

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – MESTRADO EM PRODUÇÃO
E PROTEÇÃO VEGETAL**

SANDRA HIROMI KAMEI

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE
Colletotrichum ASSOCIADAS À ANTRACNOSE DE ANONÁCEAS NO
ESTADO DE ALAGOAS**

**RIO LARGO
2011**

SANDRA HIROMI KAMEI

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE
Colletotrichum ASSOCIADAS À ANTRACNOSE DE ANONÁCEAS NO
ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção e Proteção Vegetal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Iraíldes Pereira Assunção

Coorientador: Prof. Gaus Silvestre de Andrade Lima

**RIO LARGO
2011**

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

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

- K15c Kamei, Sandra Hiromi.
 Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas / Sandra Hiromi Kamei. – 2011. 63 f.: il, graf., tab.
- Orientadora: Iraíldes Pereira Assunção.
Coorientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.
Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2011.
- Bibliografia: f. 53-63.
1. Colletotrichum. 2. Antracnose. 3. Anonáceas. 4. Caracterização genética.
I. Título.

CDU: 632.4:634.41

TERMO DE APROVAÇÃO

SANDRA HIROMI KAMEI
Matrícula Nº: 09230018

CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS À ANTRACNOSE DE ANONÁCEAS NO ESTADO DE ALAGOAS

Dissertação aprovada em 06 de dezembro de 2011, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção e Proteção Vegetal do Curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas, pela seguinte banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Iraíldes Pereira Assunção
(Orientadora/CECA – UFAL)

Dr. Jean Herllington Araújo Monteiro
(Bolsista DCR/CNPq/CECA – UFAL)

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
(CECA – UFAL)

Prof. Dr^a. Maria de Fátima Silva Muniz
(CECA – UFAL)

*A Antônio de Souza Júnior, com veemência,
pela ajuda e incentivo preciosos, sem os
quais este trabalho não seria possível.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), ao Centro de Ciências Agrárias (CECA) a todos os professores da pós-graduação. Juntos, foram fundamentais por mais uma etapa em minha formação acadêmica. Ainda, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof^ª. Dr^ª. Iraíldes Pereira Assunção, que me aceitou como sua orientanda e acreditou, depositando confiança para a realização deste trabalho.

Aos professores doutores Gaus Silvestre de Andrade Lima, Eurico Eduardo Pinto de Lemos e Maria de Fátima Silva Muniz, que me ajudaram quando precisei, sempre com boa vontade e simpatia.

Ao Dr. Jean Herllington Araújo Monteiro. Foram incontáveis as dúvidas explicadas, sempre com boa vontade. Seu peculiar conhecimento aumentou meu entusiasmo e admiração pelos fungos.

À doutoranda Jaqueline Figueiredo de Oliveira Costa, por sua ajuda inestimável na maior parte dos experimentos. E ainda à doutoranda Edlene Maria da Silva Moraes, por sua contribuição e ensinamentos preciosos na reta final deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia Molecular. Agradeço aos graduandos Aline Marques Melo, Maria Helloá Costa de Oliveira, Mayra Machado de Medeiros Ferro, Érika Cristina Souza da Silva Correia e Arthur Alencar Raposo Tenório, à doutoranda Liliane Dias do Nascimento e à mestranda Marília Gracelídia dos Santos Barros, pela troca de experiências e grande ajuda.

Ao pessoal da Clínica de Diagnose de Doenças de Plantas que sempre me recebeu com simpatia. Agradeço em especial ao doutorando Wellington Costa da Silva, ao mestrando Frederico Monteiro Feijó e ao graduando Antônio Duarte do Nascimento.

À mestranda Rosângela da Silva Lima e ao graduando Lamartine Silva Ferreira Júnior.

Ao professor Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) e aos seus orientandos pela disponibilidade de me receber e ajudar em parte de meus experimentos.

Aos proprietários e funcionários das culturas em questão por permitirem que as coletas fossem realizadas.

Agradeço à minha família e ao amado Antônio de Souza Júnior, que, por todos esses anos, construíram a base sobre a qual estou e pelos quais tenho profunda admiração e amor. A vocês que nunca mediram esforços e nunca hesitaram em ajudar, sempre me confortando com agradável companheirismo, compreensão e ajuda preciosa.

A todos meus amigos, meus companheiros, pelos momentos compartilhados de descontração e apoio em assuntos da vida e acadêmicos. E especialmente à Inaura Patrícia da Silva Santos e Wagner Teixeira Soriano por seus esforços inestimáveis.

Aos colegas de turma e àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do CECA-UFAL por sempre se mostrarem solícitos e prestativos.

*“A admiração permanece inalterada,
apenas a nossa coragem aumenta para compreender o admirável.”*

Niels Bohr

RESUMO

A antracnose é uma importante doença das anonáceas, causada principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides*. Recentes trabalhos na Colômbia e no México identificaram *C. acutatum* infectando a gravioleira, e *C. fragariae* e *C. orbiculare* em frutos de cherimóia. Assim, o objetivo do trabalho foi identificar possíveis associações de espécies de *Colletotrichum* infectando a cultura da pinha e da graviola no estado de Alagoas. Colônias monospóricas de *Colletotrichum*, obtidas de folhas apresentando sintomas típicos da doença, foram coletados nos municípios de Maceió, Palmeira dos Índios e União dos Palmares. Os isolados foram caracterizados morfológicamente através de conídios e apressórios, coloração da colônia, velocidade de crescimento micelial em BDA, análise das sequências da região ITS do rDNA e teste de patogenicidade. Cinquenta e um isolados, escolhidos de acordo com os resultados da caracterização morfológica, cultural e molecular, foram patogênicos quando inoculados em folhas destacadas de pinha e graviola. De acordo com as características culturais os isolados foram separados em quatro grupos distintos: G-A, G-B, G-C e G-D. O G-A foi formado por dezesseis isolados, o G-B com vinte e um isolados, o G-C com quatro isolados e o G-D com dez isolados representando 30%, 43 %, 8% e 19% do total de isolados, respectivamente. Na caracterização morfológica, os isolados foram agrupados em três grupos distintos: A, B e C. O G-A foi formado por trinta e dois isolados, que apresentaram características típicas de *C. gloeosporioides*. O G-B com quinze isolados, apresentou características de *C. boninense*. E o G-C agrupou quatro isolados com características semelhantes às da espécie *C. fragariae*. Com base no sequenciamento do rDNA, os isolados apresentaram identidade de 99 a 100% com as espécies de *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *Glomerella magna*. Uma árvore filogenética foi construída a partir das sequências do rDNA. Os isolados separam-se por similaridade genética em três grupos distintos (G-I, G-II e G-III), com as diferentes espécies de *Colletotrichum*. O G-I agrupou os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*. Vinte e oito isolados apresentaram similaridade com *C. gloeosporioides* e apenas cinco isolados com *C. fragariae*. O G-II agrupou quatorze isolados, todos geneticamente relacionados com *C. boninense*, a segunda espécie mais frequente. O G-III agrupou quatro isolados, os quais estão relacionados filogeneticamente com a espécie *G. magna*. A heterogeneidade encontrada na coloração das colônias dos cinquenta e um isolados não permitiu uma identificação confiável. Entretanto, as características morfológicas contribuíram para a identificação da maioria deles, corroborando com os dados do sequenciamento da região do rDNA. Assim, de acordo com resultados obtidos neste estudo, foi possível comprovar que pelo menos quatro espécies de *Colletotrichum* são responsáveis por causar antracnose em pinha e graviola no estado de Alagoas: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *G. magna*, sendo relatada pela primeira vez a ocorrência das três últimas nessas culturas.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Colletotrichum boninense*. *Colletotrichum fragariae*. *Glomerella magna*. Pinha. Graviola. rDNA, Região ITS.

ABSTRACT

Anthrachnose is an important disease of Annonaceae, mainly caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Recent work in Colombia and Mexico identified *C. acutatum* infecting the soursop, and *C. fragariae* and *C. orbiculare* in cherimoya fruit. The objective of the study was to identify possible associations of species of *Colletotrichum* infecting the culture of pineapple and guanabana in the state of Alagoas. Single spore colonies of *Colletotrichum* obtained from leaves displayed typical symptoms of the disease were collected in the municipalities of Maceió, Palmeira dos Índios and União dos Palmares. The isolates were characterized morphologically by conidia and appressoria, staining of the colony, mycelial growth rates in BDA, sequence analysis of the rDNA ITS region and pathogenicity test. Fifty-one isolates, chosen according to the results of morphological, cultural and molecular, were pathogenic when inoculated on detached leaves of sugar apple and soursop. According to the cultural characteristics of the isolates were separated into four distinct groups: A, B, C and D. The G-A was formed by sixteen isolated, G-B twenty-one isolates, G-C and G-D four isolates with ten isolates representing 30%, 43%, 8% and 19% of the isolates, respectively. In morphology, the isolates were grouped into three groups: A, B and C. The G-A was formed by thirty-two isolates, which showed typical features of *C. gloeosporioides*. The GB with fifteen isolates showed characteristics of *C. boninense*. And the G-C grouped four isolates with similar characteristics to the species *C. fragariae*. Based on the sequence of rDNA identity of these isolates showed 99 to 100% with the species *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* and *Glomerella magna*. A phylogenetic tree was constructed from sequences of rDNA. The isolates are separated by genetic similarity into three distinct groups (GI, GII and G-III), with the different species of *Colletotrichum*. The G-I grouped the isolates of *C. gloeosporioides* and *C. fragariae*. Twenty-eight isolates showed similarity to *C. gloeosporioides* and only five isolates with *C. fragariae*. The G-II grouped fourteen isolates, all genetically related *C. boninense*, the second most common species. The G-III grouped four isolates, which are phylogenetically related to the species *G. magna*. The heterogeneity found in the coloration of the colonies of the fifty-one isolates did not allow a reliable identification. However, the morphological characteristics contributed to the identification of most of them, confirming the sequence data of the rDNA region. Thus, according to results obtained in this study, we demonstrate that at least four species of *Colletotrichum* are responsible for causing anthracnose on sugar apple and soursop in the state of Alagoas: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* and *G. magna*, as first reported occurrence of the last three in these cultures.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Colletotrichum boninense*. *Colletotrichum fragariae*. *Glomerella magna*. Sugar Apple. Soursop. rDNA. ITS region.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Folhas de graviola (a) e pinha (b) apresentando lesões típicas de antracnose.....	26
Figura 2 – Mapa de Alagoas indicando os municípios onde as coletas foram realizadas.....	26
Figura 3 – Folhas apresentando lesões necróticas observadas no 14° dia. Folha de pinha com ferimento (a) e sem ferimento (b), e folha de graviola com ferimento (c) e sem ferimento (d)	32
Figura 4 – Aspecto das colônias de <i>Colletotrichum</i> e seu reverso, observadas ao 5° dia, cultivadas em meio BDA, sob temperatura de 25±1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Isolados: G9M (a), P1P (b), G8M (c), P5P (d), P10P (e), P2U (f), G1M(g), G10U (h), G8U (i), G4P (j), P5U (k) e P4U (l)	33
Figura 5 – Aspectos morfológicos dos conídios de diferentes isolados apresentado características semelhantes às espécies <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (a), <i>C. boninense</i> (b) e <i>C. fragariae</i> , em menor e maior detalhe (c)	38
Figura 6 – Filogenética construída com base em fragmentos de sequências de rDNA (ITS4 e ITS5), utilizando o método deneighbor-joining. Uma análise de bootstrap foi feita com 1000 repetições	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Procedência, data da coleta de espécies de <i>Colletotrichum</i> isolados de folhas de pinha e graviola	24
Tabela 2 –	Dados das características culturais dos isolados de <i>Colletotrichum</i> , referentes à velocidade de crescimento micelial (VCM), classificação quanto ao grupo de coloração, coloração das colônias e aspecto do micélio aéreo	36
Tabela 3 –	Médias de comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência de formatos de conídios dos isolados de pinha e graviola	41
Tabela 4 –	Médias de comprimento, largura e frequência de formatos de apressórios dos isolados de pinha e graviola	43
Tabela 5 –	Dados referentes à identificação molecular dos isolados quando comparadas suas sequencias com as do banco de dados do Genbank	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Considerações gerais sobre as anonáceas	15
2.2 Principais espécies do gênero <i>Annona</i>: pinha e graviola	16
2.2.1 A cultura da pinha	16
2.2.1.1 Aspectos botânicos da pinheira	17
2.2.2 A cultura da graviola	18
2.2.2.1 Aspectos botânicos da gravioleira	19
2.2.3 Aspectos fitossanitários da pinheira e gravioleira	20
2.3 A Antracnose	20
2.4 Identificação de espécies de <i>Colletotrichum</i>	21
3 METODOLOGIA	24
3.1 Obtenção, teste de patogenicidade e preservação dos isolados	24
3.2 Caracterização cultural	27
3.3 Caracterização morfológica	28
3.4 Caracterização molecular	29
3.4.1 Extração de DNA	29
3.4.2 Amplificação do rDNA e purificação dos produtos da PCR	30
3.4.3 Sequenciamento da região ITS e análise filogenética dos isolados	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Teste de patogenicidade	32
4.2 Caracterização cultural	32

4.3 Caracterização morfológica	38
4.4 Caracterização molecular	45
4.5 Distribuição, frequência e considerações dos resultados sobre <i>Colletotrichum</i> spp. na população de pinha e de graviola	50
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

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 (KAVATI, 1992), como Chile, México, Venezuela e Austrália. Compreende cerca de 132 gêneros e 2500 espécies (JESSUP, 1988; SAUQUET et al., 2003), das quais aproximadamente 250 ocorrem no Brasil. Os gêneros mais importantes são *Rollinia* e *Annona*, com destaque maior para este último que agrupa as principais espécies cultivadas.

A maioria tem origem tropical, como o gênero *Annona*, com exceção da cherimóia (*Annona cherimola* Mill.), de origem dos altiplanos andinos. Foram introduzidos no Brasil pelo Conde de Miranda, em 1626 (LOPEZ, 2005). 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.) (SÃO 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). No Nordeste, a Bahia é o principal produtor, seguido de Pernambuco e Alagoas, com plantios irrigados com bom nível tecnológico.

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, apresentam conteúdo de gordura muito baixo e conteúdo nulo de colesterol.

A produção para a comercialização no Brasil tem sido uma importante alternativa do agronegócio (SÃO 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 (NEVES, 1997) e impedindo maiores valores no mercado interno.

As culturas de pinha e graviola no Brasil estão sujeitas a várias doenças, sendo a antracnose aquela que causa os maiores prejuízos. 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.

O principal agente da antracnose das anonáceas, *Colletotrichum gloeosporioides*, além de infectar anonáceas, prejudica também uma ampla gama de hospedeiros, tanto em pré quanto em pós-colheita (DODD et al., 1992; BENATO, 1999; PERES et al., 2002), porém existem várias populações específicas a um hospedeiro, o que pode significar a existência de mais de uma espécie.

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 a identificação, através de técnica de sequenciamento da região ITS do rDNA, de espécies de *Colletotrichum* e caracterização morfológica e cultural destes fitopatógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre as anonáceas

Annonaceae é a principal família de Magnoliales e apresenta cerca de 132 gêneros e 2500 espécies (JESSUP, 1988; SAUQUET et al., 2003) de arbustos, arvoretas e árvores. No entanto, apenas os gêneros *Annona*, *Rollinia* e *Albernonia* produzem frutos comestíveis (MANICA et al., 2003). Os dois primeiros têm maior importância comercial.

As anonáceas, nome genérico utilizado para se referir às plantas da Família Annonaceae, apresentam distribuição pantropical, apesar de ser mais encontrada em clima tropical, por vezes 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, as anonáceas apresentam boa adaptação à diversidade climática, podendo ser encontrados pomares comerciais em todas as regiões do país (VIANA, 2005).

O gênero *Annona* engloba espécies com características morfológicas muito distintas. Assim, a fim de facilitar o estudo, Safford, em 1914, propôs a divisão deste gênero em cinco grandes grupos: Pilaeflorae, Acutifloarae, Annonellae, Guanabani e Attae. Os dois últimos são os mais importantes.

A pinha (*A. squamosa* L.) e a graviola (*A. muricata* L.) são as espécies mais cultivadas no Brasil, por serem frutos muito saborosos e comercialmente aceitáveis. Outros representantes de relevância são a cherimólia (*A. cherimola* Mill.), a condessa (*A. reticulata* L.), a atemóia (*A. cherimola* L. x *A. squamosa* L.), a cabeça-de-negro (*A. coriaceae*), o araticum-do-campo (*A. dióica*), o araticum-do-brejo (*A. paludosa*) e a ilama ou papausa (*A. diversifolia*) (MANICA et al., 2003).

Devido ao alto valor no mercado nacional e internacional, o plantio de anonáceas tem aumentando significativamente, tanto no Brasil como em outros países, pertencendo a um grupo de produtos com potencial de crescimento de consumo, ainda barrado pela pouca oferta (MELLO et al., 2003). Algumas dificuldades são encontradas, como: planejamento das práticas das culturas, melhoramento de tecnologias de produção e pós-colheita dos frutos, e adoção de estratégias de mercado. Em novembro de 2003, em Itaberá no Estado de São Paulo,

foi fundada a Associação Brasileira dos Produtores de Anonáceas (ABPA), a fim de congregar e orientar os produtores para o fortalecimento da classe.

2.2 Principais espécies do gênero *Annona*: pinha e graviola

Os maiores representantes do gênero *Annona* pertencem aos grupos Guanabani e Attae. A graviola pertence ao primeiro, também conhecido como grupo das graviolas, ao qual também pertencem o araticum-do-brejo (*A. glabra*), e o araticum-das-montanhas (*A. montana*). Já a pinha encontra-se no segundo, ou grupo das anonas comuns, juntamente com outras espécies de destaque comercial, como a cherimólia (*A. cherimola*), a condessa (*A. reticulata*) e a atemóia (*A. cherimola* x *A. squamosa*) (DONADIO, 1997).

2.2.1 A cultura da pinha

A pinha é originária da América tropical, na Ilha da Trindade e nas Antilhas. O Conde Diogo Luiz de Miranda foi o responsável pela introdução do fruto no Brasil em 1926, motivo pelo qual também é conhecida como fruta-do-conde (CORDEIRO et al., 2000). Outros nomes populares brasileiros: ata, anona, araticum. 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 pinha é geralmente consumida ao natural. Ainda, dos frutos também podem ser obtidos sucos, doces e sorvetes. A polpa também é usada na fabricação de bebidas fermentadas (LEAL, 1990). Na medicina popular, as folhas, sementes, frutos, casca e raízes são utilizadas no preparo de chás, sucos, decocção da fruta, macerado das sementes e consumo direto da fruta, no tratamento de anemia, diarreia, colite, desnutrição, convulsões, verminose, reumatismo, furúnculos, úlceras, etc.

Apesar de não ter sido comprovada eficácia como anticonvulsivante, estudos comprovaram ação positiva antiparasitária contra helmintos das espécies *Ascaridia galli* e *Ancylostoma caninum* (NETTO JÚNIOR et al., 2006) e os protozoários *Leishmania donovani* (RAYNAUD-LE GRANDIC et al., 2004) e *Plasmodium falciparum* (RAKOTOMANGA et al., 2004). Também foram comprobatórios os efeitos citotóxicos potencial da acetogenina contra células tumorais prostáticas (HOPP et al., 1996), hipoglicemiante e antioxidativo,

como depurador de radicais livres (SHIRWAIKAR et al., 2004). Entretanto, novos estudos químicos e farmacológicos devem ser realizados para comprovar a eficácia e segurança terapêutica dessas substâncias como medicamento (NETTO JÚNIOR et al., 2006).

O mercado da pinha é abastecido principalmente pelos Estados da Bahia, maior produtor, e São Paulo. Do total plantado no Brasil (10500 hectares), cerca de 7100 hectares ficam na Bahia (SEAGRI, 2007). O cultivo é ainda encontrado em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Pará, Alagoas, Pernambuco e Ceará (CORDEIRO, 2000). No entanto, somente o nordeste produz 70% do total.

Em Alagoas a produção, encontra-se principalmente na Zona do Agreste e Sertão onde se estima que existam mais de 2000 hectares da cultura (OLIVEIRA et al., 2005). Destaque para os municípios de Palmeira dos Índios, Estrela de Alagoas e Igaci, onde os solos e a pluviosidade (800-1200 mm/ano) com período seco são favoráveis ao desenvolvimento e à alta produção. O cultivo expandiu-se também para Coruripe, Feliz Deserto e Arapiraca (CAMPOS, 2002).

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

2.2.1.1 Aspectos botânicos da pinheira

Árvore de pequeno porte, com até 5 m de altura, e muito ramificada. 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).

A pinha é um fruto do tipo sincarpo arredondado ou baga composta, ovóide, esférica ou cordiforme. Possui de 5 a 13 cm de diâmetro e é formado geralmente por carpelos destacados. A polpa tem coloração branca ou creme e envolve individualmente as numerosas sementes de coloração preta brilhante ou castanha-clara, com forma elíptica, e que medem de 1,4 a 2,3 cm de comprimento por 0,8 a 1,2 cm de largura (MANICA et al., 2003).

2.2.2 A cultura da graviola

A gravioleira é uma planta originária da América Central e dos Vales Peruanos. Os espanhóis foram os responsáveis por sua distribuição em várias regiões tropicais do mundo (PINTO & SILVA, 1995). No Brasil, o fruto foi introduzido pelos portugueses no século XVI. A cultura se espalhou, sendo atualmente encontrada em quase todos os estados brasileiros, com exceção da região Sul, devido ao clima mais frio (PINTO et al., 2005), já que a planta é mais adaptada às regiões semiáridas.

O fruto possui vários nomes populares no Brasil, sendo conhecida também como jaca-de-pobre, jaca-do-pará, coração-de-rainha, araticum manso. Em outros países é conhecida como *soursop*, na língua inglesa, *guanabano*, no idioma espanhol e *corossolier* ou *grand corossol*, em francês.

O fruto é utilizado geralmente na produção de sucos naturais ou para o processamento industrial, na produção refrescos, sucos concentrados, polpas congeladas, néctares, sorvetes, geleias, cremes e bebidas lácteas (MANICA et al., 2003). É aproveitada das mais diversas formas, tanto na medicina homeopática, como na culinária caseira (BATISTA et al., 2003). Além do fruto, da raiz, casca e folhas são feitos aplicados chás, sucos, emplastos e banhos, no tratamento de inflamação de dentes, diarreia, doenças de estômago, varizes, calmante, diabetes, câncer, emagrecimento, etc.

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. Os resultados não confirmaram as ações popularmente atribuídas. Outras pesquisas estão sendo realizadas devido à presença de acetogeninas, usada no tratamento do câncer. 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, 2006).

Os países produtores 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, destaque para a região Nordeste, maior produtora, responsável por cerca de 90% do total (PINTO et al., 2005).

Atualmente, de acordo com a Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (Adab) (2011), o Estado é o maior produtor mundial de graviola, com 9000 toneladas/ano,

onde se encontra 85% da área cultivada no Brasil (SEAGRI, 2011). Anteriormente este posto era ocupado por Venezuela, Colômbia e o Estado de Ceará (SEAGRI, 2010). Também podem ser citadas áreas de plantio nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Pará, Paraíba e Minas Gerais (LIMA, 2004). Entretanto, apesar da 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 da zona da mata e agreste (ALBUQUERQUE, 1997).

2.2.2.1 Aspectos botânicos da gravioleira

A gravioleira é uma planta de porte alto, 4 a 8 m de altura quando adulta, com abundante sistema radicular, o que a torna uma planta facilmente adaptável aos mais variados tipos de solo. É pouco exigente quanto à fertilidade, embora solos profundos com boa aeração, bem drenados e com pH variando entre 6 a 6,5 sejam os que mais favorecem a fruteira. A faixa ideal para seu pleno desenvolvimento está compreendida entre 21°C a 30°C (RAMOS et al., 2001).

O caule é único com ramificação assimétrica. Possuem folhas com pecíolo curto, e são do tipo oblongo-lanceoladas ou elípticas, medindo cerca de 6 a 18 cm de comprimento e 5 a 7 cm na maior largura, com nervuras pouco perceptíveis (MANICA et al., 2003). As flores são globosas, com 6 pétalas, de coloração verde escura na fase juvenil passando a verde clara na fase de frutificação. Podem estar solitárias ou agrupadas surgindo diretamente no tronco ou distribuídas em pedúnculos curtos e axilares. Os estames são numerosos, em forma de escudo, unidos abaixo; anteras paralelas e abertura longitudinalmente; estigmas pegajosos.

O fruto da graviola é grande, uma baga composta ou sincarpo, cujo peso oscila de 0,4 a 10 Kg ou mais, com comprimento de até 30 cm por 20 de diâmetro. Seu formato é caracteristicamente cordiforme, podendo variar como redondo ou angular (PINTO & SILVA, 1995). A casca é delgada, com aparência reticulada com coloração verde-escura, quando os frutos estão em desenvolvimento, mudando para verde-clara brilhante, quando maduros. Possui espículas carnosas, moles e recurvadas. A polpa é branca, formando gomos, muito sucosa e subácida. Contém boa quantidade de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas C e B, potássio, cálcio, ferro e fósforo (ABPA, 2007). As sementes geralmente são de coloração

preta, quando retiradas do fruto, ficando marrom-escuras a marrom-claras ou castanhas, após alguns dias fora deste. Medem entre 1 e 2 cm de comprimento (PINTO & SILVA, 1995).

2.2.3 Aspectos fitossanitários da pinheira e da gravioleira

Os maiores problemas para essas culturas são relativos à fitossanidade. Inúmeras doenças e pragas podem afetar as folhas, ramos, raízes, flores e frutos da gravioleira e da ateira, bem como das demais anonáceas, em diferentes etapas do seu desenvolvimento.

As principais doenças que acometem a pinheira são a antracnose, podridão-das-raízes, pinta-preta, podridão-seca ou podridão-seca-das-hastes, podridão-dos-frutos, murcha-de-phytophthora, cancrose, queima-do-fio e rubelose (FREIRE & CARDOSO, 1997). Também pode sofrer infestação de várias espécies de nematóides e ser atacada por pragas, sendo as mais importantes a broca-dos-ramos, broca-dos-frutos, cochonilha-de-cera, cochonilha-branca, broca-do-coleto, mosca-branca e ácaro-vermelho (MORALES & MANICA, 1994).

Na gravioleira, as doenças mais comuns são a antracnose, podridão-seca, murcha-de-phytophthora, mancha-zonada, mancha-de-cercospora, mancha-de-alga e mancha-amarela-da-gravioleira (CARDOSO et al., 2002). Em relação às pragas, as mais comuns são a broca-dos-frutos, broca-das-sementes, broca-do-tronco, broca-do-ramo, broca-do-coleto, soldadinho, cochonilha-parda, cochonilha-de-cera, cochonilha-escama-farinha, minador-das-folhas, lagarta-pintada, lagarta-das-folhas, cigarrinha-verde, pulgão, *Enchenopa* sp., irapuá e serra-pau (BLEICHER & MELO, 2002)

2.3 A antracnose

A antracnose é uma enfermidade fúngica causada principalmente por espécies do gênero *Colletotrichum* Corda 1831, as quais pertencem à Ordem Coelomicetos, Classe Melanconiales e Família Melanconiaceae. Compreende várias espécies, podendo o patógeno incidir sobre ramos, gavinhas, folha, caule e flores, causando enormes prejuízos (MENEZES, 2002). Sua maior ocorrência é observada em regiões tropicais e subtropicais, com maior severidade em condições chuvosas, alta umidade e temperatura variando de 22 a 28°C.

Infectam uma ampla gama de hospedeiros, sendo reportados como a principal causa de perdas de produção no mundo, tanto em pré-colheita como em pós-colheita (DODD et al., 1992; BENATO, 1999) de diversos cultivos de leguminosas, cereais, hortaliças e diversas frutas (SERRA et al., 2008) como amêndoa, pêssego, pecã, maçã, morango, abacate, entre outros (FITZELL, 1987; HOWARD et al., 1992; BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG & HARTIN, 1997; FREEMAN & KATAN, 1997).

Em plantações comerciais de anonáceas, somente a espécie *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Sacc. 1882 [Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk 1903] tem sido relatada como a responsável por causar antracnose no Brasil (FREIRE & CARDOSO, 1997) e na América do Sul (ÁLVAREZ et al., 2004). No entanto, no México, foram encontrados isolados de *C. fragariae* e *C. orbiculare* em frutos de cherimólia (VILLANUEVA-ARCE et al., 2005; 2008), e na Colômbia, *C. acutatum* foi isolado de frutos de graviola (ÁLVAREZ et al., 2004). Assim, o mesmo pode ocorrer no Brasil.

Algumas espécies são mais específicas a um determinado hospedeiro, como por exemplo, *C. lindemuthianum* em leguminosas e *C. musae* em bananeira. 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).

Diante da importância de ser responsável por causar de 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 de suas populações (PERES et al., 2005) para escolher medidas de controle adequadas.

2.4 Identificação de espécies de *Colletotrichum*

A diferenciação de *Colletotrichum* spp. tem sido baseada tradicionalmente em caracteres morfológicos e culturais, observando-se semelhanças de tamanho e formato dos conídios, características de suas colônias (coloração, taxa de crescimento, presença de

microescleródios), morfologia do apressório e especificidade do hospedeiro (SMITH & BLACK, 1990). Muitas vezes essas características são utilizadas para diferenciar espécies bastante próximas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998).

Entretanto, elucidações sobre a sistemática deste gênero são improváveis quando realizadas apenas nos caracteres morfológicos. A variabilidade dos isolados de *Colletotrichum*, especialmente *C. gloeosporioides*, sugere a existência de grupos de especialização patogênica e, em vários casos, espécies que foram descritas por métodos morfométricos clássicos têm recebido a denominação de espécies coletivas por serem geneticamente heterogêneas e não formarem grupos monofiléticos (MUNIZ et al., 1998).

Muitas dificuldades são encontradas para a identificação correta do agente etiológico devido à grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos, mostrando a alta complexidade deste gênero (LOPEZ, 2001).

Apesar dessa grande variabilidade de espécies de *Colletotrichum* ter sido demonstrada por diversos autores (FREEMAN et al., 2001; AFANADOR-KAFURI et al., 2003), novas descrições de espécies não têm sido feitas, o que tem causado grandes problemas, principalmente para os fitopatologistas que procuram adotar estratégias de controle de doenças.

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 (FIGUEIREDO et al., 2003), 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.

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 ITS (*Internal Transcribed Spacer*), o ITS1 e o ITS2. 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. As regiões ITS

são consideravelmente mais variadas e, portanto, mais apropriadas para distinguir espécies relacionadas ou até mesmo linhagens intraespecíficas. (FUNGARO, 2000).

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, CaInt2/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).

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 (MUNIZ et al., 1998; FURTADO et al., 1999; PERES et al., 2002).

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL), no período de novembro de 2009 a julho de 2011. Os estudos envolveram as seguintes etapas:

3.1 Obtenção, teste de patogenicidade e preservação dos isolados

Entre o período de novembro de 2009 a novembro de 2010, cinquenta e um isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos de folhas jovens de pinha e graviola apresentando sintomas típicos de antracnose (Tabela 1; Figura 1). As coletas foram realizadas em áreas produtoras alagoanas, nos municípios de Maceió, Palmeira dos Índios e União dos Palmares (Figura 2). As coordenadas geográficas das plantas foram obtidas através de aparelho portátil de posicionamento global (GPS).

Tabela 1 – Procedência, data da coleta e hospedeiro original dos isolados de *Colletotrichum* de anonáceas utilizados no estudo.

(continua)

Isolado	Hospedeiro	Procedência	Coleta	Georreferência
P1U	pinha	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'16.5" W 36°00'10.1"
P2U	pinha	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'15.9" W 36°00'11.1"
P4U	pinha	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'15.8" W 36°00'10.0"
P5U	pinha	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'15.7" W 36°00'09.3"
P6U	pinha	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'16.5" W 36°00'09.3"
P7U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.6" W 36°00'09.0"
P8U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.9" W 36°00'09.5"
P9U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.9" W 36°00'09.8"
P10U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.8" W 36°00'10.1"
P11U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.7" W 36°00'10.2"
P12U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.5" W 36°00'10.1"
P13U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.1" W 36°00'10.1"
P15U	pinha	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'16.0" W 36°00'10.7"
P1P	pinha	Palmeira dos Índios	13/11/2009	S 9°27'52.7" W 36°37'15.3"
P3P	pinha	Palmeira dos Índios	13/11/2009	S 9°27'52.6" W 36°37'14.0"
P5P	pinha	Palmeira dos Índios	13/11/2009	S 9°27'52.8" W 36°37'12.4"

Tabela 1 – Procedência, data da coleta de espécies de *Colletotrichum* isolados de folhas de pinha e graviola.

(conclusão)

Isolado	Cultura	Procedência	Coleta	Georreferência
P6P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'52.9" W 36°37'12.2"
P7P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'52.5" W 36°37'11.8"
P9P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'50.8" W 36°37'12.1"
P10P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'48.7" W 36°37'15.6"
P11P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'48.3" W 36°37'16.7"
P12P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'49.3" W 36°37'16.9"
P13P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'50.0" W 36°37'16.4"
P14P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'51.0" W 36°37'16.1"
P15P	pinha	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'51.7" W 36°37'15.9"
G1M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'24.1" W 35°41'44.0"
G2M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'22.9" W 35°41'44.7"
G3M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'22.5" W 35°41'45.1"
G4M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'22.0" W 35°41'45.2"
G5M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'21.5" W 35°41'45.1"
G6M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'22.0" W 35°41'44.8"
G7M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'22.3" W 35°41'44.6"
G8M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'22.6" W 35°41'44.5"
G9M	Graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'22.8" W 35°41'44.8"
G10M	Graviola	Maceio	01/03/10	S 9° 34'23.6" W 35° 41'44.7"
G11M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'23.8" W 35°41'44.9"
G12M	graviola	Maceió	01/03/2010	S 9°34'23.2" W 35°41'44.9"
G1U	graviola	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'29.1" W 36°00'41.3"
G2U	graviola	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'29.0" W 36°00'40.9"
G3U	graviola	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'28.5" W 36°00'40.5"
G4U	graviola	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'28.7" W 36°00'40.0"
G6U	graviola	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'28.6" W 36°00'39.3"
G7U	graviola	União dos Palmares	02/12/2009	S 9°10'29.2" W 36°00'39.0"
G8U	graviola	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'29.4" W 36°00'38.8"
G9U	graviola	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'30.0" W 36°00'38.5"
G10U	graviola	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'30.3" W 36°00'38.2"
G12U	graviola	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'31.2" W 36°00'37.3"
G13U	graviola	União dos Palmares	26/10/2010	S 9°10'31.6" W 36°00'37.1"
G1P	graviola	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'41.0" W 36°36'41.6"
G3P	graviola	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'34.7" W 36°36'40.6"
G4P	graviola	Palmeira dos Índios	30/11/2010	S 9°27'35.8" W 36°36'41.0"

Figura 1 – Folhas de graviola (a) e pinha (b) apresentando lesões típicas de antracnose.



Fonte: KAMEI, 2011.

Figura 2 – Mapa de Alagoas indicando os municípios onde as coletas foram realizadas.



Para a desinfestação, as folhas foram lavadas com água e sabão neutro e secadas naturalmente. Posteriormente, fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e o doente foram retirados e imersos em etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 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 AA (Ágar-Água – 15 g de ágar, qsp. 1000 mL de água).

Após a formação das colônias, pequenos discos de meio de cultura, contendo o crescimento do patógeno, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar – 200 g de batata, 20 g de dextrose, 17 g de ágar, qsp. 1000 mL de água) e mantidos em temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) por 10 dias. Isolados

monospóricos foram obtidos através de diluição seriada de uma solução de esporos, até 10^{-6} da concentração inicial, que foi inoculada em placa de Petri contendo meio BDA. Após 2 dias, o esporo germinado foi retirado e transferido para outra placa de Petri contendo meio BDA e mantido por 7 dias em temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Este processo garantiu a pureza genética dos isolados.

Os isolados de *Colletotrichum* foram preservados em água, imersão em óleo mineral e tubo de ensaio. No primeiro, foi aplicado o método Castellani, onde discos de micélio de 5 mm foram armazenados em pequenos vidros contendo 5 mL de ADE. No segundo e terceiro, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo meio BDA. Após o crescimento do patógeno sobre toda a superfície, apenas para a conservação em óleo foram acrescentados 5 mL de óleo mineral Nujol® esterilizado. Os tubos foram mantidos em temperatura de aproximadamente 5°C, sob refrigeração.

Para o teste de patogenicidade foi aplicado o método da folha destacada, com inoculação cruzada. Cada isolado foi inoculado separadamente em folhas de pinha e graviola, ambas com e sem ferimento, num total de quatro tratamentos por isolado. A inoculação foi feita através da deposição de quatro gotas (repetições), equidistantes uma das outras, de 40 µL de suspensão de esporos (10^5 conídios/mL) sobre a superfície das folhas. Nas testemunhas foi utilizada apenas água destilada autoclavada ao invés da suspensão.

Posteriormente, cada folha foi acondicionada separadamente em caixas plástica transparente (gerbox) contendo papel filtro umedecido com 5 mL de água destilada autoclavada. Para evitar contato com a superfície úmida, foram utilizados tampas ou fundos de placas de Petri estéreis e os pecíolos envoltos por um chumaço de algodão embebido em água destilada autoclavada para manter o vigor. O experimento foi mantido em incubadora BOD a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas até a observação dos sintomas.

3.2 Caracterização cultural

Neste experimento foram observadas características como a coloração da colônia, o aspecto do micélio aéreo, a produção de microescleródios e a velocidade de crescimento das colônias dos isolados, quando cultivados em meio BDA.

De cada isolado, cultivado por sete dias, da borda da colônia, foi retirado um disco de meio BDA contendo o micélio. Estes foram transferidos individualmente para o centro de novas placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA. Avaliou-se diariamente por cinco dias,

sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas, o diâmetro médio das colônias tomado no reverso das placas, através da mensuração, em dois sentidos, dos diâmetros perpendiculares, com o auxílio de uma régua milimetrada. Ao final, foram observadas também a coloração das colônias e a formação de microescleródios.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados obtidos da velocidade de crescimento micelial dos isolados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT v7.6 beta (2011) desenvolvido por Assis e Azevedo (2009).

3.3 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica baseou-se no tamanho e forma de 50 conídios e 50 apressórios de cada isolado, escolhidos aleatoriamente, que foram visualizados em lâminas com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 400x.

A produção de esporos dos isolados foi obtida através do cultivo em meio BDA e meio de Aveia (40g de aveia em flocos, 15g de ágar, qsp.1000 mL de água) em temperatura de 25 ± 1 °C por cerca de 10 dias e fotoperíodo de 12 horas.

Para a formação de apressórios, uma gota (40 µL) de suspensão de esporos foi depositada sobre uma lâmina de vidro estéril e acondicionada em placa de Petri forrada com papel filtro estéril umedecido com ADE, formando uma câmara úmida, e vedada com filme de PVC. Após cerca de 14 a 24 horas, a germinação foi interrompida com solução de lactofenol com azul de algodão e os apressórios foram então observados.

Os formatos de conídios e apressórios foram avaliados de acordo com chave de identificação proposta por Sutton (1992). Já as medidas das estruturas foram obtidas através de imagens capturadas por câmera digital (SAMSUNG SDC-415®) acoplada ao microscópio óptico (OLYMPUS BX41®) utilizando o software Motic Images Plus 2.0 para a análise. As médias de comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios foram analisadas estatisticamente e individualmente, por delineamento inteiramente casualizado, consistindo de 53 tratamentos (isolados) e 50 repetições (medidas). Quanto aos apressórios, aplicou-se o mesmo delineamento experimental, entretanto, foi apenas analisado o comprimento e a largura destes.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.6 beta (2011) desenvolvido por Assis e Azevedo (2009).

3.4 Caracterização molecular

3.4.1 Extração de DNA

Para a produção e crescimento de micélio, os isolados foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo o meio Sacarose-Extrato de levedura-Asparagina (sacarose 10 g, L-asparagina 2 g, extrato de levedura 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄.7H₂O 0,1 g, ZnSO₄.7H₂O 0,44 mg, FeCl₃.6H₂O 0,48 mg, e MnCl₂.H₂O 0,36 mg) (ZAUZA et al., 2007), por 5 dias, sob temperatura de 25±1°C, sem agitação, e fotoperíodo de 12 horas.

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998). Para tanto, cerca de 0,15 g de micélio de cada isolado foram macerados individualmente com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo. O pó resultante foi transferido para tubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL e então foram adicionados 2000 µL de tampão de extração CTAB 4% (CTAB 4%, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%) aquecido a 65 °C, 4 µL de β-mercaptoetanol e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL).

Os tubos foram incubados a 65° C por 30 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados 600 µL de CIA (Clorofórmio:Álcool iso-amílico; 24:1) e então as amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex por 5 minutos e então centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos, sendo a fase aquosa resultante, cerca de 400 µL, transferida para um novo tubo. Acrescentou-se aproximadamente 40 µL de CTAB 10% aquecido a 65 °C. As amostras foram colocadas em vortex por 5 minutos, centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa resultante transferida novamente para um novo tubo.

Foram acrescentados 250 µL de isopropanol 100%. Misturou-se suavemente. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa foi descartada com cuidado, restando apenas o pellet. Acrescentou-se 1000 µL de etanol 70%. Centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos.

Por fim, foram acrescentados às amostras mais 1000 µL de etanol 100%, centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado com cuidado. Os tubos

foram invertidos na posição vertical até a completa secagem dos pellets formado e ressuspendidos em 50 µL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) + RNase, na proporção de 1:49. O material foi armazenado sob temperatura de -20° C.

3.4.2 Amplificação do rDNA e purificação dos produtos da PCR

A técnica empregada para a amplificação do rDNA foi a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados os oligonucleotídeos universais, IST4 (R: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS5 (F: 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'), conforme descritos por White e colaboradores (1990). As reações de PCR foram preparadas com tampão 10X, MgCl₂ 50 mM, dNTP's 10 mM, 10 µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1µL de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 50µL com água Milli-Q. As condições de termociclagem da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguida de 35 ciclos formados por 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 30 seg, para anelamento dos oligonucleotídeos e extensão a 72°C por 2 min.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o Kit Ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante.

3.4.3 Sequenciamento da região ITS e análise filogenética dos isolados

Os produtos da amplificação com os oligonucleotídeos ITS4 e 5 foram seqüenciados nos dois sentidos com os mesmos iniciadores utilizados na amplificação. Os procedimentos de seqüenciamento foram realizados pela empresa MacroGen Inc. (Coréia do Sul). Para a reação de seqüenciamento utilizou-se o Kit BigDyeTM Terminator v3. O seqüenciamento dos fragmentos foi realizado mediante eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer, utilizando o polímero POP7.

As amostras foram purificadas usando illustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante e enviadas para seqüenciamento na MacroGen Inc. Seoul Korea.

Para a análise filogenética os alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados com o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). Alinhamentos foram ajustados manualmente para permitir o alinhamento máximo e similaridade máxima entre as sequencias. Análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), pelo modelo Neighbor-Joining Tree pela análise de bootstrap com 1000 repetições.

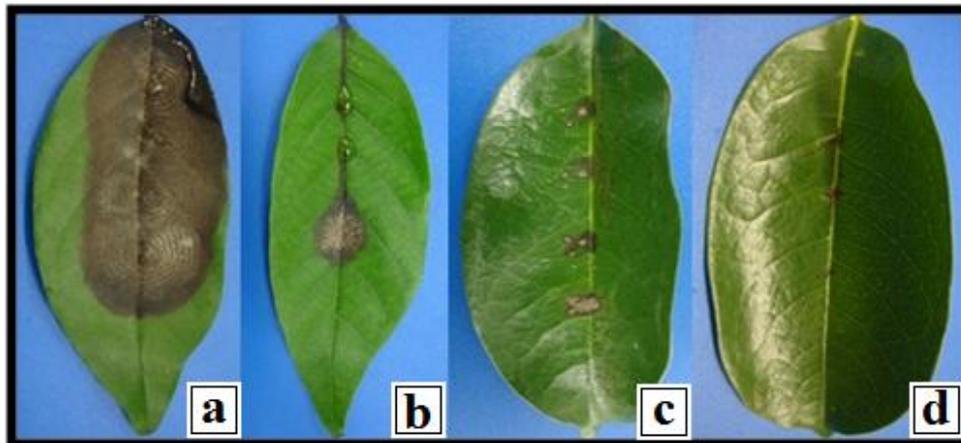
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de patogenicidade

Qualitativamente, todos os isolados testados mostraram-se patogênicos às folhas destacadas de pinha e graviola. Foram assim considerados, mesmo aqueles que se mostraram patogênicos a pelo menos um, dos quatro tratamentos.

As lesões iniciais, características de antracnose, surgiram de 5-9 dias após a inoculação, com aumento da intensidade. O experimento foi mantido e observado até o 14º dia. As folhas de pinha apresentaram os primeiros sintomas, mesmo em inoculações cruzadas. Os ferimentos realizados na superfície foliar também facilitaram a entrada do patógeno, possibilitando o aparecimento mais rápido das lesões (Figura 3).

Figura 3 – Folhas apresentando lesões necróticas observadas no 14º dia. Folha de pinha com ferimento (a) e sem ferimento (b), e folha de graviola com ferimento (c) e sem ferimento (d).

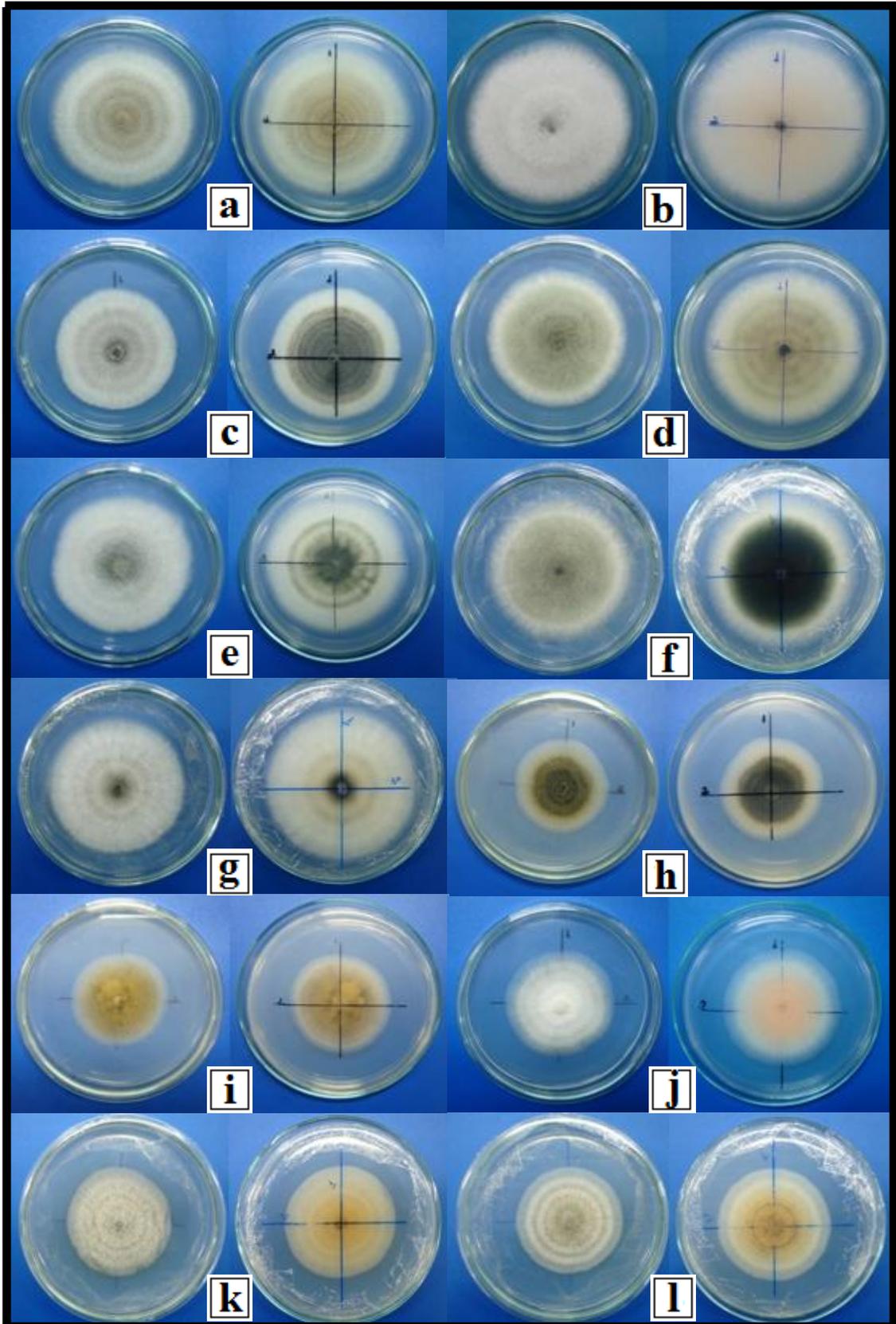


Fonte: KAMEI, 2011.

4.2 Caracterização cultural

Apenas o isolado P7P apresentou microescleródios, em pequena quantidade. O micélio aéreo das colônias variou de abundante a reduzido. A coloração das colônias mostrou-se heterogênea (Figura 4), permitindo a formação de quatro grupos, denominados: A, B, C e D. A velocidade de crescimento micelial, para a maior parte dos isolados, foi alta, com média acima de 10,0 mm/dia. Os resultados foram agrupados na Tabela 2.

Figura 4 – Aspecto das colônias de *Colletotrichum* e seu reverso, observadas ao 5º dia, cultivadas em meio BDA, sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Isolados: G9M (a), P1P (b), G8M (c), P5P (d), P10P (e), P2U (f), G1M(g), G10U (h), G8U (i), G4P (j), P5U (k) e P4U (l).



Fonte: KAMEI, 2011.

O grupo A foi formado por dezesseis isolados (P1P, P5P, P6P, P7P, P12P, P13P, P15P, G2M, G3M, G5M, G8M, G9M, G10M, G11M, G12M e G1P), representando aproximadamente 30% do total. As colônias apresentaram várias tonalidades de cinza, todas com bordas brancas, e reverso variando de salmão a levemente rosado ou cinza a cinza rosado. Todas as colônias apresentaram micélio aéreo, variando desde abundante a reduzido. O isolado P7P apresentou pequena quantidade de microescleródios. A taxa de crescimento micelial variou de aproximadamente 10,4 a 16,0 mm/dia, com média geral de 13,4 mm/dia. Estas características são semelhantes às encontradas para *Colletotrichum gloeosporioides* (SUTTON, 1992).

O grupo B foi constituído da maior parte dos isolados, com vinte e um representantes (P2U, P6U, P9U, P11U, P12U, P13U, P3P, P9P, P10P, P14P, G1M, G4M, G6M, G7M, G1U, G2U, G4U, G7U, G9U, G12U e G13U), o que significou 43% do total. A coloração das colônias apresentou diversas tonalidades de cinza, com bordas brancas, reverso verde escuro ou cinza esverdeado. O micélio aéreo variou de abundante a reduzido. As médias de crescimento do micélio variaram de cerca 9,6 a 14,5 mm/dia, com média geral de 12,6 mm/dia.

As tonalidades observadas nos grupos A e B, em relação à coloração, também são encontradas em colônias de *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* crescidas em meio BDA, que são muito parecidas e variam de branco a cinza, cinza oliva, até cinza escuro (SMITH & BLACK, 1990; GUNNEL & GLUBER, 1992). As médias de velocidade de crescimento observadas ainda nos grupos A e B, são semelhantes às médias relatadas para as duas espécies. *C. fragariae* apresenta uma taxa um pouco menor (9,24 a 9,47 mm/dia) (VILLANUEVA ARCE et al., 2005), enquanto *C. gloeosporioides* tanto apresenta valores semelhantes, como também médias de crescimento acima de 10,0 mm/dia (TOZZE JÚNIOR, 2007). Assim, estas características não são consistentes na distinção entre essas espécies.

O grupo C apresentou apenas quatro isolados (P11P, G8U, G10U, G3P), representando cerca de 8%. A coloração variou de verde oliva a verde oliva alaranjado, devido à presença de massa de conídios que conferiu esse aspecto, com a cor do reverso correspondente ao verso. Todas as colônias apresentaram micélio aéreo reduzido. A velocidade de crescimento micelial para G8U e G10U foi menor que 10,0 mm/dia, sendo de 9,1 e 8,7, respectivamente; e para P11P e G3P, o desenvolvimento foi mais rápido, com valores de 13,3 e 14,4 mm/dia. A média geral da taxa de crescimento foi de 11,4 mm/dia.

O grupo D reuniu dez isolados (P1U, P4U, P5U, P7U, P8U, P10U, P15U, G3U, G6U e G4P), o que correspondeu a aproximadamente 19%. A coloração das colônias variou de

branco a creme com reverso laranja ou salmão a salmão esverdeado. Para todos os isolados, o micélio aéreo foi moderado. Quanto à velocidade de crescimento, houve variação de aproximadamente 9,4 a 11,4 mm/dia, obtendo média geral de 10,0 mm/dia.

As características presentes dos grupos C e D não permitiram correlacioná-las a nenhuma espécie de *Colletotrichum* descritas por Sutton (1992). A coloração das colônias dos isolados do grupo D foi semelhante à encontrada para *C. boninense*. No entanto, as médias de crescimento micelial observadas foram muito superiores às dessa espécie, que variam de 5,2 a 6,1 mm/dia (MORIWAKI et al., 2003).

Embora alguns grupos apresentem similaridade com certas espécies de *Colletotrichum*, não é confiável afirmar sua identificação analisando apenas caracteres culturais. Esta afirmação já foi constatada por vários autores (TOZZE JÚNIOR, 2007; ANDRADE et al., 2007; PEREIRA, 2009). As análises da coloração das colônias são muito subjetivas, podendo, portanto, ter interpretações distintas. Além disso, muitos fatores externos podem afetar a estabilidade das colônias e, conseqüentemente, o seu aspecto (MENEZES, 2002).

Tabela 2 – Dados das características culturais dos isolados de *Colletotrichum*, referentes à velocidade de crescimento micelial (VCM), classificação quanto ao grupo de coloração, coloração das colônias e aspecto do micélio aéreo.

(continua)

Isolado	VCM mm/dia		Grupo	Coloração da colônia	Micélio aéreo
P1U	1,0	cedf	D	Creme, reverso salmão esverdeado	Moderado
P2U	1,4	pqr	B	Cinza, bordas brancas, reverso, verde escuro	Moderado
P4U	1,0	cedf	D	Creme, reverso laranja	Moderado
P5U	1,0	defg	D	Creme, reverso laranja	Moderado
P6U	1,2	jk	B	Cinza esverdeado, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
P7U	1,0	efg	D	Creme, reverso salmão esverdeado	Moderado
P8U	1,0	fg	D	Branco, reverso salmão claro	Moderado
P9U	1,3	mno	B	Cinza, reverso verde escuro	Moderado
P10U	1,1	h	D	Branco, reverso salmão	Moderado
P11U	1,2	hi	B	Cinza, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
P12U	1,0	ced	B	Cinza, bordas brancas, reverso verde escuro	Abundante
P13U	1,2	ijk	B	Cinza escuro, bordas brancas, reverso cinza esverdeado	Reduzido
P15U	1,0	g	D	Creme, reverso salmão esverdeado	Moderado
P1P	1,6	w	A	Cinza claro, bordas brancas, reverso levemente rosado	Abundante
P3P	1,3	lm	B	Cinza, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
P5P	1,3	mn	A	Cinza escuro, bordas brancas, reverso cinza rosado	Abundante
P6P	1,5	v	A	Cinza claro, bordas brancas, reverso cinza rosado	Abundante
P7P	1,5	uv	A	Cinza claro, bordas brancas, reverso cinza rosado	Abundante
P9P	1,3	mn	B	Cinza, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
P10P	1,3	mno	B	Cinza, bordas brancas, reverso cinza esverdeado	Abundante
P11P	1,3	mno	C	Verde oliva, bordas brancas, reverso verde oliva	Reduzido
P12P	1,2	ijk	A	Cinza, bordas brancas, reverso cinza	Reduzido
P13P	1,2	jk	A	Cinza, bordas brancas, reverso cinza	Reduzido
P14P	1,3	mn	B	Cinza esverdeado, bordas brancas, reverso esverdeado	Moderado
P15P	1,2	hij	A	Cinza, bordas brancas, reverso cinza	Reduzido
G1M	1,4	rstu	B	Cinza claro, bordas brancas, reverso esverdeado	Moderado
G2M	1,4	pqr	A	Cinza, bordas brancas, reverso cinza	Moderado
G3M	1,6	w	A	Cinza claro, bordas brancas, cinza	Moderado

Tabela 2 – Dados das características culturais dos isolados de *Colletotrichum*, referentes à velocidade de crescimento micelial (VCM), classificação quanto ao grupo de coloração, coloração das colônias e aspecto do micélio aéreo.

(conclusão)

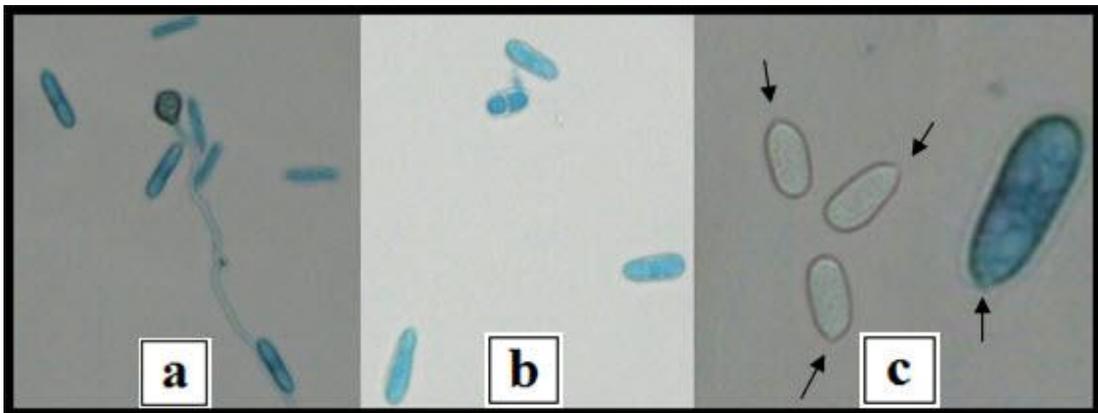
Isolado	VCM mm/dia		Grupo	Coloração da colônia	Micélio aéreo
G4M	1,2	ijk	B	Cinza, bordas brancas, reverso cinza	Moderado
G5M	1,4	qrs	A	Cinza claro, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
G6M	1,2	kl	B	Cinza escuro, bordas brancas, reverso cinza esverdeado	Moderado
G7M	1,4	qrst	B	Cinza, bordas brancas, reverso cinza	Moderado
G8M	1,4	opq	A	Cinza, bordas brancas, reverso cinza escuro	Moderado
G9M	1,2	Kl	A	Cinza, bordas brancas, reverso salmão	Abundante
G10M	1,2	Kl	A	Cinza, bordas brancas, reverso cinza escuro	Abundante
G11M	1,0	g	A	Cinza claro, bordas brancas, reverso levemente rosado	Reduzido
G12M	1,2	hi	A	Cinza escuro, bordas brancas, reverso cinza escuro	Moderado
G1U	1,2	jk	B	Cinza escuro, bordas brancas, reverso cinza escuro esverdeado	Moderado
G2U	1,2	ijk	B	Cinza escuro, bordas brancas, reverso verde escuro	Abundante
G3U	0,9	bc	D	Creme, reverso verde escuro	Moderado
G4U	1,5	tuv	B	Cinza, bordas brancas, reverso verde escuro	Abundante
G6U	1,0	bcd	D	Creme, reverso esverdeado	Moderado
G7U	1,2	jk	B	Cinza escuro, bordas brancas, reverso verde escuro	Reduzido
G8U	0,9	ab	C	Verde oliva, bordas brancas, reverso verde oliva	Reduzido
G9U	1,4	nop	B	Cinza, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
G10U	0,9	a	C	Verde oliva, bordas brancas, reverso verde escuro	Reduzido
G12U	1,2	k	B	Cinza escuro, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
G13U	1,4	rstu	B	Cinza, bordas brancas, reverso verde escuro	Moderado
G1P	1,4	stu	A	Cinza claro, bordas brancas, reverso cinza claro	Moderado
G3P	0,9	ab	C	Verde oliva alaranjado, bordas brancas, reverso verde alaranjado	Reduzido
G4P	1,0	g	D	Branco, reverso salmão	Moderado
CV	1,4				

Médias arredondadas e seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

4.3 Caracterização morfológica

De acordo com as observações das formas mais frequentes encontradas para os conídios, houve prevalência do formato reto, cilíndrico, com ápices arredondados; seguido de reto, com constrição; e por fim, reto, cilíndrico, com ápices arredondados, sendo um mais estreito que o outro (Tabela 3). No entanto, o segundo formato não prevaleceu sobre os outros quando analisados por isolado, ao contrário da primeira e da última. Ressalta-se que todos os isolados apresentaram as três formas, mesmo com percentagens muito distintas. Alguns conídios após a germinação emitiram um ou dois tubos germinativos com apressórios, sendo esta característica comumente observada para o gênero *Colletotrichum* (MERCURE et al., 1994; LINS et al., 2007). Quanto aos apressórios, a forma globosa ou ovóide esteve mais presente que a irregular (Tabela 4). As diferenças encontradas nessas características resultaram na formação de três grupos distintos: A, B e C (Figura 5).

Figura 5 – Aspectos morfológicos dos conídios de diferentes isolados apresentando características semelhantes às espécies *Colletotrichum gloeosporioides* (a), *C. fragariae* (b) e *C. boninense*, em menor e maior detalhe (c).



Fonte: KAMEI, 2011.

No grupo A, o maior deles, houve prevalência de conídios retos, cilíndricos, com ápices arredondados para trinta e dois isolados (P2U, P6U, P9U, P11U, P12U, P1P, P3P, P5P, P6P, P7P, P9P, P12P, P13P, P14P, P15P, G1M, G2M, G3M, G4M, G5M, G6M, G7M, G8M, G9M, G10M, G11M, G12M, G1U, G9U, G12U, G13U e G1P) (Figura 5a). A maioria mostrou alta predominância desse formato, com média geral de 78% e amplitude de 54 a 92%. Esta característica é típica de *Colletotrichum gloeosporioides* (SUTTON, 1992). As dimensões médias foram de 13,0 x 5,2 μm . As variações para o comprimento e largura foram de 10,9-19,1 μm e 4,3-8,8 μm , respectivamente. A relação comprimento/largura, também

usada na identificação de espécies do gênero, mostrou valores variando de 2,0 a 3,2, sendo a média geral de 2,5. Os apressórios apresentaram-se em sua maioria como globoso ou ovóide e tiveram média geral de 8,9 x 6,8 μm , com variações de 7,1-12,0 μm e 5,7-10,3 μm , respectivamente. As medidas encontradas novamente corroboram com as descritas por Sutton (1992) para *C. gloeosporioides*, que apresenta conídios de 12,0-17,0 x 3,5-6,0 μm ; e apressórios com valores de 6-20 x 4-12 μm .

O grupo B foi composto por quinze isolados (P1U, P4U, P5U, P7U, P8U, P10U, P15U, P10P, P11P, G3U, G6U, G8U, G10U, G3P e G4P). Semelhante ao primeiro, este grupo também apresentou maior incidência de conídios retos, cilíndricos, com ápices arredondados, que resultou em média geral de 76%, com mínimo de 62% e máximo de 86%. As médias para o comprimento dos conídios também foram semelhantes, com valor de 13,3 μm , variando de 12,0 a 14,0 μm . No entanto, a largura para este grupo foi maior, com média de 6,1 μm , e amplitude de 5,4 a 6,8 μm . Conseqüentemente foi constatado um valor menor para a relação comprimento/largura, que obteve média de 2,2, variando de 1,8 a 2,6. Além disso, outra característica determinante na distinção destes isolados, foi que alguns conídios apresentaram uma pequena cicatriz em sua base (Figura 5b). Essa protuberância é semelhante à encontrada para descrição de *Colletotrichum boninense* (MORIWAKI et al. 2003). Tozze Júnior (2007) também verificou conídios com características semelhantes, referindo-se à mesma espécie. Para o apressório, o formato globoso foi altamente incidente, com percentagens mínima de 66% e máxima 100%. Suas medidas tiveram médias de 8,5 x 7,1 μm , variando de 7,5 a 9,6 μm para o comprimento e 6,2 e 7,8 μm para a largura. Todos os dados foram semelhantes aos parâmetros morfométrico para a mesma espécie.

Para o grupo C, que apresentou apenas quatro isolados (P13U, G2U, G4U e G7U), o formato predominante foi de conídios retos, cilíndricos, com ápices arredondados, sendo um mais estreito que o outro (Figura 5c), que apresentou percentagens significativas, com média de 72,3%, variando de 64 a 80% e foi determinante para distingui-lo dos demais. Esta característica é semelhante à relatada para *Colletotrichum fragariae* (SMITH & BLACK, 1990; GUNNEL & GUBLER, 1992; NIRENBERG et al., 2002). As dimensões observadas foram de 12,4 x 5,1 μm , variando de 12,1-12,8 μm para o comprimento e 4,9-5,1 μm para a largura. A relação comprimento/largura obteve média de 2,5, variando de 2,4 a 2,7. O formato globoso dos apressórios, tiveram alta predominância, acima de 90%. Suas medidas foram de 7,9 x 6,2 μm , com amplitude de 7,4-8,5 μm e 5,9-6,6 μm , respectivamente. Diante dos dados, apenas o comprimento dos conídios mostrou-se menor, quando comparado com o já relatado

para esta espécie, que pode variar de 13,7 (SMITH & BLACK, 1990) a 17,3 μm (HOWARD & ALBREGTS, 1984). Já as dimensões do apressórios foram similares às encontradas por Villanueva-Arce e colaboradores (2005) para *C. fragariae* isolado de cherimóia, no México.

Tabela 3 – Médias de comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência de formatos de conídios dos isolados de pinha e graviola.

(continua)

Isolado	Comprimento (µm)		Largura (µm)		Relação comprimento/largura (µm)		Formato* (%)					
	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude	1	2	3			
P1U	13,7	qrstu	10,8-15,3	6,5	vwx	5,3-8,4	2,1	bcde	1,4-2,8	86	6	8
P2U	11,3	abcd	7,5-14,6	4,5	abcd	3,5-6,7	2,5	ijklmno	1,9-3,8	89	5	6
P4U	12,9	ijklmnopqrs	10,5-15,7	5,8	nopqrst	4,6-7,8	2,3	bcdefghijk	1,8-3,1	76	12	12
P5U	13,7	qrstu	8,4-15,8	6,3	tuvwxyz	4,8-8,4	2,2	bcdefg	1,4-3,2	81	9	10
P6U	16,1	y	12,9-20,0	5,9	pqrstuv	3,7-9,6	2,8	opqr	1,5-4,3	86	8	6
P7U	13,3	mnopqrst	10,5-15,4	6,2	stuvw	4,6-7,9	2,2	bcdef	1,5-3,0	79	9	12
P8U	14,0	stuv	8,1-15,9	6,1	stuvw	5,2-7,4	2,3	bcdefghijk	1,2-2,8	78	8	14
P9U	15,7	xy	12,2-21,2	5,2	fghijklmno	3,1-7,2	3,1	r	2,3-4,7	75	6	19
P10U	13,0	ijklmnopqrst	10,6-15,9	6,0	qrstuv	4,6-7,6	2,2	bcdefg	1,5-2,9	81	9	10
P11U	12,6	fghijklmnopq	10,1-15,3	5,3	fghijklmnop	3,7-7,4	2,5	fghijklm	1,4-4,1	86	12	2
P12U	13,1	klmnopqrst	9,9-17,3	4,9	bcdefghijk	3,4-7,5	2,7	mnopq	1,9-3,6	79	8	13
P13U	12,8	hijklmnopqr	9,5-17,3	4,9	bcdefghij	3,4-6,6	2,7	mnopq	1,8-4,1	32	64	4
P15U	12,5	efghijklmnop	10,1-14,4	6,1	stuvw	4,7-7,4	2,1	abc	1,6-2,7	82	16	2
P1P	15,2	wxy	12,2-17,1	6,5	uvwxyz	5,0-7,8	2,4	cdefghijkl	1,8-2,9	71	6	23
P3P	12,6	fghijklmnopq	9,5-16,7	5,3	fghijklmnop	3,8-8,1	2,5	efghijklm	1,6-3,3	83	7	10
P5P	11,4	abcde	8,1-14,6	5,4	ghijklmnopqr	3,4-8,1	2,2	bcdefgh	1,7-3,4	76	5	19
P6P	12,7	ghijklmnopq	10,7-16,0	5,2	efghijklmno	3,7-8,3	2,5	hijklmn	1,5-3,3	78	4	18
P7P	11,7	bcdefg	8,5-14,9	4,5	abcde	3,3-5,9	2,6	klmno	1,8-3,4	80	4	16
P9P	13,1	klmnopqrst	10,0-16,2	5,4	hijklmnopqr	3,9-8,1	2,5	ghijklm	1,7-3,4	77	5	18
P10P	13,1	lmnopqrst	10,8-16,6	5,7	nopqrst	4,4-7,6	2,3	bcdefghijkl	1,5-3,3	75	16	9
P11P	12,0	bcdefghijk	7,9-15,5	6,8	x	4,3-8,5	1,8	a	1,3-3,0	76	17	7
P12P	10,9	a	9,4-13,0	4,3	a	3,5-5,6	2,6	klmno	2,1-3,4	92	0	8
P13P	11,2	abc	9,8-11,8	5,0	bcdefghijkl	4,4-6,1	2,3	bcdefghijk	1,9-2,7	84	8	8
P14P	11,1	ab	8,1-12,1	4,7	bcdefgh	3,0-4,3	2,4	defghijklm	2,3-3,4	88	4	8
P15P	11,9	bcdefghij	9,2-13,7	5,3	fghijklmnopq	3,4-6,8	2,3	bcdefghijk	1,6-3,7	86	4	10
G1M	12,9	ijklmnopqr	11,1-14,4	5,0	cdefghijklm	4,4-5,7	2,6	ijklmno	2,2-3,2	73	22	5
G2M	11,7	bcdefgh	9,2-14,6	4,5	abc	3,6-6,4	2,7	lmnop	2,2-3,3	54	12	34
G3M	12,5	efghijklmnop	11,2-14,9	5,1	cdefghijklm	3,4-6,9	2,5	ghijklm	1,9-3,1	80	12	8

Tabela 3 – Médias de comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência de formatos de conídios dos isolados de pinha e graviola.

(conclusão)

Isolado	Comprimento (µm)		Largura (µm)		Relação comprimento/largura (µm)		Formato (%)					
	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude	1	2	3			
G4M	12,4	defghijklmno	10,4-13,7	4,7	abcdefg	4,0-5,8	2,7	lmnop	2,0-3,3	72	16	12
G5M	12,1	bcdefghijkl	9,2-14,6	4,7	bcdefghij	3,7-6,1	2,6	jklmno	1,9-3,0	65	8	27
G6M	12,1	bcdefghijkl	8,1-15,3	5,4	ijklmnopqr	3,8-7,7	2,3	bcdefghijk	1,7-4,0	64	9	27
G7M	12,3	cdefghijklmn	10,5-13,6	4,7	abcdef	3,9-5,8	2,7	lmnop	1,9-3,4	86	4	10
G8M	13,5	opqrst	10,7-16,2	4,3	ab	3,1-5,2	3,2	s	2,2-4,7	62	4	34
G9M	14,7	uvwxy	12,3-16,9	5,0	bcdefghijkl	3,9-6,7	3,0	qr	2,1-3,8	80	6	14
G10M	12,4	defghijklmno	9,7-15,7	5,2	defghijklmn	3,4-6,8	2,5	ghijklm	2,0-3,7	80	5	15
G11M	12,1	bcdefghijkl	9,2-15,9	5,7	nopqrst	4,3-7,2	2,1	bcd	1,4-2,9	86	8	6
G12M	11,3	abc	8,1-14,6	5,6	lmnopqrs	3,9-8,1	2,0	ab	1,6-2,9	92	5	3
G1U	14,6	uvwxy	11,1-17,7	6,7	wx	4,5-9,2	2,2	bcdefghi	1,6-2,9	79	7	14
G2U	12,3	cdefghijklmn	10,1-14,9	5,1	cdefghijklm	3,0-6,6	2,5	fghijklm	1,8-3,7	12	80	8
G3U	12,8	ghijklmnopqr	10,5-15,3	6,0	rstuvw	4,7-7,9	2,2	bcdef	1,5-3,2	80	8	12
G4U	12,4	efghijklmnop	10,1-14,4	5,2	defghijklmn	3,0-6,6	2,4	efghijklm	1,8-3,7	27	71	2
G6U	13,3	nopqrst	8,7-15,8	5,8	opqrstu	4,6-8,1	2,3	bcdefghijkl	1,4-3,1	76	8	16
G7U	12,1	bcdefghijklm	8,4-16,6	5,0	abcdefghijk	3,6-6,4	2,5	ghijklm	1,8-4,3	20	74	6
G8U	13,6	pqrstu	9,9-17,3	5,4	ijklmnopqr	3,9-7,7	2,6	jklmno	1,7-4,0	78	6	16
G9U	14,8	vwxy	11,3-18,7	5,7	mnopqrst	4,8-8,3	2,7	mnopq	1,7-3,9	82	6	12
G10U	13,9	rstuv	8,1-15,8	6,0	rstuvw	5,1-7,5	2,3	bcdefghijk	1,3-2,8	62	36	2
G12U	14,1	tuvw	11,8-16,3	5,0	cdefghijklm	3,8-6,2	2,8	bcdef	2,2-4,0	68	10	22
G13U	11,5	abcdef	8,4-16,0	4,7	abcdef	3,1-6,3	2,5	ghijklm	1,7-3,7	73	11	16
G1P	13,2	lmnopqrst	11,5-15,4	4,5	abc	4,0-5,3	3,0	pqr	2,4-3,4	75	8	17
G3P	14,1	tuv	9,6-19,9	5,8	opqrstu	4,7-8,9	2,5	fghijklm	1,5-3,6	66	10	24
G4P	13,4	opqrst	8,7-15,8	6,2	stuvwxy	4,6-8,3	2,2	bcdefgh	1,4-2,9	68	8	24
CV	10,7			15,4			16,3					

Médias arredondadas e seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. *Formato (1): reto, cilíndrico, com ápices arredondados; (2): reto, cilíndrico, com ápices arredondados, sendo um mais estreito que o outro; (3): reto com constrição.

Tabela 4 – Médias de comprimento, largura e frequência de formatos de apressórios dos isolados de pinha e graviola.

(continua)

Isolado	Comprimento (µm)			Largura (µm)			Formato (%)	
	Média		Amplitude	Média		Amplitude	1	2
P1U	9,1	lmnopqrst	7,7-11,8	7,4	nopq	6,2-8,8	91	9
P2U	8,3	bcdefghijkl	6,4-10,4	5,7	a	4,7-7,0	82	18
P4U	8,9	jklmnopqrs	6,1-11,8	7,5	opq	5,7-9,3	98	2
P5U	8,7	hijklmnop	6,8-10,8	7,1	ijklmnop	5,4-10,1	89	11
P6U	10,5	v	7,4-13,9	6,8	ghijklmno	4,7-9,3	72	28
P7U	8,7	ijklmnopq	7,3-10,3	7,4	nopq	5,7-9,7	92	8
P8U	7,9	bcdefgh	6,8-9,7	6,5	bcdefghijk	5,2-10,1	96	4
P9U	10,4	uv	7,2-18,0	7,2	lmnopq	5,2-9,8	39	61
P10U	8,3	cdefghijklm	6,1-11,9	7,1	ijklmnop	5,2-9,7	92	8
P11U	9,6	rstu	7,5-14,4	7,5	opq	5,6-9,8	86	14
P12U	8,9	jklmnopqrs	7,1-11,3	6,6	cdefghijkl	5,1-12,1	82	18
P13U	7,5	abc	4,6-8,4	5,9	abc	4,8-7,0	100	0
P15U	7,5	abc	6,4-10,0	6,3	bcdefgh	5,4-7,8	93	7
P1P	8,2	bcdefghijkl	6,8-10,7	7,3	mnopq	6,3-9,0	82	18
P3P	8,5	fghijklmn	6,3-10,8	6,8	efghijklmn	4,5-8,0	75	25
P5P	9,7	stuv	7,4-12,7	6,5	bcdefghij	4,8-9,5	62	38
P6P	8,6	ghijklmno	6,7-10,8	6,3	bcdefgh	4,8-8,5	72	28
P7P	8,1	bcdefghij	5,6-12,4	6,5	bcdefghij	5,3-9,4	93	7
P9P	8,2	bcdefghijk	6,7-11,2	6,6	defghijklm	4,5-8,2	68	32
P10P	8,6	ghijklmnop	5,1-12,4	7,5	pqr	6,1-10,9	98	2
P11P	8,3	cdefghijklm	6,5-10,1	7,2	lmnopq	5,9-8,4	100	0
P12P	9,8	tuv	8,1-13,00	6,1	bcdefg	5,0-8,1	93	7
P13P	7,8	bcdefg	5,6-9,6	7,5	pqr	5,9-10,0	88	12
P14P	8,8	ijklmnopqr	6,2-14,3	6,3	bcdefgh	4,4-9,5	78	22
P15P	7,1	a	5,6-8,6	6,3	bcdefgh	4,5-7,6	85	15
G1M	7,7	abcdef	6,4-8,7	6,3	bcdefgh	5,3-7,2	68	32
G2M	9,5	pqrst	7,4-11,4	6,7	defghijklmn	4,2-8,9	73	27

Tabela 4 – Médias de comprimento, largura e frequência de formatos de apressórios dos isolados de pinha e graviola.
(conclusão)

Isolado	Comprimento (μm)		Largura (μm)		Formato(%)*			
	Média	Amplitude	Média	Amplitude	1	2		
G3M	8,0	bcdefghi	5,7-9,9	6,6	cdefghijkl	5,4-7,8	92	8
G4M	9,1	klmnopqrst	7,3-12,2	6,2	abcdefgh	5,1-7,6	61	39
G5M	8,6	ghijklmnop	6,4-11,4	6,3	abcdefgh	4,1-8,8	78	22
G6M	8,4	defghijklmn	6,7-11,8	6,6	defghijklm	5,2-9,0	72	28
G7M	8,3	cdefghijklm	6,5-9,8	6,1	abcd	4,2-7,8	86	14
G8M	7,8	abcdefg	6,7-10,4	6,4	bcdefghi	5,4-7,6	88	12
G9M	8,0	bcdefghi	6,5-10,5	6,1	abcde	5,2-8,2	74	26
G10M	8,0	bcdefghi	6,1-9,9	6,7	defghijklmn	4,5-8,0	72	28
G11M	8,2	bcdefghij	6,0-11,2	8,2	r	5,7-11,6	89	11
G12M	7,7	abcde	6,6-9,3	6,2	abcdefg	5,2-7,4	93	7
G1U	9,8	tuv	8,0-5,0	6,9	hijklmnop	13,9-12,1	68	32
G2U	8,2	bcdefghijk	6,5-9,7	6,5	bcdefghij	5,2-8,4	100	0
G3U	8,9	jklmnopqrs	6,1-10,8	7,8	qr	6,5-9,8	66	34
G4U	7,4	ab	6,0-8,7	5,8	ab	4,8-6,7	96	4
G6U	8,7	hijklmnop	6,2-11,2	7,1	jklmnop	5,0-10,1	68	32
G7U	8,5	efghijklmn	6,4-10,9	6,6	cdefghijkl	5,2-8,4	98	2
G8U	9,6	rstu	5,9-14,1	6,5	bcdefghij	4,7-9,4	72	28
G9U	9,9	tuv	8,1-14,1	7,5	pqr	6,1-10,2	68	32
G10U	7,6	abcd	6,3-9,6	6,2	abcdefg	5,2-7,5	74	26
G12U	9,3	nopqrst	6,2-13,0	7,3	nopq	5,4-10,8	72	28
G13U	8,8	ijklmnopqr	6,0-11,2	6,7	efghijklmn	5,3-9,5	64	36
G1P	9,4	opqrst	7,5-12,6	7,1	jklmnop	5,7-12,1	72	28
G3P	8,4	efghijklmn	6,5-10,3	7,2	klmnop	5,8-9,2	100	0
G4P	8,8	ijklmnopqr	7,1-10,8	7,3	mnoqp	5,7-10,1	98	2
CV	12,4			12,5				

Médias arredondadas e seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. *Formato (1): globoso ou ovóide, (2): irregular.

4.4 Caracterização molecular

O sequenciamento dos produtos amplificados com o par de primers universais ITS4 e ITS5 resultou em fragmentos com uma média de 570 pares de bases (pb). Após a edição e alinhamento, as cinquenta e uma sequências dos isolados, quando comparadas com as do banco de dados do GenBank, apresentaram alta similaridade, a partir de 99%, com as espécies *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *Glomerella magna* (Tabela 5). Todas as espécies foram encontradas infectando tanto a cultura da pinha, bem como da graviola.

Uma árvore filogenética foi construída a partir das sequências do rDNA (Figura 6). Os isolados separam-se por similaridade genética em três grupos distintos (G-I, G-II e G-III), com os diferentes isolados de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. boninense* e *G. magna*.

O G-I agrupou os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*, a maioria foi identificada como *C. gloeosporioides*, num total de vinte e oito (P2U, P11U, P12U, P1P, P3P, P5P, P6P, P7P, P9P, P10P, P12P, P13P, P14P, G1M, G2M, G3M, G4M, G5M, G6M, G7M, G8M, G9M, G11M, G12M, G1U, G9U, G13U e G1P). Este resultado foi dentro do esperado, pois este patógeno já foi relatado várias vezes como sendo o causador de antracnose na cultura da pinha e da graviola (SILVA & GARCIA, 1999; CORDEIRO et al., 2000; CORREIA et al., 2011). Apenas cinco isolados (P13U, G2U, G4U, G7U e P15P) foram identificados como *C. fragariae*. O patógeno é frequentemente relacionado à cultura do morango (SANHUEZA & CALEGARIO, 2006). Estudos sobre sua ocorrência em outros hospedeiros ainda é limitada. Recentemente, foi isolado de palmeira (MACKENZIE et al., 2008) e ciclame (MACKENZIE et al., 2008; LIU et al., 2011). Anteriormente, *C. fragariae* constituiu um subgrupo dentro de *C. gloeosporioides*. No entanto, trabalhos envolvendo vários genes indicam e corroboram que esta espécie é distinguível do agregado de *C. gloeosporioides*, não sendo somente restrita ao morangueiro (MACKENZIE et al., 2007), visto que Villanueva-Arce e colaboradores (2005) já relataram seu isolamento de frutos de cherimóia.

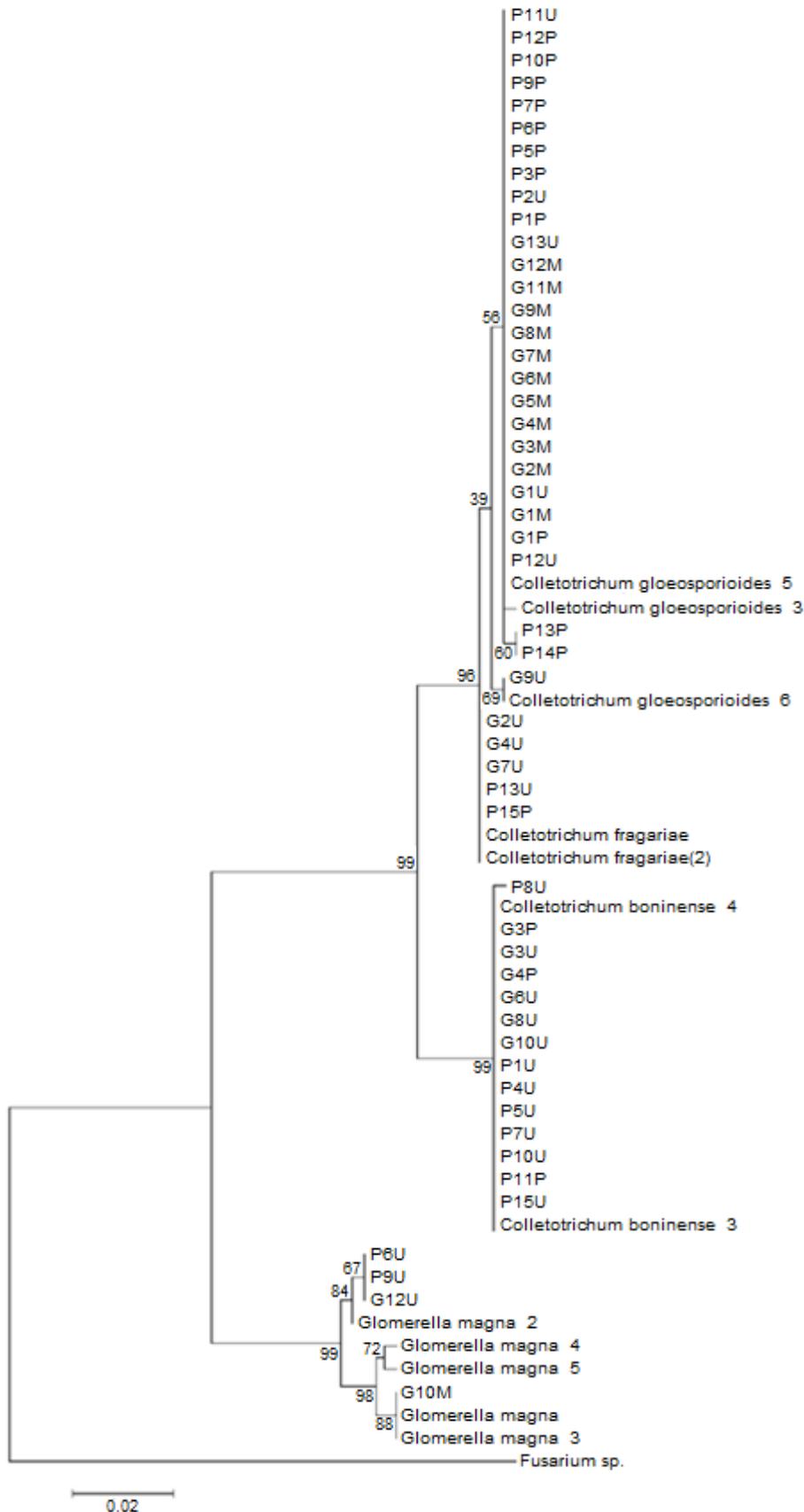
O G-II agrupou os 14 isolados de *C. boninense* (P1U, P4U, P5U, P7U, P8U, P10U, P15U, P11P, G3P, G3U, G6U, G8U, G10U e G4P), representando a segunda espécie mais frequente. *C. boninense* Moriwaki, Sato & Tsukib. 2003 é conhecido por causar machas foliares ou como endofítico de vários gêneros como: *Carapa*, *Catostemma*, *Cattleya*, *Clivia*, *Crinum*, *Cucumis*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Dracaena*, *Eperua*, *Eucalyptus*, *Euonymus*, *Goupia*, *Leucospermum*, *Manilkara*, *Mora*, *Passiflora*, *Protea* e *Prunus* (HYDE et al., 2009).

A espécie é um complexo formado por grupos distintos em sua morfologia e genética, com alguns sem teleomorfo conhecido (JOHNSTON et al., 2005), indicando que várias espécies ainda não descritas estejam incluídas em *C. boninense* (DAMM et al., 2010). Sua ocorrência em anonáceas ainda não foi relatada.

O G-III agrupou quatro isolados (P6U, P9U, G12U e G10M), os quais estão relacionados filogeneticamente com a espécie *G. magna*. Não existe nenhum relato dessa espécie infectando anonáceas no Brasil. *G. magna* foi descrita pela primeira vez infectando curcubitáceas nos Estados Unidos (JENKIN JR. & WINSTEAD, 1964). No Brasil, foi relatada infectando mamoeiro no nordeste do Brasil (NASCIMENTO et al., 2010). Neste estudo, não foi possível separar *G. magna* de *C. gloesporioides* com base nas características culturais e morfológicas. Contudo, baseando-se na sequência do rDNA, os resultados demonstraram que são duas espécies distintas. Resultados semelhantes foram encontrados por Du e colaboradores (2005) e Nascimento e colaboradores (2010), que também utilizaram as sequências de rDNA para separar as duas espécies.

Os resultados sugerem uma investigação no futuro, utilizando ainda o sequenciamento de regiões intrônicas de outros genes, como a β -tubulina, Fator alfa-1 de elongação da tradução (EF), Actina e GPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (MYLLYS et al., 2002; GUERBER et al., 2003).

Figura 6 – Filogenética construída com base em fragmentos de seqüências de rDNA (ITS4 e ITS5), utilizando o método deneighbor-joining. Uma análise de bootstrap foi feita com 1000 repetições.



Fonte: programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

Tabela 5 – Dados referentes à identidade molecular dos isolados de *Colletotrichum* quando comparadas suas sequencias com as do banco de dados do Genbank.

(continua)

Isolado	Identidade	Espécie	Nº de acesso	Score	Hospedeiro	Origem
P2U	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM989908.1	1009	Fructus Amomi	China
P4U	100%	<i>C. boninense</i>	EU822805.1	935	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Brasil
P5U	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1063	Abacate	México
P6U	100%	<i>G. magna</i>	HM163183.1	1062	Mamão	Brasil
P7U	99%	<i>C. boninense</i>	EU822802.1	1101	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Brasil
P8U	99%	<i>C. boninense</i>	EU822802.1	1101	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Brasil
P9U	99%	<i>G. magna</i>	JQ936.113.1	1062	Mamão	Brasil
P10U	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1074	Abacate	México
P11U	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1047	Herbácea	Tailândia
P12U	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM989908.1	1029	Fructus Amomi	China
P13U	100%	<i>C. fragariae</i>	GU174546.1	1021	x	Nova Zelândia
P15U	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1063	Abacate	México
P1P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1056	Herbácea	Tailândia
P3P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM989909.1	1021	Fructus Amomi	China
P5P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM989908.1	1029	Fructus Amomi	China
P6P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1023	Herbácea	Tailândia
P7P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1016	Herbácea	Tailândia
P8P	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	AJ301979.1	881	x	Alemanha
P9P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM989908.1	901	Fructus Amomi	China
P10P	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1059	Abacate	México
P11P	99%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1056	Abacate	México
P12P	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575258.1	1041	Citros	China
P13P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	FJ224109.1	901	<i>Cremastra appendiculata</i>	China
P14P	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM146134.1	1032	Citros	China
P15P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1023	Herbácea	Tailândia
G1M	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575266.1	1053	Citros	China
G2M	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575266.1	1055	Citros	China
G3M	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575266.1	1079	Citros	China
G4M	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	EU734577.1	1046	Graviola	Colômbia

Tabela 5 – Dados referentes à identidade molecular dos isolados de *Colletorichum* quando comparadas suas sequencias com as do banco de dados do Genbank.

(conclusão)

Isolado	Identidade	Espécie	N° de acesso	Score	Hospedeiro	Origem
G5M	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	JF441191.1	1038	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	Tailândia
G6M	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575266.1	1057	Citros	China
G7M	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575266.1	1046	Citros	China
G8M	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575266.1	1051	Citros	China
G9M	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	JN207312.1	1020	Endofítico de pastagens	Venezuela
G10M	100%	<i>Glomerella magna</i>	HM163196.1	1050	Mamão	Brasil
G11M	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1025	Herbácea	Tailândia
G12M	99%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266391.1	1021	Herbácea	Tailândia
G1U	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1023	Herbácea	Tailândia
G2U	100%	<i>C. fragariae</i>	GU174546.1	1032	x	Nova Zelândia
G3U	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1063	Abacate	México
G4U	100%	<i>C. fragariae</i>	GU174546.1	1025	x	Nova Zelândia
G6U	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1063	Abacate	México
G7U	100%	<i>C. fragariae</i>	GU174546.1	1021	x	Nova Zelândia
G8U	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1065	Abacate	México
G9U	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575223.1	1021	Citros	China
G10U	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1054	Abacate	México
G12U	100%	<i>G. magna</i>	HM163183.1	1057	Mamão	Brasil
G13U	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM575266.1	1052	Citros	China
G1P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	AY266389.1	1048	Herbácea	Tailândia
G2P	100%	<i>C. gloeosporioides</i>	HM989908.1	1041	Fructus Amomi	China
G3P	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1049	Abacate	México
G4P	100%	<i>C. boninense</i>	JN215365.1	1059	Abacate	México

4.5 Distribuição, frequência e considerações dos resultados sobre *Colletotrichum* spp. na população de pinha e graviola

Os vinte e oito isolados, o que correspondeu a 54,9% da população, foram geneticamente identificados como *C. gloeosporioides* foram encontrados em todos os municípios amostrados, com mesma incidência em folhas de pinha e graviola. Destaca-se também que no município de Maceió, numa área de plantação de gravioleira, todos os isolados foram identificados exclusivamente como sendo desta espécie. As sequências obtidas da região do rDNA corroboraram com a caracterização dos isolados em relação à morfologia dos conídios e apressórios. A coloração das colônias e a velocidade de crescimento micelial, no entanto, não foi suficiente para sua correta identificação, visto que a espécie *C. fragariae* apresenta características que se sobrepõe às desta espécie (SMITH & BLACK, 1990; GUNNEL & GLUBER, 1992; VILLANUEVA ARCE et al., 2005).

Os quatorze isolados de *C. boninense*, representando cerca de 27,45% do total, ocorreram apenas nos municípios de Palmeira dos Índios e União dos Palmares, sendo nove isolados de pinha e seis de graviola. Apesar desta espécie ainda não ter sido relatada em anonáceas, a morfologia dos conídios, referindo-se especialmente à pequena cicatriz em sua base e largura, foram muito úteis para distingui-la de *C. gloeosporioides* (MORIWAKI et al. 2003; TOZZE JÚNIOR, 2007). Os apressórios também ratificaram a espécie. Apesar da coloração das colônias ter se mostrado dentro dos parâmetros já relatados, a velocidade de crescimento micelial não pôde ser considerada confiável, já que foi muito maior que a taxa descrita por Moriwaki e colaboradores (2003).

Cinco isolados, representando aproximadamente 9,8%, tiveram suas sequências moleculares similares à *C. fragariae*. Estes patógenos foram encontrados apenas no município de União dos Palmares, tanto em gravioleira e pinheira, correspondendo a 7,5% da população. As análises morfológicas dos conídios e apressórios foram úteis na identificação, com exceção do comprimento dos conídios que foi menor que os diferentes valores já relatados por Smith & Black (1990), Howard & Albregts (1984) e Villanueva-Arce (2005), indicando que o valor encontrado pode ser mais uma variação. Quanto à coloração das colônias e velocidade de crescimento, estes não puderam ser considerados parâmetros para a determinação da espécie, pois características semelhantes também podem ser encontradas em *C. gloeosporioides*, como já aqui descrito.

Quatro isolados de *Glomerella magna*, representando 7,8% do total de isolados, dos quais, G12U e G10M foram coletados nos municípios de União dos Palmares e Maceió, respectivamente, infectando graviola e os isolados P6U e P9U são provenientes de União dos Palmares, infectando pinha.

No Brasil, apenas a espécie *C. gloeosporioides* é considerada o único agente etiológico da antracnose em pinheira e gravioleira. No entanto, a associação de espécies de *Colletotrichum* em uma mesma cultura já foi muitas vezes provada (FREEMAN et al., 1998), especialmente de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, em goiaba (PERES et al., 1998), uva (KUMMUANG et al., 1996), maçã (SHI et al., 1996), abacate e mamão (SIMMONDS, 1965), pêssigo e noz pecã (BERSTEIN et al., 1995), etc. Ainda, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. capsici* em maracujá (TARNOWSKI & PLOETZ, 2010); *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. fragariae* em morango (HOWARD et al., 1992; SANHUEZA & CALEGARIO, 2006); além de ocorrências também em curcubitáceas, pimenta e tomate (FREEMAN et al., 1998). Enquanto que a espécie *G. magna*, até o momento havia sido relatada apenas na cultura do mamoeiro (NASCIMENTO et al., 2010).

Esta associação de espécies de *Colletotrichum* foi também comprovada mais recentemente em algumas anonáceas. Na Colômbia, a identificação de *C. acutatum*, como também um dos responsáveis pela doença na gravioleira, foi possível através do uso de primers específicos, além de relatar a possibilidade da associação de outras espécies de *Colletotrichum*, quando aplicados testes para verificar variabilidade genética (ÁLVAREZ et al., 2004). Já no México, *C. fragariae* e *C. orbiculare* também foram encontrados em frutos de cherimóia (VILLANUEVA-ARCE et al., 2005; 2008).

5 CONCLUSÃO

De acordo com as características culturais e morfológicas, associadas à identificação molecular, há pelo menos quatro espécies responsáveis por causar antracnose em pinha e graviola no Estado de Alagoas: *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *Glomerella magna*.

Colletotrichum gloeosporioides é a espécie de maior ocorrência, associada à antracnose da pinheira e gravioleira nos municípios de Palmeira dos Índios, União dos Palmares e Maceió.

As características culturais não foram suficientemente confiáveis para a identificação de *Colletotrichum* spp.

Este é o primeiro relato no Brasil de ocorrência de *C. boninense*, *C. fragariae* e *G. magna* nessas culturas.

REFERÊNCIAS

ABPA (Associação Brasileira de Produtores de Anonáceas – Annonas Brazil). 2007. Disponível em: <http://anonasbrazil.org/materia_tecnica01.htm>. Acesso em 15 de outubro de 2011.

ADAB (Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia). Agricultores familiares discutem sobre o cultivo da graviola na Bahia. 2011. Disponível em: <<http://www.adab.ba.gov.br/modules/news/article.php?storyid=1371>>. Acesso em 15 de outubro de 2011.

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

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from *Tamarillo*, *Passiflora*, and *Mango* in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, v. 93, p. 579-587, 2003.

ALBUQUERQUE, H. C. Situação, atual e perspectivas para as anonáceas no Estado de Alagoas. In: SÃO 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. 1997. 150-152 p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

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.

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

BATISTA, M. M. F.; VIÉGAS, I. de J. M.; FRAZÃO, D. A. C.; THOMAZ, M. A. A.; SILVA, R. de C. L. da. 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.

BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 90-92, 1999.

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

BLEICHER, E. & MELO, Q. M. S. Pragas da graviola. In: CARDOSO, J. E. (eds). **Graviola: fitossanidade**. Brasília: Embrapa, 2002. 47 p. (Futas do Brasil, 20).

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

CAMPOS, R. S. **Estudos de biologia floral e polinização natural e artificial da pinha (*Annona squamosa* L.) e atemóia (*Annona squamosa* x *Annona cherimola* L.)**. 2002. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo.

CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; FREIRE, F das C. O.; SANTOS, A. A. dos. **Graviola: fitossanidade**. Brasília: Embrapa, 2002. 47 p. (Futas do Brasil, 20).

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, 2000, 52 p. (Circular técnica 9).

CORREIA, K. C.; MATINS, R. B.; CÂMARA, M. P. S.; MICHEREFF, S. J. Escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em pinha. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1-4, 2011.

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.; BARONCELLI, R.; CAI, L.; KUBO, Y.; O'CONNELL, R.; WEIR, B.; YOSHINO, K.; CANNON, P. F. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. **IMA Fungus**, v. 1, p. 161-165, 2010.

DODD, J. C., ESTRADA, A., JEGER, M. J. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in the tropics. In: BAYLEY, J. A., JEGER, M. J. (Eds.). ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CAB International, 1992. 308-325 p.

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

DU, M.; SCHARDL, C. L.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. ***Mycologia***, v. 97 641-658, 2005.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN. 1998. 220 p.

FIGUEIREDO, J. E. F.; PAOLI, H. C.; COELHO, V. T. S.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; BRESSAN, W.; GUIMARÃES, C. T.; GOMES, E. A. **Caracterização molecular de microrganismos do ecossistema agrícola do Cerrado: III – *Acremonium strictum***. Sete Lagoas: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003, 10 p. (Comunicado Técnico 69).

FITZELL, R. D. Epidemiology of anthracnose disease of avocados. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, v. 10, p. 113-116, 1987.

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

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

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

FREIRE, F. das C. O.; CARDOSO, J. E. Doenças das anonáceas. In: SÃO 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, 1997. 196-213 p.

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

FURTADO, E. L., BACH, E. B., KIMATI, H., MENTEN, J. O. M. & SILVEIRA, A. P. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 222-227, 1999.

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

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, p. 872-895, 2003.

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

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

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

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z.; McLAUGHLIN, J. L. Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 97-99, 1996.

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.

HOWARD, C. M. & ALBREGTS, E. E. Cassia obtusifolia, a possible reservoir for inoculum of *Colletotrichum fragariae*. **Phytopathology**, v. 63, p. 533-534, 1984.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity, v. 39, p. 147-182, 2009. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-7.pdf>>. Acesso em 11 de outubro de 2011.

JENKIN JR., S. F.; WINSTEAD, N. N. *Glomerella magna*, cause of a new anthracnose of cucurbits. **Phytopathology**, v. 54, p. 452-454, 1964.

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.; PENNYCOOK, S. R.; MANNING, M. A. Taxonomy of fruitrotting fungal pathogens: what's really out there? **Plant Protection**, v. 58, p. 42-46, 2005.

KAVATI, R. O. Cultivo da *Atemoya*. **Fruticultura Tropical**, p. 39-70, 1992.

KUMMUANG, N.; SMITH, B. J.; DIEHL, S. V.; GRAVES JR.; C. H. Muscadine grape berry rot diseases in Mississippi: disease epidemiology and crop reduction. **Plant Disease**, v. 80, p. 244-247, 1996.

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, 1990. 149-158 p.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 470-475, 2002.

LIMA, E. F. & CHAVES, G. M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 61-66, 1992.

LIMA, M. A. C. O cultivo da gravioleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 385-566, 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.

LIU, B.; MUNSTER, M.; JOHNSON, C.; LOUWS, F. J. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae* on cyclamen in North Carolina. **Plant Disease**, v. 95, p. 1480-1480, 2011.

LOPEZ, A. M. Q. Doenças das anonáceas e do urucuzeiro. 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., v. 2. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005. 73-77 p.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Eds.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas Ltda. 2001. 291-337 p.

MACKENZIE, S. J.; MERTELY, J. C.; SEIJO, T. E.; PERES, N. A. *Colletotrichum fragariae* is a pathogen on hosts other than strawberry. **Plant Disease**, v. 92, p.1432-1438, 2008.

MACKENZIE, S. J.; SEIJO, T. E.; LEGARD, D. E.; TIMMER, P. W.; PERES, N. A.. Selection for pathogenicity to strawberry in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from native plants. **Phytopathology**, v. 97, p. 1130-1140, 2007.

MANICA, I.; ICUMA, I. M.; JUNQUEIRA, K. P.; OLIVEIRA, M. A. S.; CUNHA, M. M.; OLIVEIRA JÚNIOR, M. E.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ALVES, R. T. **Frutas Anonáceas (ata ou pinha, atemólia, cherimólia e graviola): tecnologia de produção, pós-colheita, mercado.** Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, 596 p., 2003.

MELLO, N. T. C.; NOGUEIRA, E. A.; MAIA, M. L. Atemólia: perspectivas para a produção paulista. **Informações Econômicas**, v. 38, p.7-13, 2003.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. S23-S24, 2002.

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

MERCURE, E. W.; KUNOH, H. & NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 45, p. 407-420, 1994.

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.

MORALES, C. F. & MANICA, I. Moléstias e pragas. In: MANICA, I. **Fruticultura: cultivos das Anonáceas (ata, cherimólia, graviola).** Porto Alegre: UFRS. 1994. 78-91 p.

MORIWAKI, J.; SATO, T. & TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. from Japan. **Mycoscience**, v. 44, p. 47-53, 2003.

MUNIZ, M. de F. S.; SANTOS, R. de C. R. dos; BARBOSA, G. V. de S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 177-179, 1998.

NASCIMENTO, R.J.; MIZUBUTI, E.S.G.; CÂMARA, M.P.S.; FERREIRA, M.F.; MAYMON, M.; FREEMAN, S.; MICHEREFF, S.J. First report of papaya fruit rot caused by *Colletotrichum magna* in Brasil. **Plant Disease**, v. 94, p. 1506, 2010.

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**. 1ª ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. 148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde)

NEVES, E. M. Exportação de frutas de mesa: sinais de Mercado. **Preços Agrícolas**, v. 2, p. 27-28, 1997.

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

OLIVEIRA, Z. P.; QUEIROZ, M. F.; BARROS, P. G.; CAMPOS, R. S.; LEMOS, E. E. P.; SILVA NETO, J. P. **Recomendações técnicas para a cultura da pinha**. Maceió: SEAGRI-AL. 2005. 56 p.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

PERES, N. A. R.; SOUZA, N. L.; ZITKO, S. E.; TIMMER, L. W. Activity of Benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 86, p. 620-624, 2002.

PERES, N. A. R.; TIMMER, L. W.; ADASKAVEG, J. E.; CORREL, J. C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 89, p. 784-796, 2005.

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**, v. 150, p. 128-134, 2002.

PINTO, A. C. de Q.; CORDEIRO, M. C. R.; ANDRADE, S. R. M; FERREIRA, F. H.; FILGUEIRAS, H. A. de C.; ALVES, R. E.; KIMPARA, D. J. Annona species. **Fruits for the future**. v. 5. Southampton: University of Southampton. 2005. 263 p.

PINTO, A. C. DE Q. & SILVA, E. M. da S. **A cultura da graviola**. Brasília: Embrapa. 1995. 106 p. (Coleção Plantar)

RAKOTOMANGA, M.; RAZAKANTOANINA, V.; RAYNAUD, S.; LOISEAU, P. M.; HOCQUEMILLER, R.; JAUREGUIBERRY, G. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. **Journal of Chemotherapy**, v. 16, p. 350-356, 2004.

RAMOS, V. H. V.; PINTO, A.C. Q.; RODRIGUES, A. A. Introdução e importância socioeconômica. In: PINTO, A. C. de Q.; RODRIGUES, A. A.; SILVA, E.M. da; ANDRADE, G. A.; ICUMA, I. M.; AGUIAR, J. L. P.; OLIVEIRA, M. A. S.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ALVES, R. T.; RAMOS, V. H.V. **Graviola: produção: aspectos técnicos**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica. 2001. p. 9.

RAYNAUD-LE GRANDIC, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 388-392, 2004.

RIBEIRO, G. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; AMARAL, C. L. F. Aspectos da biologia floral relacionados à produção de frutos de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, p. 369-373, 2007.

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

SÃO 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: DFZ/UESB, 310 p., 1997.

SAUQUET, H., DOYLE, J. A., SCHARASCHKIN, T., BORSCH, T., HILU, K., CHATROU, L. W. & LE THOMAS, A. 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**. 2007. 87 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de São Paulo / FCAV, Jabotical.

SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária). Bahia lidera a produção mundial de graviola. 2010. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping¬id=21733>>. Acesso em 15 de outubro de 2011.

SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária). Cultura da pinha gera emprego e renda. 2007. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping¬ed=11054>>. Acesso em 15 de outubro de 2011

SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária). Seagri discute comercialização e agroindustrialização da graviola. 2011. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping¬id=23209>>. Acesso em 15 de outubro de 2011.

SERRA, I. M. R. S. S.; COELHO, R. S. B.; MENEZES, M. M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multiespóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 4, p. 113-120, 2008.

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

SHIRWAIKAR, A.; RAJENDRAN, K.; KUMAR, C. D. In vitro antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, p. 803-807, 2004.

SILVA, A. Q. da & SILVA, H. Nutrição e adubação em anonáceas. In: SÃO 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. 1997. p. 118-137.

SILVA, F. de A. S. e & AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical attendance. In: **7th World Congress on Computers in Agriculture**. St. Joseph: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, S. E. L. da & GARCIA, T. B. **A cultura da gravioleira (*Annona muricata* L.)**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 1999. 19 p.

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

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

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

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. 1992. p. 1-26.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, 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. 786-787, 2010.

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**. Brasília : Ministério da Ciência e Tecnologia. 2006. 31 p. (Documento científico). Disponível em: < <http://www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc>>. Acesso em 28 dezembro de 2010.

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

VIANA, J. S. Implantação de um pomar de pinha irrigado no Distrito Federal. Brasília: UPIS – Faculdades Integradas. 2005. 24p. (Boletim técnico). Disponível em: < <http://www.upis.br/>>

[pesquisas/pdf/agronomia/projeto_empresarial/Jonathan%20Boletim%20T%C3%A9cnico.pdf](#)>. Acesso em 15 de janeiro de 2011.

VILLANUEVA-ARCE, R.; HERNÁNDEZ-ANGUIANO, A. M.; YÁÑEZ-MORALES, M. de J.; TÉLIZ-ORTÍZ, D.; MORA-AGUILERA, A.; CÁRDENAS-SORIANO, E.; CASTAÑEDA VILDÓZOLA, A. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. **Agrociencia**, v. 39, p. 93-106, 2005.

VILLANUEVA-ARCE, R.; YÁÑEZ-MORALES, M. de J. & HERNÁNDEZ-ANGUIANO, A. M. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Agrociencia**, v. 42, p. 689-701, 2008.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J.. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY J. J.; WHITE, T. J. (eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press. 1990. p. 315-322.

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. 2007. p. 42.