 19	5,10	HI	Branco no centro e creme nas bordas	Micélio aéreo reduzido	VIII
ICT 20	4,70	IJ	Cinza escuro no centro e cinza claro e creme nas bordas		
C. V.	2.52				

^a GCC = Grupo de Coloração da Colônia

FONTE: Autor, 2012.

Figura 4. Dados referentes a caracterização cultural e os grupos de características culturais (GCC) dos isolados de *Colletotrichum* spp.



FONTE: Autor, 2012.

4.3 Identificação molecular

A amplificação usando-se os primers ITS1 e ITS2 confirmou a identidade de 60% dos isolados, com 99% de similaridade à *Glomerella truncata* (anamorfo *C. truncatum*), confirmando que o agente causal da antracnose do feijão-fava é o *C. truncatum* (Tabela 5). Entretanto, 40% dos isolados não foram identificados à *G. truncata*. Este resultado pode ser justificado, devido aos primers da região ITS 1 e ITS 4 não serem específica para a maioria das espécies de *Colletotrichum*.

Os Isolados ICT 09 e ICT 11, apresentaram 99% de similaridade com *C. dematium*. Os isolados ICT 10, ICT 12, ICT 13, ICT 14 e ICT 20 mostraram 100% de similaridade com *C. capsici* e o isolado ICT 16 apresentou 99% de similaridade com *Glomerella cingulata* (Tabela 5). Tozze Júnior (2007) ao caracterizar isolados de *Colletotrichum* provenientes de pimentão, verificou a predominância de conídios típicos ao formato descrito para *C. gloeosporioides*. Entretanto, ao realizar uma PCR utilizando primmer ITS 1 e ITS 4, os mesmos empregados neste estudo, constatou que tais isolados apresentaram 99% de identidade com espécie *C. acutatum*. Com isso, o autor também evidenciou que a identificação molecular através do uso dos primmer ITS 1 e ITS 4 não é um critério útil para identificação específica espécies de *Colletotrichum*.

Na árvore filogenética (Figura 6) os isolados separaram-se em três grupos distintos (G-I, G-II e G -III). Observou-se que a formação dos grupos por similaridade genética não foi condicionada apenas pelos isolados de *C. truncatum*. O G-I foi composto pelos isolados de *C. truncatum*. Nos grupos G-II e G-III foram compostos por três isolados. No G-II apenas um isolado (*C. gloeosporioides*) e no G-III foi agrupado por ICT 16 e *G. cingulata* (anaformo *C. gloeosporioides*), respectivamente.

Os resultados sugerem investigação no futuro também com o sequenciamento de regiões intrônicas de outros genes, como a β -tubulina, Fator alfa1 de elongação da Tradução (EF), Actina e GPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (MYLLYS et al., 2002; GUERBER et al., 2003). Independente desta diversidade observada (Figuras 6), os resultados revelam que não é possível confirmar mais de uma espécie de uma espécie, além de *C. truncatum* isolados do feijão-fava (TOZZE JÚNIOR, 2007).

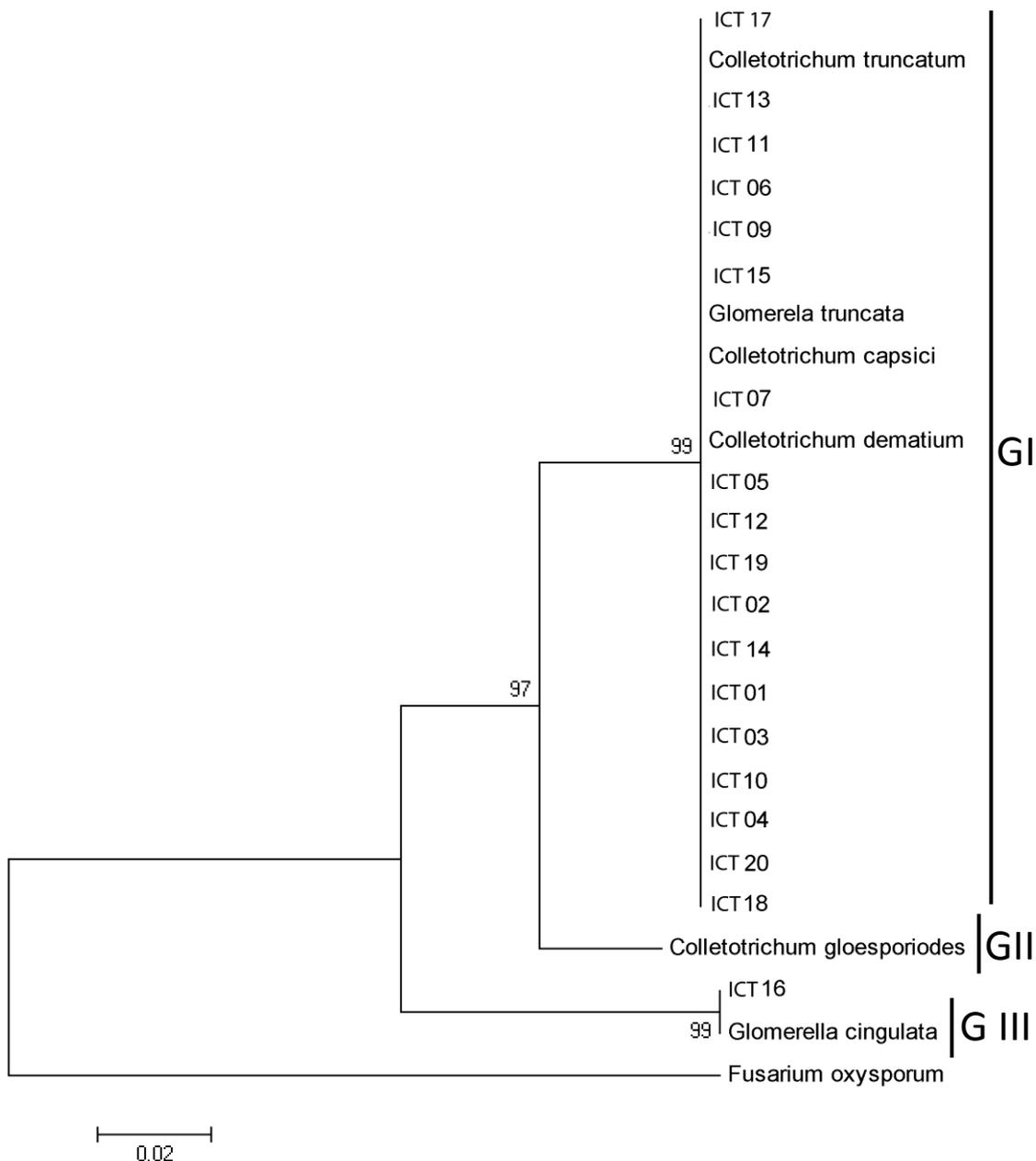
Tabela 5. Tamanho dos pares de bases e Identificação molecular dos isolados de *Colletotrichum* spp. causadores da antracnose no feijão-fava.

ISOLADO	TAMANHO	IDENTIFICAÇÃO	IDENTIDADE	HOSPEDEIRO	ORIGEM	Nº DE ACESSO	REFERÊNCIAS
ITC 01	596 nt	<i>Glomerella truncata</i>	99%	Soja	Taiwan	FJ172230.1	Chen, et. al. (2006)
ITC 02	588 nt	<i>Glomerella truncata</i>	98%	Soja	Taiwan	FJ172230.1	Chen, et. al. (2006)
ITC 03	617 nt	<i>Colletotrichum truncatum</i>	99%	Feijão	Alemanha	AJ301945.1	Niremberg , et. al. (2002)
ITC 04	587 nt	<i>Glomerella truncata</i>	99%	Soja	Taiwan	FJ172230.1	Chen, et. al. (2006)
ITC 05	587 nt	<i>Glomerella truncata</i>	99%	Soja	Taiwan	FJ172230.1	Chen, et. al. (2006)
ITC 06	606 nt	<i>Colletotrichum truncatum</i>	93%	Soja	Alemanha	AJ301945.1	Niremberg , et. al. (2002)
ITC 07	587 nt	<i>Glomerella truncata</i>	99%	Soja	Taiwan	FJ172230.1	Chen, et. al. (2006)
ITC 09	600 nt	<i>Colletotrichum dematium</i>	99%	ND	Japão	AB046608.1	Moriwaki, et. al. (2002)
ITC 10	584 nt	<i>Colletotrichum capsici</i>	100%	ND	México	HM450130.1	Não publicado
ITC 11	594 nt	<i>Colletotrichum dematium</i>	99%	ND	Japão	AB046608.1	Moriwaki, et. al. (2002)
ITC 12	610 nt	<i>Colletotrichum capsici</i>	100%	ND	México	HM562707.1	Não publicado
ITC 13	593 nt	<i>Colletotrichum capsici</i>	100%	ND	México	HM562706.1	Não publicado
ITC 14	592 nt	<i>Colletotrichum capsici</i>	100%	Pimentão	Malasia	JQ685747.1	Não publicado
ITC 15	595 nt	<i>Glomerella truncata</i>	99%	Soja	Taiwan	FJ172230.1	Chen, et. al. (2006)
ITC 16	611 nt	<i>Glomerella cingulata</i>	99%	Falso café	Califórnia	EF423535.1	Gilbert; Webb (2007)
ITC 17	592 nt	<i>Glomerella truncata</i>	99%	Soja	Taiwan	FJ172230.1	Chen, et. al. (2006)
ITC 18	591 nt	<i>Colletotrichum truncatum</i>	99%	Feijão	Alemanha	AJ301945.1	Niremberg , et. al. (2002)
ITC 19	596 nt	<i>Colletotrichum truncatum</i>	99%	Feijão	Alemanha	AJ301945.1	Niremberg , et. al. (2002)
ITC 20	588 nt	<i>Colletotrichum capsici</i>	100%	ND	México	HM450130.1	Não publicado

ND = Hospedeiro não identificado

FONTE: Autor, 2012.

Figura 5. Árvore filogenética mostrando a relação entre isolados de *Colletotrichum* spp. e outras espécies de fungos. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequências de rDNA (ITS1 e ITS4), utilizando o método deneighbor-joining. Uma análise de bootstrap foi feita com 1000 repetições.



FONTE: Autor, 2012.

4.4 Sensibilidade a fungicida

Os resultados da análise de variância indicaram efeitos significativos, no uso dos fungicidas diferindo-os da testemunha (Figura 6). Os fungicidas derosal e benlate inibiram 100% o crescimento micelial nas doses (1 μ L, 3 μ L, 5 μ L e 10 μ L), as doses foram fungitóxicas, matando completamente o isolado.

O vitavax não foi eficiente no PIC do isolados ICT 07, o maior valor foi obtido na dose 10 μ L/100 mL do meio, inibindo apenas 15% do crescimento micelial.

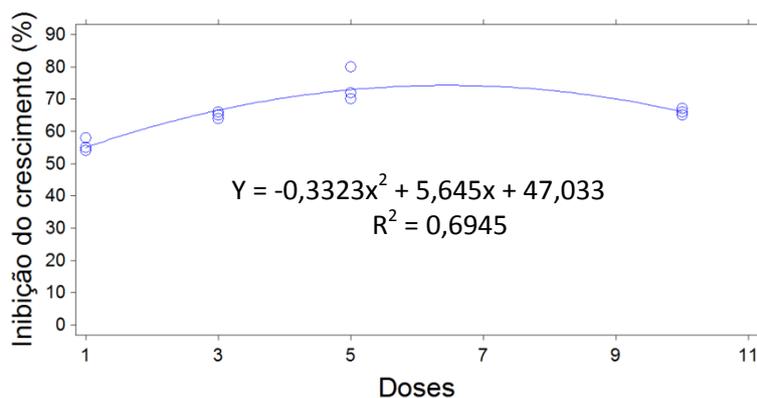
O folicur apresentou valores médios, com amplitudes de 20 a 55% de inibição do crescimento micelial, quando comparado com os demais fungicidas. Na dose 10 μ L de folicur/ 100 mL do BDA, apresentou o melhor PIC (55%).

Em relação ao maxim, os resultados foram satisfatórios, com PIC acima de 50% em praticamente todas as doses empregadas, sendo a 5 μ L/100 mL de BDA o melhor resultado, sendo eficiente na redução do crescimento (PIC = 75%).

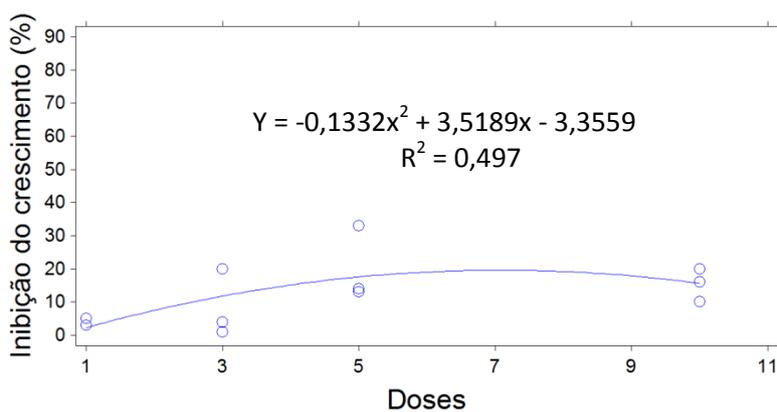
O comportamento dos isolados de *Colletotrichum* em função da sensibilidade ao fungicida maxim na dose de 5 μ L/100 mL do meio BDA são apresentados na Tabela 6. A dose foi fungitóxica para os isolados ICT 02, ICT 09, ICT 14 e ICT 20. Os isolados ICT 07, ICT 17 e ICT 18 apresentaram valores de PCI médios com amplitudes variando de 100 a 42,8% de redução do crescimento. Os demais isolados foram menos sensíveis ao maxim na dos de 5 μ L/100 mL do meio BDA. De acordo com Dekker (1995) mudanças graduais de sensibilidade podem ocorrer nas populações de fungos dependendo do uso dos fungicidas, sendo assim, o monitoramento tem o papel de verificar se as estratégias anti-resistência estão sendo efetivas.

Figura 6. Sensibilidade a fungicida maxim, vitavax e folicur realizado com os isolados ICT 07 *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose do feijão-fava

Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em três diluições de maxim



Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em três diluições de vitavax



Percentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em três diluições de folicur

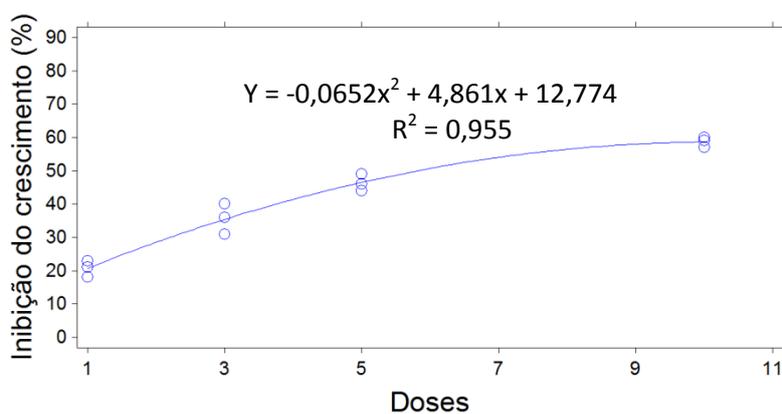


Tabela 6. Efeito do fungicida maxim na dose 5 μ L/100mL de AvA no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. agente causal da antracnose do feijão-fava.

Isolados	PCI^a	Amplitude
ICT 02	100 A	100 – 100
ICT 09	100 A	100 – 100
ICT 14	100 A	100 – 100
ICT 20	100 A	100 – 100
ICT 07	81,2 B	100 – 42,8
ICT 18	80,7 BC	100 – 60,7
ICT 17	64,5 C	70,2 – 58,3
ICT 12	64,4 D	100 – 48,6
ICT 08	63,0 D	100 – 53,2
ICT 16	63,0 D	77,5 – 53,3
ICT 05	61,7 D	63,5 – 56,8
ICT 13	60,9 D	72,3 – 54,4
ICT 01	59,4 D	69,4 - 53,6
ICT 06	58,8 D	67,2 – 52,9
ICT 15	58,7 D	63,7 – 53,3
ICT 04	57,4 D	60,5 – 55,1
ICT 11	57,4 D	60,3 – 54,8
ICT 10	57,3 D	67,1 – 46,6
ICT 03	55,4 D	63,5 – 43,9
ICT 19	54,8 D	100 – 38,5
C.V.	17.68	-

^aPIC = Percentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados meio AvA + maxim na dose de 5 μ L/100mL

FONTE: Autor, 2012.

Os resultados aqui relatados, além de demonstrar variação de populações de *Colletotrichum*, patogênicas a feijão-fava, em relação à sensibilidade ao maxim, sinalizam para outros aspectos práticos quanto à diagnose e ao controle do agente da antracnose. Esse fato reforça a ideia de que a caracterização morfológica, aliada à análise do genoma e sensibilidade a fungicidas são fundamentais para a identificação e caracterização de fungos fitopatogênicos.

5 CONCLUSÃO

Em relação às características morfológicas e culturais os resultados observados, demonstraram variação de populações de *Colletotrichum* patogênicas a feijão-fava.

A identificação genética utilizando os ITS 1 e ITS 4 não foi suficiente para separar as diferentes espécies dos isolados estudados e mostrou que há pequena variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum*.

Estudos utilizando outros marcadores moleculares fazem-se necessários para uma análise mais aprofundada da variabilidade genética dos isolados de *Colletotrichum* que infectam a cultura do feijão-fava no estado de Alagoas.

Sensibilidades ao maxim sinalizam para outros aspectos práticos quanto à identificação e diagnose do agente causal da antracnose.

REFERÊNCIAS

- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S.; (2003). Characterisation of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* v. **93**, p. 579–587.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Califórnia: Elsevier Academic Press. 5. ed, 2005. 952p.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- AZEVEDO, J.N.; FRANCO, L.J.D.; ARAÚJO, R.O.C. **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003. (Comunicado Técnico, 152). 4p
- BALARDIN, R. S. & RODRIGUES, J.C.V. Sensibilidade “in vitro” de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas sistêmicos e protetores. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p. 494-497, 1995.
- BAUDOIN, J.P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: GEPTS, P. (Ed.) **Genetic resources of Phaseolus bean**. Holland: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 393-407.
- BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. **Plant Disease**, St. Paulo, v.79, n.5. p.478-482, 1995
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), In: Kimati et al. **Manual de Fitopatologia v.2**. São Paulo: Ceres, 2005. p.333-349.
- BLACK, L.L.; GREEN, S.K.; HARTMAN, G.L. ; POULOS, J.M. **Pepper disease: a field guide**. Tainan: AVRDC, 1991, 98p.
- BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S. AND TINMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from Citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v.86, p. 523-52, 1996.
- BUENO, C. R. N. C. **Identificação e caracterização das espécies de Colletotrichum causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas**. 2005.

61 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. 2009, 69 f. Tese (Doutorado em Proteção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP.

CARVALHO, E. M. S.; CENTURION, M. A. P. C.; CARVALHO, P. R. S. A **Cultura do feijão-fava no meio-norte do brasil**. Cidade: Editora, 2010. p.191-203.

CHEN, L. -S., CHU, C., LIU, C. -D., CHEN, R.-S. AND TSAY, J.-G. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan, **J. Phytopathol.** v.154, p. 654-662, 2006.

CIAT. **Diversidad genética de las especies cultivadas del genero Phaseolus**. Cali: [s.n], 1980. 52p.

CORRELL, J.C., ROHOADS, D.D. AND GUERBER, J.C. (1993). Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms, DNA fingerprints, and randomly amplified polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. **Phytopathology**, v. 83, p.1199-1204.

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

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

DAMM U, CANNON PF, WOUDEBERG JHC, CROUS PW (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology** v. **73**, p. 37–113.

DOYLE J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p.11-15, 1997.

DEKKER, H. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: LYR, H. (Ed.). **Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action**. 2. ed. New York: Gustav Fisher, 1995. p. 23-38.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja região central do Brasil. **Sistema de Produção**, Londrina: EMBRAPA Soja, n.1, p.32, 2003.

FORTES, J.F. *Glomerella cingulata* e *Penicillium* sp: surgimento de cepas resistentes ao benomyl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.2, p.280, 1985

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

FREEMAN, S., MINZ, D., JURKEVITCH, E., MAIMON, M. AND SHABI, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, v. 90, p.608-614, 2000.

FREEMAN, S., PHAM, M. AND RODRIGUEZ, R.J. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A-T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. **Experimental Mycology**, v. 17, p. 309-322, 1993.

FORD, R., BANNIZA, S., PHOTITA, W. AND TAYLOR, P.W.J. Morphological and molecular discrimination of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on lentil in Canana. **Australasian Plant Pathology**. v.33, p. 559-569, 2004.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE): **Produção Agrícola Municipal – Cereais, Leguminosas e Oleaginosas**. Rio de Janeiro 2010, disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas>>. Acesso em 28 de outubro de 2011.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J. 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, n. 5, p. 872-895, 2003.

GILBERT, G.S. AND WEBB, C.O. Phylogenetic signal in plant pathogen-host range. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, n. 12, p. 4979-4983, 2007.

HARADA, M.; ISHIKAWA, S.; HIBI, T.; WATANABE, K. Anthracnose of *Enkianthus campanulatus* and *Rhynchosia acuminatifolia* caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (new occurrence). **Journal of General Plant Pathology**, v.74, p.341-343, 2008.

HODSON, A., MILL, P.R. AND BROWN, A.E. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum fragariae* in strawberry crowns. **Phytopathology**, v. 58, p. 540-541, 1993.

INDEX FUNGORUM. **Cabi Bioscience databases**. CABI, 2004. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 01 de Set. 2010.

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

KIMATI, H. Controle Químico. In: AMORIM, L. REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, Princípios e Conceitos. 4ª Ed, Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, cap. 16, p.343-365.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. Revisão Anual de Patologia de Plantas 9: 291-337. 2001.

LYMMAN, J. M. Adaptation studies on lima bean accessions in Colombia. **Journal of the American society for Horticultural Science**, v.108, n.3, p. 369-373, 1983.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D.J.; SANTOS, A.F.; VIDA, J.B. Caracterização morfofisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v.32, n.2, p.113-117, 2006.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D.J.; SANTOS, A.F, VIDA, J.B. Variabilidade patogênica e efeitos de carboidratos no crescimento micelial, esporulação e agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.18-21, 2008.

MARIGONI, A.C.; BARROS, E.M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v.28, n.2, p.197-200, 2002.

MAYONJO, D.M.; KAPOORIA, R.G. **Occurrence and variability of *Colletotrichum truncatum* on soybean in Zambia**. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, v.33, p.339-341, 2003.

MENDES, B. M. J.; BERGAMIN FILHO, A. Adaptação da técnica da cultura de folha destacada para a quantificação dos parâmetros epidemiológicos monocíclicos da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli* var. *typica*). **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.103-114, 1986.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, p. 57-66, 1976.

- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Fitopatologia Brasileira 27: S23-S24, 2002.
- MISHRA, A.; SIRADHANA, B. S. Studies on the survival of sorghum anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) pathogen. **Phillippine Agriculture**, v.62, p. 149-152, 1979.
- MILLS, R.R., SREENIVASAPRASAD, S. AND BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR RAPD bind patterns of *Colletotrichum* isolates from banana from Australia. **FEMS Microbiology Letter**, v. 98, p. 137-144, 1992.
- MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; AND SATO, T.; Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences **J. Gen. Plant Pathol.** v. 68, p. 307- 320, 2002.
- MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; (2009). *Colletotrichum echinochloae*, a new species on Japanese barnyard millet (*Echinochloa utilis*). **Mycoscience** v. **50**, p. 273–280.
- MÜNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D.S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H.B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p. 41- 51, 2008.
- MYLLYS, L.; STENROOS, S.; THELL, A. New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-tubulin genes. **Lichenologist**, v. 34, p. 237–246, 2002.
- NIREMBERG, H. I., FEILER, U. AND HAGEDORN, G. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in **Modern terms Mycologia**, v. 94, n. 2, p. 307-320, 2002.
- O'DONNELL K, CIGELNIK E (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. **7**, p. 103–116.
- O'DONNELL K, NIRENBERG HI, AOKI T, CIGELNIK E (2000). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience** v. 41, p. 61–78.
- OLIVEIRA, A. P.; ALVES, E. U.; ALVES, A. U.; DORNELAS, C. S. M.; SILVA, J. A.; PÔRTO, M. L.; ALVES, A. V. Produção de feijão-fava em função do uso de

doses de fósforo em um neossolo regolítico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 543-546, 2004.

PAULA JÚNIOR, T.J.; SILVA, M.B.; VIEIRA, R.F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, v.17, n.182, p.63-71, 1995.

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

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

RAMOS SOBRINHO, R. **Estrutura Genética de uma População do Begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) que Infecta Fava (*Phaseolus lunatus*L.) no Estado de Alagoas** 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Alagoas. Centro de ciências Agrária, Rio Largo. Al.

RACHIE, K. O.; SONG, L.; LYMAN, J. Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and its potential in the tropics. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. (Ed.) **Advances in legume science**. Kew: Royal Botanic Garden, 1980, p.375-381.

RIOS, G.P.; ANDRADE, E.M.; COSTA, J.L.S. Avaliação da resistência de cultivares do feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.128-132, 2001.

SALES JÚNIOR, R.; TORRES, G.R.C.; GUIMARÃES, I.M. Panorama da resistência a fungicidas no gênero *Colletotrichum*. In: Workshop Regional Sobre *Colletotrichum*, 1., 2007, Recife. **Colletotrichum' 2007...** Recife, 2007. 1 CD-ROM.

SHABI, E., KATAN, T., GERA, H. & ELISHAS, S. Taxonomic determination of pathogenic *Colletotrichum gloeosporioides* of almond, anemone and avocado according to fungicide sensitivity. **Phytoparasitica**, v.21, p.130-131, 1994.

SHERRIFF, C., WHELAN, M.J., ARNOLD, G.M., LAFAY, J.F., BRYGOO, Y. AND BAILEY, J. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, v.18, p.121-138, 1994.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n.2, p.113-120, 2008.

SILVA, K. J. D. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**: UFLA, 2004. 86f. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, MG.

SCHMITT, I.; CRESPO, A.; DIVAKAR, P. K.; FANKHAUSER, J. D.; HERMAN-SACKETT, E.; KALB, K.; NELSEN, M. P.; NELSON, N. A.; RIVAS-PLATA, E.; SHIMP, A.D.; WIDHELM, T.; LUMBSCH, H.T. **New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics**. *Persoonia*, Leiden, v. 23, p. 35-40, 2009.

SREENIVASAPRASAD S, MILLS PR, MEEHAN B M, BROWN AE (1996). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome** v. 39, p. 499–512.

SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. AND MILLS, P.R. (1993). Coffee brown disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, 1997, p. 995-1000.

STEPHENSON SA, GREEN JR, MANNERS JM, MACLEAN DJ (1997). Cloning and characterisation of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*. **Current Genetics** v. 31, p. 447–454.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. 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.

TALHINHAS, P. et al. Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum acutatum* causin anthracnose of luppins . **Phytopathology**, v. 92, p. 986-996, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2007.

TAMURA K, NEI M. 'Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees'. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p. 512–526, 1993.

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

TEMPLETON, M.D; RIKKERINK, E. H. A; SOLON, S. L; CROWHURST RN. (1992). Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene** v. **122**, p. 225–230.

THOMPSON, F.L., OLIVEIRA, V. M.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; INÁCIO, C. A.; SELEGHIM, M. H. R. Taxonomia Microbiana. In: CANHOS, V. P.; PEIXOTO, A. L.; MARIONONI, L.; VAZOLLER, R. F.; CANHOS, D. A. L. (eds.). Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. CRIA, p. 31, 2006.

TOMIOKA, K.; MORIWAKI, J.; SATO, T. Anthracnose of *Polygonatum falcatum* caused by *Colletotrichum dematium*. **Journal General Pathology**, v. 74, n.5, p. 402-404, 2008.

TOZZE JÚNIOR, H.; MELLO, M.B.A. & MASSOLA JÚNIOR, 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.

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

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização tradicional de espécies de *Colletotrichum*. In Workshop Regional Sobre *Colletotrichum*, 1., 2007, Recife. **Colletotrichum’ 2007...** Recife, 2007. 1 CD-ROM.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n. 174, p. 30-37, 1992.

VIEIRA, C. Leguminosas de grãos: importância econômica na agricultura e na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. v.16, n.174, p. 5-11, 1992.

VINNIERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive Summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science ad Technology**, Uppsala, v. 917, 2004. 72 p. Disponível em: <http://www.divaportal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902-1__fulltext.pdf>. Acesso em: 12 set. 2009.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR JW. (1990). 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: p. 315–322.

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

ZAUMEYER, W. J.; THOMAS, H. R. **Monographic study of bean diseases and methods for their control.** Washington: US-DA, 1957, 255p. (USDA. Tech. Bul., 868).