

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

NATASHA AKEMI HAMADA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE  
*Colletotrichum* spp. EM MACIEIRA

FLORIANÓPOLIS  
2005

NATASHA AKEMI HAMADA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE  
*Colletotrichum* spp. EM MACIEIRA**

Dissertação de mestrado do programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Dra. Adriana Cibele de Mesquita Dantas

**FLORIANÓPOLIS  
2005**

## *DEDICO*

Aos meus pais, Francisco e Maria Cristina, meus alicerces em todos os momentos, e aos quais me faltam palavras para descrever o quanto amo...

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Adriana Cibele de Mesquita Dantas, pelos ensinamentos e orientação deste trabalho;

A Epagri, Estação Experimental de São Joaquim, seus pesquisadores e funcionários, em especial ao pesquisador Yoshinori Katsurayama pelas sugestões, ensinamentos e constante apoio na realização deste trabalho;

Ao laboratorista Iran de Souza, pelo companheirismo e pelo decisivo apoio nos trabalhos de laboratório;

Ao professor Dr. Rubens Onofre Nodari, pelas sugestões e apoio;

Aos professores do programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC, pelos conhecimentos repassados;

A laboratorista Maria Luisa Peixoto, pela amizade, lanchinhos, e apoio nos meus tantos “pedidos de socorro”;

Aos amigos do laboratório que tanto me ensinaram, apoiaram e me fizeram rir nos momentos estressantes em dias de trabalho, Celso, Maguida, Sarah, Cristina, Kadine, Douglas, Nadia, Ricardo, Diogo, Karine, Luciano, Shirley, Monita;

Aos meus irmãos queridos pelo apoio e motivação em todos os momentos;

A família Fabre, por ter me recebido em sua casa e pela amizade que se criou;

As minhas grandes amigas “superpoderosas” Sandra e Mariane, pelos momentos maravilhosos que passamos juntas e amizade verdadeira;

A todos os amigos que me agüentaram nos momentos difíceis e nem por isso perderam o bom humor;

A linda e maravilhosa praia Mole, pela beleza, banhos de mar e momentos inesquecíveis...

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

Principalmente a Deus, por me proporcionar força e perseverança nos momentos mais difíceis.

## CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. em macieira

**Autora: Eng. Agr. Natasha Akemi Hamada**

**Orientadora: Dr. Adriana Cibeles de Mesquita Dantas**

### RESUMO

Com o estabelecimento de 39 isolados em cultivo *in vitro* foi realizada a caracterização morfológica pela qual foram observadas duas espécies, *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*. *C. acutatum* apresentou crescimento mais lento em meio BDA, insensibilidade ao fungicida benomyl, massa de conídios de coloração salmão, conídios de formato fusiforme, com uma ou ambas as extremidades afuniladas, e tamanho variando entre 4,3 – 4,8 x 11,4 – 13,9 µm. Isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram crescimento mais rápido em meio BDA, sensibilidade ao fungicida benomyl, formação de peritécios e conídios retos com ápices obtusos e bases às vezes truncadas com tamanho variando entre 4,7 - 5,5 x 13,4 – 18,0 µm. Dentre os isolados classificados como *C. gloeosporioides* foi observado um grupo resistente ao fungicida benomyl, composto pelos isolados 17, 18, 19, 20 e 21, todos provenientes do município de Palmeira, PR. Teste de patogenicidade foi realizado nas cultivares Gala (suscetível) e Fuji (resistente). Somente os isolados provenientes de *C. gloeosporioides* causaram sintomas típicos de Mancha da Gala (MG) tanto em folhas como nos frutos da cv. Gala. Os isolados de *C. acutatum* não causaram sintomas de MG em folhas, e em frutos ocasionaram sintomas típicos de Podridão Amarga (PA). Nenhum dos isolados de ambas as espécies mostrou-se patogênico para a cv. Fuji. No estudo de geração de heterocariontes, foi observada a formação destes nos pareamentos dos isolados 17 x 18, 26 x 27, 27 x 28 e 32 x 33. Os heterocariontes não apresentaram diferenças significativas nas características morfológicas e culturais quando comparados aos isolados que lhes deram origem. Entretanto, no teste de patogenicidade os isolados H10, H11 e H12 não foram patogênicos quando inoculados em folhas de ambas as cultivares. A caracterização molecular de 39 isolados e 15 heterocariontes foi realizada com 10 iniciadores RAPD, que revelaram 165 bandas polimórficas, com peso molecular variando entre 0,35–2,5 kb. Pela análise de similaridade genética calculada pelo coeficiente de Jaccard, se agrupou os isolados em 7 grupos. O primeiro grupo apresentou 100% de similaridade genética e foi representado pelos isolados 1 e 2, provenientes de Caçador; o segundo grupo foi formado pelos isolados 31, 32, 33, 34, de Fraiburgo e 35, 36 e 37, de Palmas, apresentando similaridade variando entre 80 – 100%. O terceiro grupo foi formado pelos heterocariontes H10, H11 e H12, com similaridade variando entre 83 – 86,5%. O quarto grupo foi formado por 25 isolados, os quais causaram sintomas de MG em folhas da cv. Gala, com similaridade genética variando de 91,0 – 100%, oriundos de diversas localidades. O quinto grupo foi formado pelos heterocariontes H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14 e H15 com coeficiente de similaridade entre 58 – 97%. Os isolados 7 e 8 formaram o sexto grupo, de Frei Rogério, apresentando similaridade de 98%. O sétimo grupo formado pelos isolados 38, 39 e 40, apresentaram 100% de similaridade genética, procedentes de São Joaquim. Não houve relação direta entre os grupos formados pelo teste de patogenicidade e pela análise molecular, sendo que este último tipo de análise detectou um maior polimorfismo entre os isolados trabalhados.

## MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION, PATHOGENIC AND MOLECULAR OF ISOLATES OF *Colletotrichum* spp. IN APPLE

**Author: Eng. Agr. Natasha Akemi Hamada**

**Adviser: Dr. Adriana Cibele de Mesquita Dantas**

### ABSTRACT

With the establishment of 39 isolated *in vitro* was realized the morphologic and cultural characterization, which had been observed two species, *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Colletotrichum acutatum* showed slower growth in BDA medium, insensibility to the fungicide benomyl, presence of conidial mass of coloration salmon, conidia whit cylindrical or elliptical format, with one or both the funneled extremities, of size varying between 4,3 - 4,8 x 11,4 - 13,9  $\mu\text{m}$ . Isolated of *Colletotrichum gloeosporioides* showed faster growth in BDA medium, sensitivity to the fungicide benomyl, formation of peritecia in culture medium and conidia with obtuse apexes and bases truncated sometimes, of size varying between 4,7 - 5,5 x 13,4 - 18,0  $\mu\text{m}$ . Amongst the isolates classified as *C. gloeosporioides* was observed a resistant group to the fungicide benomyl, being this group composed for the isolates 17, 18, 19, 20 and 21, all they proceeding from Palmeira, PR. The pathogenicity test showed that only isolates of *C. gloeosporioides* caused typical symptoms of Gala Leaf Spot (GLS) in leafs and fruits of apple, cv Gala. Isolates of *C. acutatum* had not caused symptoms in leafs, and in fruits they had caused typical symptoms of Bitter Rot (BR). None of the isolates, of both the species, was pathogenic to cv Fuji. In the study of generation of heterocaryons, was observed the formation of these in the pareamentos of the isolates 17 x 18, 26 x 27, 27 x 28 and 32 x 33. Heterocaryons has been showed very similar to your isolates origin to them, when had been analyzed the morphologic and cultural characteristics; however, in the pathogenicity test the isolates H10, H11 and H12 had not been pathogenic when inoculated in leafs of apple to cultivate Gala and Fuji. The molecular characterization of 39 isolates and 15 heterocaryons was carried through 10 primers of RAPD, which revealed 165 polymorphic bands, with molecular weight varying between 0,35 - 2,5 kb. Through the genetic similarity calculated by the coefficient of Jaccard had a tendency of grouping the isolates in accordance with your place of origin, totalizing 7 groups, where 2 isolates (1 and 2) remained in a first group, showing identical genetically, the second group was constituted by the isolates 31, 32, 33, 34, 35, 36 and 37, and showed similarity coefficient varying between 80 - 100%. The third group was formed by heterocariontes H10, H11 and H12, that had similarity varying between 83 - 86,5%. The fourth group was formed by 25 isolates, and all they caused symptoms of Gala Leaf Spot in leafs of apple of cultivating Gala; the isolates that was constitute the fourth group was 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 and 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29 and 30; being the genetic similarity between the isolates of this group varied between 91,0 - 100%. The fifth group was formed by heterocaryons H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14 and H15; the coefficient of similarity between these isolates varied between 58 - 97%. Isolates 7 and 8 formed the sixth group, showed coefficient of genetic similarity of 98%. The seventh group was formed by the isolates 38, 39 and 40, that showed identical genetically. It did not have direct connection between the groups formed by the pathogenicity test and the molecular analysis.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
A CULTURA DA MACIEIRA NO BRASIL .....	2
O GÊNERO <i>Colletotrichum</i> .....	4
A MANCHA DA GALA .....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	8
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
Objetivo geral .....	12
Objetivos específicos .....	12
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E SENSIBILIDADE AO BENOMYL</b>	
INTRODUÇÃO .....	13
MATERIAL E METODOS .....	14
1. Coleta, isolamento e incubação, isolamento monospórico .....	14
2. Avaliação das características morfológicas .....	18
3. Avaliação das características culturais das colônias .....	19
4. Delineamento experimental e análise estatística .....	19
RESULTADOS .....	20
1. Determinação da taxa de crescimento dos isolados .....	20
2. Sensibilidade dos isolados ao fungicida benomyl .....	24
3. Determinação das características culturais das colônias .....	30
4. Caracterização morfológica dos conídios .....	33
DISCUSSÃO .....	36
CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM CULTIVAR RESISTENTE E SUSCETÍVEL</b>	
INTRODUÇÃO .....	44
MATERIAL E MÉTODOS .....	45
1. Material vegetal .....	45
2. Isolados e inoculação .....	45
3. Inoculação dos isolados em folhas .....	46
4. Inoculação dos isolados em frutos .....	46
5. Delineamento experimental e análise estatística .....	47
RESULTADOS .....	47

1. Inoculação dos isolados em folhas.....	47
2. Inoculação dos isolados em frutos .....	51
DISCUSSÃO .....	58
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
<b><u>CAPÍTULO III</u></b>	
<b>GERAÇÃO DE HETEROCARIONTES DE <i>Colletotrichum</i> spp</b>	
INTRODUÇÃO .....	65
MATERIAL E MÉTODOS .....	66
1. Obtenção de mutantes não utilizadores de nitrato (mutantes <i>nit</i> ) .....	66
2. Formação dos heterocariontes.....	66
4. Avaliação das características morfológicas.....	68
6. Delineamento experimental e análise estatística .....	70
7. Determinação da patogenicidade dos heterocariontes .....	70
RESULTADOS .....	71
1. Obtenção de mutantes não utilizadores de nitrato (mutantes <i>nit</i> ) .....	71
2. Geração dos Heterocariontes .....	73
3. Avaliação das características culturais e morfológicas dos heterocariontes .....	75
4. Caracterização morfológica dos conídios.....	84
4. Determinação da patogenicidade dos heterocariontes .....	86
DISCUSSÃO .....	88
CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
<b><u>CAPÍTULO IV</u></b>	
<b>ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE <i>Colletotrichum</i> spp</b>	
INTRODUÇÃO .....	92
MATERIAL E MÉTODOS .....	93
1. Crescimento e liofilização dos isolados.....	93
2. Extração e quantificação de DNA.....	93
3. Reações de amplificação .....	94
RESULTADOS .....	95
1. Quantificação de DNA.....	95
2. Análise RAPD .....	96
TGCCGAGCTG .....	96
DISCUSSÃO .....	100
CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>105</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Origem dos isolados (pomar e localidade) coletados nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.....	16
Tabela 2. Isolados de <i>Colletotrichum</i> selecionados para a realização do trabalho e seus respectivos locais de origem.....	17
Tabela 3. Análise da variação para o diâmetro médio das colônias e para a taxa de crescimento dos isolados repicados em meio BDA, após 6 dias de incubação. ....	20
Tabela 4. Diâmetro das colônias e taxa de crescimento de <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de macieira, oriundos de diversas regiões produtoras do Brasil, inoculados em meio BDA. ....	21
Tabela 5. Análise da variação para o diâmetro médio das colônias de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. após 6 dias de incubação. ....	24
Tabela 7. Análise da variação para a taxa de crescimento das colônias de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. após 6 dias de incubação.....	25
Tabela 8. Sensibilidade ao benomyl, diâmetro das colônias e taxa de crescimento de. isolados de <i>Colletotrichum</i> spp em macieira, oriundos de diversas regiões, em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida (0, 5 e 100 µg.mL <sup>-1</sup> ). ....	26
Tabela 9. Características culturais de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de macieira, oriundos de diversas regiões produtoras do Brasil.....	32
Tabela 10. Características morfológicas dos conídios e classificação da espécie dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	35

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Análise da variação para a percentagem de incidência de doença observada em folhas de macieira da cultivar Gala. ....	49
Tabela 2. Percentagem de incidência e severidade média observada nos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. de macieira, oriundos de diversas regiões produtoras do Brasil, inoculados em ramos da cultivar Gala. ....	50
Tabela 3. Análise da variação para a percentagem de incidência de doença ocasionada por isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos da cv Gala, com e sem ferimento. ....	53
Tabela 4. Análise da variação para a percentagem de incidência de doença ocasionada por isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em frutos da cv Fuji, com e sem ferimento.....	53

Tabela 5. Percentagem de incidência e número médio de lesões observadas de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. inoculados em frutos de macieira, cultivares Gala e Fuji. ....	56
--	----

### **CAPÍTULO III**

Tabela 1. Pareamentos realizados entre os isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio MM. ....	67
Tabela 2. Tabela de contingência do local de origem dos isolados de Mancha Foliar e Podridão Amarga e das diferentes concentrações de KClO <sub>3</sub> , para a variável número de colônias. ....	73
Tabela 3. Denominação dos heterocariontes formados através de pareamento de discos de micélio de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio mínimo, de acordo com os isolados dos quais tiveram origem. ....	75
Tabela 4. Análise da variação para o diâmetro médio das colônias e para a taxa de crescimento dos heterocariontes e seus isolados de origem, repicados em meio BDA, após 6 dias de incubação	76
Tabela 5. Diâmetro das colônias e taxa de crescimento de heterocariontes de <i>Colletotrichum</i> spp. e de seus isolados de origem, em meio BDA. ....	76
Tabela 6. Análise da variação para o diâmetro final das colônias de heterocariontes de <i>Colletotrichum</i> spp. e de seus isolados de origem após 6 dias de incubação. ....	77
Tabela 8. Análise da variação para a taxa de crescimento das colônias de heterocariontes de <i>Colletotrichum</i> spp. e seus isolados de origem após 6 dias de incubação. ....	78
Tabela 9. Sensibilidade ao benomyl, diâmetro das colônias e taxa de crescimento de heterocariontes de <i>Colletotrichum</i> spp., em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida (5 µg.mL <sup>-1</sup> e 100 µg.mL <sup>-1</sup> ). ....	80
Tabela 10. Características culturais de heterocariontes de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	82
Tabela 11. Características dos conídios dos heterocariontes de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	86
Tabela 12. Percentagem de incidência e severidade média dos heterocariontes de <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de macieira, inoculados em tecido foliar da cultivar Gala. ....	87

### **CAPÍTULO IV**

Tabela 1. Primers, seqüência de nucleotídeos, número e peso molecular obtido na amplificação dos iniciadores RAPD em isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	96
--	----

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I**

- Figura 1. Colônia de *Colletotrichum* spp. ocupando quase toda a placa de petri, 7 dias após a repicagem. ....22
- Figura 2. Diâmetro das colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de macieira, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem, em meio BDA. ....23
- Figura 3. Isolados de *Colletotrichum* spp. submetidos a meio de cultura BDA suplementado com fungicida benomyl (100 mg.mL<sup>-1</sup>). A – Isolado sensível (10, oriundo de Curitiba, SC); B- isolado resistente (20, proveniente de Campo Tenente, PR). ....25
- Figura 4. Diâmetro das colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de macieira, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem, em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida benomyl. A, B e C - 5 mg.mL<sup>-1</sup>; D, E e F - 100 mg.mL<sup>-1</sup>. ....29
- Figura 5. Colônia de *Colletotrichum* spp. apresentando formação de setores em meio de cultura BDA. A – vista frontal da placa de petri; B- vista do verso da placa de petri. ....31
- Figura 6. Colônias de *Colletotrichum* representativas de cada um dos três grupos formados no presente estudo. A- Grupo I; B- Grupo II; C- Grupo III. ....31
- Figura 7. Peritécios formados por *Colletotrichum* spp. em meio BDA (A) e vistos em microscópio óptico (40X) (B). ....32
- Figura 8. Conídios de *Colletotrichum* spp. observados em aumento de 40 X, através de contraste de fase. A - isolado 1 (proveniente de Caçador, SC); B - isolado 10 (proveniente de Curitiba, SC); C – isolado 38 (proveniente de São Joaquim, SC). ....34

### **CAPÍTULO II**

- Figura 1. Ramos de macieira cv Gala inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp. apresentando dois tipos diferentes de sintomas: lesões típicas de Mancha da Gala (A) e pontuações de Mancha necrótica (B). ....48
- Figura 2. Sintomas provocados pelos isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em frutos de macieira, cv Gala. A- lesões típicas de MG. B- Lesões típicas de PA. ....52

### **CAPÍTULO III**

- Figura 1. Número de colônias apresentando crescimento de 39 isolados de *Colletotrichum* submetidas a diferentes concentrações de KClO<sub>3</sub>. A- 1,5% B- 3,0% C- 4,5% D- 6,0% em 3, 6 e 9 dias após cultivo. ....72

- Figura 2. Pareamento dos isolados 32 e 33 em MM (3 semanas após a repicagem), inicialmente mantidos em meio extrato de malte +  $\text{KClO}_3$  (1,5%). Vistas verso (a) e reverso da placa (b). .....74
- Figura 3. Diâmetro das colônias (mm) de 15 heterocariontes formados de *Colletotrichum* spp. ....77
- Figura 4. Diâmetro das colônias (mm) de heterocariontes de *Colletotrichum* spp. oriundos de macieira, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem, em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida benomyl. A - 5 mg.mL<sup>-1</sup>; B - 100 mg.mL<sup>-1</sup>. .....81
- Figura 5. Colônias dos heterocariontes de *Colletotrichum* spp. A- *C. gloeosporioides*; B- *C. acutatum*. 83
- Figura 6. Peritécio de *Colletotrichum gloeosporioides* apresentando ascas em seu interior. Foto em contraste de fase.....84
- Figura 7. Conídios de alguns dos isolados dos heterocariontes de *Colletotrichum* spp. observados em aumento de 40 X, através de contraste de fase. Isolados H10 (A) e H13 (B). .....85

#### **CAPÍTULO IV**

- Figura 1. Gel de quantificação do DNA micelial de 24 isolados de *Colletotrichum* spp. Em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) .....96
- Figura 2. Polimorfismo gerado pelo iniciador OPA 19 em 39 isolados de *Colletotrichum* spp. em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). .....97
- Figura 3. Polimorfismo gerado pelo iniciador OPA 07 em 39 isolados de *Colletotrichum* spp. A flecha mostra os isolados 17, 18, 19, 20 e 21 resistentes ao benomyl com bandas monomorfas. ....97
- Figura 4. Dendograma gerado a partir da análise de bandas obtidas por iniciadores RAPD em 39 isolados e 15 heterocariontes de *Colletotrichum*. .....99
- Figura 5. Polimorfismo gerado pelos iniciadores RAPD OPB01 (esquerda) e OPD18 (direita) entre heterocariontes de *Colletotrichum* spp e seus isolados de origem.....100

## INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus domestica* Bork.) é uma espécie frutífera lenhosa, decídua, temperada, pertencente à família *Rosaceae*. É uma planta adaptável aos mais diferentes climas, crescendo desde os trópicos até altas latitudes (IUCHI, 2002). A cultura da macieira, embora presente no Brasil desde a chegada dos colonizadores europeus, só começou a ganhar expressão econômica a partir da década de 60, com a fundação da Safra (Sociedade Agrícola Fraiburgo Ltda) no município de Fraiburgo/ SC (ABPM, 2003).

Atualmente, a produção de maçãs é uma atividade consolidada no Brasil, exercendo uma grande importância sócio-econômica no país. A produção brasileira de maçã concentra-se nos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, responsáveis por cerca de 90% da produção nacional, com área plantada atualmente de aproximadamente 31.000 ha (ABPM, 2003). A previsão de crescimento da produção brasileira de maçã tem sido superada ao longo dos últimos anos; pomares novos continuam sendo implantados a taxas de 10 a 15% ao ano (PEREIRA, 2004).

Várias são as dificuldades encontradas no cultivo desta espécie, entre estas se destaca a falta de adaptação das plantas em algumas regiões, devido à falta de fatores edafoclimáticos relacionados à temperatura, altitude, precipitação, entre outros fatores (PETRI, 2002). Além disto, os produtores se defrontam, desde a implantação da cultura, com a incidência de diversas doenças, sendo que entre estas, as principais são a Sarna, causada pelo fungo *Venturia inaequalis* e a Mancha da Gala, causada por *Colletotrichum* spp.

A Mancha da Gala (MG), também conhecida como Mancha Foliar de *Glomerella*, ou Mancha Foliar da Gala, pode causar desfolhamento superior a 75% e conseqüentemente afetar a produção nos anos seguintes. Essa doença vem se disseminando e aumentando sua incidência a cada ciclo produtivo, por todas as regiões produtoras de maçã do Brasil (BONETI et al., 1998).

É relatado que três espécies de *Colletotrichum* estão associadas à Mancha da Gala, sendo elas *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, sendo as duas primeiras mais agressivas (KATSURAYAMA et al. 2000).

Tradicionalmente, as espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas através da caracterização morfológica, tais como a morfologia conidial, presença ou ausência de setas, presença ou não da forma perfeita *Glomerella cingulata* e da cor da colônia (GUNNEL & GUBLER, 1992). Entretanto, quando se trata de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum*, a utilização desses parâmetros morfológicos de classificação nem sempre tem sido eficiente devido a grande variabilidade existente dentro de cada espécie (COX & IRWIN, 1988). Deve-se salientar ainda, que avaliações morfológicas possibilitam apenas distinção ao nível de espécie, não identificando possíveis formas intermediárias entre espécies.

Neste contexto, a diferenciação entre espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* é importante para a implementação de eficientes estratégias de controle, as quais serão úteis em programas de melhoramento visando à caracterização da resistência ao *Colletotrichum* spp. Com este trabalho, objetivou-se a caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. através da morfologia, sensibilidade a benomyl, patogenicidade, geração de heterocariontes e análise por marcador molecular.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **A CULTURA DA MACIEIRA NO BRASIL**

Atualmente, uma das principais frutas comercializadas no Brasil é a maçã (*Malus domestica* Borkh) e os estados da Região Sul são os seus principais produtores. O Estado de Santa Catarina, o principal produtor, responde com 52% dos hectares plantados, e por 52% da produção nacional. O Estado do Rio Grande do Sul responde por 42% da área plantada e por 44% da produção, enquanto que o Estado do Paraná possui 6% da área plantada no país e responde por 4% da produção (BONETI et al., 2002a).

No Brasil, o cultivo da macieira é recente e se estabeleceu através de grandes empresas, atraídas por incentivos de políticas públicas. Durante os 30 anos de cultivo comercial, a produção nacional da fruta, que em 1973 era de 1.528 toneladas, cresceu para 898.961 toneladas no ano de 2004. A área plantada aumentou, entre os anos de 1987 e 2002, de 22.073 ha para 31.070 ha. Existem atualmente 2.253 produtores nacionais, estando a maioria destes concentrada no Estado de Santa Catarina (1.523 produtores) gerando 46.093

empregos diretos (ABPM, 2004). No Brasil, o consumo de maçãs em 1985 era de 2,22 kg/ habitante/ ano, ou 297.265 toneladas, sendo que 30% desse volume era proveniente de importações de outros países. O maior consumo *per capita* da fruta no país ocorreu no ano 2000, com 5,58 kg/ habitante/ ano, isto devido a superprodução obtida neste ano, que foi de 968.063 toneladas, pois com preços mais baixos o produto tornou-se mais acessível à população. No ano de 2002 o consumo *per capita* foi de 4,80 kg/ habitante/ ano, ou 844.900 toneladas no total, sendo que as importações representaram apenas 6% do consumo interno total. No ano de 2003, o Brasil exportou aproximadamente 76.183 toneladas da fruta.

As principais variedades comercializadas são a Gala e a Fuji, cujo sabor agradam os consumidores brasileiros, europeus e americanos. A cv. Gala responde por 55% da área plantada no Estado de SC sendo responsável por 95% da exportação. As vendas desta fruta para o mercado internacional iniciam em fevereiro e se prolongam até junho ou julho. Segundo a Secretaria de Comércio Exterior, do Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio do Brasil, atingiram no ano de 2005, um total de 100.000 toneladas, representando um montante financeiro da ordem de 40 milhões de dólares (Ney Olivo Araldi, comunicação pessoal).

As variedades Gala e Fuji e seus respectivos clones (ex: Royal Gala, Fuji Suprema), apresentam as características agronômicas desejáveis para as exigências de mercado, tais como coloração, tamanho, exigência em frio, entre outras. A cultivar Gala corresponde a mais da metade da área plantada atualmente no país (46%), apresentando um alto grau de adaptabilidade em nossas condições edafoclimáticas (BONETI et al., 2002a). É a cultivar mais precoce dentre as plantadas no Sul do Brasil e, por isso, geralmente alcança bom preço no mercado, exercendo importante papel na economia do setor. Entretanto, é altamente suscetível à Mancha da Gala, sério problema fitossanitário no sul do Brasil (CAMILO et al., 2002). Por isso, a obtenção de clones de Gala resistentes à MG é fundamental para a manutenção e viabilidade de cultivo desta cultivar no país e para a competitividade do setor no mercado internacional, uma vez que o Brasil exportou no ano de 2003 aproximadamente 76.183 toneladas da fruta, ou o equivalente a US\$ 37.720.447,00 sendo a cv Gala uma das principais variedades exportadas (ABPM, 2004).

A pomicultura gera 1,43 emprego direto por hectare plantado, o que gera atualmente 45.760 postos de trabalho. O faturamento geral do setor é de R\$ 1,08 bilhões de reais. Toda esta economia corre o risco de desaparecer com o avanço progressivo da doença, que ano-a-

ano vem aumentando o seu poder de dano, inviabilizando o cultivo da Gala em regiões de clima mais quente, sendo que esta é a única cultivar que produz frutas de qualidade internacional em climas de inverno amenos (ABPM, comunicação pessoal).

## **O GÊNERO *Colletotrichum***

O gênero *Colletotrichum* engloba os fungos imperfeitos pertencentes à ordem *Melanconiales* da classe *Coelomycetes*, os quais apresentam uma associação teleomórfica com estirpes homotáticas ou heterotáticas de ascomicetos do gênero *Glomerella* (BAXTER et al., 1985; SKIPP et al., 1995). Os fungos filamentosos deste gênero e sua forma perfeita *Glomerella* são considerados os maiores patógenos de plantas em todo o mundo, causando danos econômicos significativos em culturas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FREEMAN et al., 1998).

Este gênero compreende várias espécies, incluindo saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas responsáveis por muitas doenças economicamente importantes e que ocorrem numa ampla gama de hospedeiros (MENEZES, 2002). Por outro lado, o potencial micoherbicida de espécies de *Colletotrichum* tem sido estudado e contribuído para uma melhor compreensão da especificidade desses patógenos a certos hospedeiros (GRESSEL et al., 1998; SKIPP et al., 1995).

O gênero *Colletotrichum* apresenta acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforo simples e alongado, conídios hialinos unicelulares que podem ser ovalados ou oblongos. Na fase perfeita (telomorfa) são denominados como sendo do gênero *Glomerella* (BARNETT et al., 1998). Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz provavelmente protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2002). Segundo MISHRA & SIRADHANA (1979) os conídios não constituem estruturas de sobrevivência porque sua viabilidade diminui rapidamente. Entretanto, o micélio pode permanecer viável por longo período em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda como infecções latentes, não mostrando as plantas sintomas das doenças.

A forma e o tamanho dos conídios de *Colletotrichum* podem variar muito entre as espécies. Conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, por exemplo, são geralmente formado em massa de coloração salmão, reto e cilíndricos com ápices obtusos e bases, às vezes, truncadas, medindo 12-17  $\mu\text{m}$  x 3,5-6  $\mu\text{m}$ . Os apressórios formados por essa espécie são clavados, ovalados, obovados ou lobados, de coloração castanha e medindo 6-20  $\mu\text{m}$  x 4-12  $\mu\text{m}$  (SUTTON, 1992).

O gênero *Colletotrichum* revela ampla adaptação a diferentes meios de cultivo. Colônias de *C. gloeosporioides* são variáveis, de coloração branco-gelo a cinza escuro e micélios aéreos geralmente uniformes, aveludados ou repletos de conidiomatos (LOPEZ, 2001). A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa (100%). No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia (MENEZES, 2002).

O apressório jovem é hialino ou ligeiramente pigmentado, mas as paredes tornam-se mais espessas e escuras com o acúmulo de melanina ocorrido na sua maturação (BAILEY et al., 1992; JEFFRIES et al., 1990; SKIPP et al., 1995). A melanização do apressório é considerada um pré-requisito da patogênese (LOPEZ, 2001). Isto pode ser explicado pelo fato de a melanina fornecer rigidez estrutural para dirigir pressão hidrostática através do poro de penetração (BAILEY et al., 1992; PRUSKY et al., 2000).

Seus hospedeiros são atacados através de vários mecanismos, podendo ocorrer a penetração do tecido cuticularizado através de apressórios ou não. Também pode ocorrer penetração direta por hifas não diferenciadas através de células não cuticularizadas, estômatos e ferimentos (LOPEZ, 1999; VAN DER BRUGGEN & MARAITE, 1987; ZAKARIA, 1995).

A interação do patógeno com sua planta hospedeira é caracterizada por uma curta fase biotrófica, quando os dois organismos ficam em contato direto na superfície celular, seguido de uma fase necrofítica destrutiva. Sintomas são visíveis neste último estágio, nas partes aéreas de plantas suscetíveis. Posteriormente, rapidamente expande-se em áreas necróticas que se desenvolvem em brotos apicais de plântulas jovens, em caules, em folhas de plantas adultas e nos frutos (BAILEY e ROWELL, 1980; KUC, 1985; ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al., 1992).

Dependendo das condições ambientes ou do grau de maturidade do hospedeiro, a penetração não ocorre imediatamente e os apressórios entram num período de quiescência. Esta propriedade é de importância considerável para espécies de *Colletotrichum* que causam infecções latentes em frutas (LOPEZ, 2001). O conceito morfológico de *Colletotrichum* é difícil de definir e as espécies são delimitadas usando poucos caracteres, como tamanho e forma dos conídios e tipos de apressórios (CANNON et al., 2000).

## A MANCHA DA GALA

Desde a sua primeira constatação, em 1983, no município de Porto Amazonas (PR), a Mancha da Gala vem se espalhando por todos os pomares de maçã do sul do Brasil (LEITE et al. 1988). A doença ficou restrita ao estado do Paraná durante aproximadamente 6 anos, disseminando-se mais tarde pelos pomares de Fraiburgo, SC e Vacaria, RS (ciclo 1989/90). Em São Joaquim, SC, a MG se estabeleceu em 1993, na comunidade de Luizinho ( $\pm$  1000 m de altitude). No entanto, a doença só se manifestou na região mais alta de São Joaquim (1300 a 1400 m) no ciclo 1997/ 1998, após longo período de chuvas abundantes e temperaturas altas, provocadas pelo fenômeno climático El Nino (KATSURAYAMA et al., 1999b).

A MG é favorecida com a elevação da temperatura, sendo que quando esta ultrapassa os 20°C, 10 horas de período de molhamento foliar (PMF) é suficiente para que ocorra a infecção e os sintomas apareçam em apenas 45 horas (em alguns casos). Em relação aos frutos, quando submetidos a este mesmo PMF, o período de incubação da doença varia de 3 a 4 dias, sendo que a doença também é favorecida pela elevação da temperatura. Entretanto, a doença também pode se estabelecer sob baixas temperaturas, como a 12°C, desde que o PMF seja bastante longo, superior a 72 horas (HAMADA, 2005). Portanto, a doença se manifesta durante o verão, causando desfolhamento severo das macieiras, provocando lesões avermelhadas nas folhas e pequenas pontuações deprimidas nos frutos (BONETI et al., 2002b).

O primeiro agente causal identificado foi *Glomerella cingulata* (*C. gloeosporioides*). Posteriormente, observou-se que *C. acutatum* e uma espécie ainda não identificada de *Colletotrichum*, também estão associadas a essa doença, mas a primeira espécie é a mais

importante por sua frequência e potencial patogênico (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002).

A origem da disseminação da doença não é conhecida. KATSURAYAMA (2001a) sugere que esta doença tenha chegado às macieiras cultivadas em São Paulo e no Paraná, a partir das culturas tropicais ou subtropicais, por exemplo, *Citrus*. De acordo com FREEMAN et al. (1999), algumas espécies de *Colletotrichum* podem estabelecer relações parasíticas com vários hospedeiros.

As cultivares de macieira que são descendentes do grupo da “Golden Delicious” são as mais suscetíveis. Deste modo, a cultivar Gala apresenta alta suscetibilidade, enquanto a Fuji, de genealogia do grupo Delicious, é considerada cultivar resistente (KATSURAYAMA et al., 1999a).

Em anos de clima favorável à doença, a MG tem causado elevadas perdas de produção, que em algumas áreas excederam a 20% da safra. Prejuízos na ordem de 20% apesar do elevado número de tratamentos com fungicidas protetores, aumentam o custo de produção em 10% e os danos também se refletem na safra seguinte, com a perda antecipada das folhas diminui a capacidade da fotossintética das plantas, prejudica a próxima safra em quantidade e qualidade das frutas.

O controle da MG tem sido efetuado com a aplicação dos fungicidas Mancozeb e dithianon. Apesar de satisfatório, em anos de verão quente e chuvoso, requer até 20 aplicações destes fungicidas, aliado a doses altas, as quais são efetuadas a partir de novembro e se prolongam até após a colheita, resultando em maior risco de contaminação da fruta. Por outro lado, as normas de Produção Integrada de maçã no Brasil, limitam o uso de fungicidas em até cinco aplicações anuais, podendo em casos excepcionais, atingir oito aplicações, com período de carência de 21 dias. Considerando-se que o período que antecede a colheita é o mais crítico em relação ao ataque da doença, pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas. (VALDEBENITO SANHUEZA et al., 2002).

O uso freqüente destes fungicidas do grupo dos Ditiocarbamatos causa impacto no meio ambiente, eliminando ovos e larvas de inimigos naturais de insetos importantes e também desequilibrando a microflora para eliminação de algumas espécies, com efeitos ainda desconhecidos, mas que, certamente, ocorrem mesmo com todos os cuidados que são

tomados na aplicação do produto. Os efeitos desta perturbação sobre a cadeia alimentar são, até o momento, em grande parte, desconhecidos, mas é possível antever a seleção de raças de *C. gloeosporioides* resistentes a fungicidas em alguma extensão de tempo, um fato que corroborará para a ampliação de desequilíbrios no agroecossistema (KATSURAYAMA e BONETI, 1999a).

Diante disto, a obtenção de cultivares resistentes à Mancha da Gala é imprescindível para o controle da doença no Sul do Brasil. As práticas de controle mais importantes estão relacionadas com o manejo das plantas (poda e condução) e a profilaxia, visando reduzir as fontes de inóculo para que, na primavera seguinte, haja a menor quantidade possível da doença. É importante ressaltar ainda que as obtenções de clones de Gala resistentes a MG reduziram o número de aplicações de fungicidas na cultura; o que vem ao encontro da crescente preocupação, por parte da sociedade, em consumir produtos mais naturais, com a menor quantidade possível de agrotóxicos (BONETI et al., 2001).

A obtenção de clones de Gala resistentes é fundamental para a permanência desta importante variedade no mercado, que é responsável hoje por 95% de nossa exportação. O abandono obrigatório do cultivo de Gala traria certamente um grande desequilíbrio para o agronegócio da maçã no Brasil. Além disto, a geração de conhecimento sobre a variabilidade existente no gênero *Colletotrichum*, bem como a caracterização dos mecanismos e obtenção de genes de resistência subsidiarão o desenvolvimento e a obtenção de novas variedades resistentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/> - Acesso em 01 de setembro de 2004.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. England: CAB International Wallingford, 88-120, 1992.

BAILEY, J.A.; ROWELL, P.M. Viability of *Colletotrichum lindemuthianum* in hypersensitive cells of *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Plant Pathology*, 17: 341-345, 1980.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B. B. **ILLUSTRATED GENERA OF IMPERFECT FUNGI** St. Paul, Minnessota: APS Press, 1998.

- BAXTER, A.P.; WESTHUIZEN, G.C.A. & EICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. **Phytophylactica**: 17: 15-18, 1985.
- BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira** São Paulo: BASF, 1998.
- BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças Fúngicas Foliares. In: EPAGRI. **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002b. 743p.
- BONETI, J.I.S.; CESAR, J.D.; PETRI, J.L.; BLEICHER, J. Evolução da cultura da macieira In: **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002a. 743p.
- BONETI, J.I.S.; PEREIRA, A.J.; BRIGHENTI, E.; KATSURAYAMA, Y.; TSUCHIYA, S. Situação atual e perspectiva de obtenção de cultivares e porta-enxertos de macieira resistentes às doenças, para a região subtropical. In: **SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental**, 1., 2001. Florianópolis, SC. Anais... Florianópolis, Epagri, 2001. 161p.
- CAMILO, A.P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil. In: **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.
- CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum systematics*. In: **Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**. American Phytopathological Society, St Paul, MN. 2000.
- COX, M.L. & IRWIN, J.A.G. Conidium and apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**, 1: 139-149, 1988.
- ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T., et al. Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species. In: **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. England, CAB international Wallingford, 121-133, 1992.
- FREEMAN, S.; KATAN, T. and SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **Plant Disease** 82:596-605. 1998.
- FREEMANN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant disease**; 82: 596-604, 1999.
- GRESSEL, J.; MICHAELI, D.; WARSHAWSKY, A. & KAMPEL, V. Enhancing infectivity of a *Colletotrichum* mycoherbicide by chemically inhibiting callose biosynthesis. In: **Proceedings of the 6<sup>th</sup> international mycological congress – host specificity, pathology and host-pathogen interaction of *Colletotrichum* workshop**. Int. Mycol. Soc.: Jerusalem, Israel: 1998. p.31 (abstract).
- GUNNEL, P. S. & GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry **Mycologia**, 84: 157-165, 1992.

- HAMADA, N.A. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da Mancha Foliar da Gala (*Colletotrichum* spp.). **Agropecuária Catarinense** 18(2): 73-77. 2005.
- IUCHI, V.L. Botânica e Fisiologia. In: EPAGRI. **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.
- JEFFRIES,P.; DODD, J.C.; JEGER & PLUMBIEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* sp. on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, 39: 343-366, 1990.
- KATSURAYAMA, Y. & BONETI, J.I. da S. Aspectos epidemiológicos da mancha foliar da macieira cv. Gala. In.: **ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 2**, 1999, Fraiburgo, SC. Anais...Epagri, Florianópolis, SC. 1999a. 157p.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & BECKER, W.F.; OZAWA, T. & TSUCHIYA, S. Epidemiologia das Doenças da Macieira no Subtropical e Perspectivas de Manejo Integrado: Caso da Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.). In: **SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental**, 1., 2001. Florianópolis, SC. Anais... Florianópolis, Epagri, 2001a. 161p.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & OZAWA, T. Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar da gala. **Fitopatologia brasileira**, 25 (suplemento):383 (Resumos), 2000.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. Epidemiologia da Mancha Foliar da Gala in **IV Reunião Anual de Fitossanidade na Cultura da Macieira**. São Joaquim: Epagri. 1999b.
- KUC, J. Induced immunity to plant disease. **Bio Science**, 32: 854-860, 1985.
- LEITE Jr., R.P.; TSUNETA, M.; KISHINO, A.Y. **Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no Estado do Paraná**. Londrina, IAPAR, 1988, 6p. (IAPAR, Informe de Pesquisa, 81).
- LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum* in **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, volume 9: 291-339, 2001. Passo Fundo.
- LOPEZ, A.M.Q. **The interaction between anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., and cashew, *Anacardium occidentale* (L.)**. Bristol, UK: University of Bristol, 1999. IACR-LARS PhD. Thesis.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia brasileira**, 27 (suplemento): S23, 2002.
- MISHRA, A.; SIRADHANA, B.S. Studies on the survival of sorghum anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) pathogen. **Phillippine Agriculture** 62: 149-152. 1979.
- PEREIRA, A.J. Densidade de plantio da macieira em porta-enxertos anões. In: **VII ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO**, 2004, Fraiburgo, SC. Anais...Epagri, Florianópolis, SC. 2004. 157p.
- PETRI, J.L. Fatores edafoclimáticos. In: **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.

- PRUSKY,D.;FREEMAN,S.; DICKMAN, M.B. *Colletotrichum – Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. St Paul, Minnessota: 99-113. APS, 2000.
- SKIPP, R.A.; BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, E.H.A. & TEMPLETON, M.D. *Colletotrichum*. In: **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Pergamon/Elsevier Sci. Ltd. Public.: Oxford, vol.II: 119-142, 1995.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. England, CAB international Wallingford, 1-26, 1992.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.; BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y; CZERMAINSKI, A.B.C. **Manejo das Doenças de Verão na Produção Integrada de Maçã**. Circular técnica EMBRAPA n° 36. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2002.
- VAN DER BRUGGEN, P. & MARAITE, H. Histopatology of cassava anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis*. **Parasitica**: 43: 3-21, 1987.
- ZAKARIA, M. *Colletotrichum diseases of forest tree nurseries in Malaysia*. Bristol, UK: University of Bristol, 1995. IACR-LARS. PhD. Thesis.

## OBJETIVOS

---

### Objetivo geral

Caracterizar os isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de diversas regiões produtoras de maçã do Brasil, quanto aos aspectos culturais, morfológicos, taxonômicos, genéticos e, de patogenicidade, visando à identificação das espécies envolvidas com a Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.) na cultura da macieira e a geração de informações que auxiliarão em programas de melhoramento genético voltados a este patossistema.

### Objetivos específicos

- Estabelecer *in vitro* isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de diversos pomares da região Sul do Brasil;
- Determinar e classificar as espécies baseando-se nas características morfológicas e culturais;
- Avaliar a geração de heterocariontes com diversas combinações entre isolados;
- Caracterizar a agressividade dos diferentes isolados e heterocariontes gerados em folhas e frutos de cultivar resistente (Fuji) e suscetível (Gala) de macieira;
- Determinar a diversidade genética dos isolados e dos heterocariontes de *Colletotrichum* spp. com base no marcador molecular RAPD.

## CAPITULO I

---

### ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E SENSIBILIDADE AO BENOMYL

#### INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Colletotrichum* e sua forma perfeita *Glomerella* são considerados os maiores patógenos de plantas ao redor do mundo, causando significativas perdas econômicas em culturas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FREEMAN et al., 1998). *Colletotrichum* spp. é comumente identificado através de critérios morfológicos, ou seja, tamanho e forma dos conídios, tamanho e morfologia do apressório, morfologia das setas e temperatura de crescimento em meio batata dextrose ágar (GUNNEL et al., 1992; SMITH et al., 1990; SUTTON, 1980) entre outros.

A sensibilidade dos isolados ao fungicida benomyl, embora tenha sido inicialmente utilizada apenas para estimar o potencial de controle químico do composto sobre o gênero (FREEMAN et al., 1997), pode ser utilizada como critério de classificação entre espécies de *Colletotrichum* (FREEMAN et al., 1998). A sensibilidade ao benomyl tem sido utilizada em vários trabalhos de classificação de isolados, como os desenvolvidos por SHABI et al. (1993) que distinguiram isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de diferentes hospedeiros de Israel; de PERES et al. (2004) que utilizaram esse critério para separar isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em *Citrus*, entre outros.

A identificação correta e aprofundada e o completo conhecimento da variabilidade fenotípica de espécies de *Colletotrichum* são aspectos essenciais para uma diagnose significativa das doenças por elas causadas (LOPEZ, 2001). Ainda, a identificação acurada das espécies envolvidas nas doenças da macieira e informações sobre a frequência com que estas ocorrem nos pomares é crucial para um melhor direcionamento dos programas de melhoramento genético visando resistência a doenças na cultura (SHI et al., 1996).

Dentro deste contexto, o objetivo desta etapa do trabalho foi estabelecer isolados de diferentes regiões e analisar as suas características morfológicas e culturais, assim como a sensibilidade ao benomyl, visando a classificação das espécies de *Colletotrichum* spp.

## **MATERIAL E METODOS**

### **1. Coleta, isolamento e incubação, isolamento monospórico**

Folhas de macieira da cultivar Gala, com sintomas de Mancha da Gala (MG) foram coletadas em 29 pomares, localizados em 14 diferentes municípios dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tabela 1). A amostragem foi realizada de maneira a englobar as principais regiões produtoras de maçã do Brasil.

A coleta das folhas foi realizada ao acaso em toda a extensão do pomar, sendo coletadas em torno de 50 folhas em cada pomar amostrado. Além das folhas com sintomas de MG típica, ainda foram coletadas folhas, frutos e pecíolos apresentando lesões de podridão amarga (PA) e mancha necrótica (MN), sendo este último coletado em alguns pomares do município de Fraiburgo/SC, onde havia sido relatada a presença de MN (Katsurayama & Boneti, 2001, Hamada & Katsurayama, 2005 a, b). As folhas foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo e levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental de São Joaquim da Epagri onde foram realizados os ensaios.

Primeiramente, as folhas foram lavadas em água corrente e secas em papel toalha e em seguida, em câmara de fluxo laminar, estas foram recortadas com tesoura previamente esterilizada nas áreas lesionadas (1 lesão de cada folha). Os isolados foram transferidos para placas de pétri descartáveis (9 cm de diâmetro) contendo 10 mL de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) + ácido láctico (3 gotas/100 mL de BDA). Os meios contidos nas placas foram previamente autoclavados durante 20 minutos após atingir a temperatura de 121°C, sob 1,0 atm de pressão.

Todas as placas foram mantidas em B.O.D. a temperatura de 25°C ± 1°C até o aparecimento das primeiras colônias, quando estas foram repicadas para placas contendo 10 mL de BDA (39 g/L). Após sete dias as colônias foram analisadas e identificadas de acordo com suas características morfológicas. A classificação foi realizada segundo metodologia descrita por BONETI et al. (1999b).

Segundo esse sistema de classificação, os isolados que apresentaram micélio de coloração variando de verde oliva a marrom, com crescimento radial irregular e rápido, os quais levaram em torno de 5 dias para ocupar toda a placa, e que apresentaram conídios retos e cilíndricos com ápices obtusos e bases às vezes truncadas e medindo de 12-17  $\mu\text{m}$  x 3,5-6  $\mu\text{m}$ , foram classificados como *C. gloeosporioides*. Os que apresentaram colônias de coloração rosada e eventual formação de massa de conídios de coloração salmão diretamente no micélio, com crescimento mais lento, os quais ocuparam aproximadamente metade da placa com 5 dias após a repicagem, apresentando conídios de formato elíptico e fusiforme, foram classificados em *C. acutatum*.

A massa micelial foi então transferida para placas de Petri (9 mm de diâmetro) contendo meio BDA e incubados a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro durante 14 dias. Passado este período, com o auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada, os conídios foram suspensos em água destilada e espalhados em placa de pétri descartável (9 cm de diâmetro), contendo 10 mL de meio de cultura agar-ágar (17 g/L) e incubados a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro durante 1 dia, quando foi realizado o isolamento monospórico através de um microscópio ótico (marca Nikon, modelo Labophot), sob objetiva de 40X.

Após 15 dias do estabelecimento dos isolados monospóricos, foram feitas três replicatas de cada amostra. Cada amostra foi identificada de acordo com seu local de origem e do pomar em que cada isolado foi coletado (Tabela 1). Dos 207 estabelecidos, foram selecionados 40 isolados para a execução dos trabalhos (Tabela 2), tomando-se como base a melhor produção de conídios e bom desenvolvimento micelial em meio de cultura (BDA).

Após o estabelecimento dos 40 isolados, o isolado de número 23 foi perdido devido à contaminação, entretanto, a numeração dos demais isolados não foi alterada devido ao fato de que a micoteca já havia sido estabelecida e os isolados já estavam discriminados.

Tabela 1. Origem dos isolados (pomar e localidade) coletados nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

<b>Origem/Local ou produtor</b>	<b>Procedência/Pomar</b>	<b>Nº de isolados</b>
1. Fazenda Palma	São Joaquim/Fazenda dos Palma	7
2. Orival Sá	São Joaquim Santa Isabel	6
3. João Costa	São Joaquim Santa Isabel	7
4. Sérgio Melhorim	São Joaquim Santa Isabel	3
5. Paulo Okamoto	São Joaquim	6
6. Cooperserra	São Joaquim	9
7. Fumio Hiragami	São Joaquim Boava	3
8. Fumio Hiragami	Painel	4
9. Vilmar Zanette	Bom Jardim da Serra/Despraiado	9
10. Jair Philipi	Bom Retiro	6
11. Masui Takizawa	Frei Rogério	11
12. Agrícola Fraiburgo	Água Doce	3
13. Agrícola Fraiburgo	Fraiburgo	4
14. Fischer	Fraiburgo	14
15. Pomifrai	Fraiburgo	10
16. Fischer	Fraiburgo/ Fertilidade	3
17. Fischer	Fraiburgo/ Moinho Azul	8
18. Fischer	Fraiburgo/ Rio Mansinho	6
19. E. E. Caçador/ Epagri	Caçador	6
20. Rio das Antas	Rio das Antas	7
21. Norihisa Abe	Palmas, PR	10
22. Francisco Hamada	Palmas, PR	12
23. Agrícola Fraiburgo	Vacaria, RS	10
24. Schio	Vacaria, RS	7
25. Pomifrai 125 – Fraiburgo	Fraiburgo, SC	5
26. Fischer Fraiburgo	Fraiburgo, SC	4
27. E.E. São Joaquim/ Epagri	São Joaquim, SC	5
28. Perboni	Palmeira, PR	18
29. Agrícola MH	Campo Tenente, PR	14
<b>TOTAL</b>		<b>207</b>

Tabela 2. Isolados de *Colletotrichum* selecionados para a realização do trabalho e seus respectivos locais de origem.

<b>Isolados</b>	<b>Procedência</b>
1* (LF – 4160 a)	Caçador/ SC
2* (LF – 4160 b)	Caçador/ SC
3	Caçador/ SC
4#	Vacaria/ RS
5#	Vacaria/ RS
6	Frei Rogério/ SC
7	Frei Rogério/ SC
8	Frei Rogério/ SC
9	Frei Rogério/ SC
10+ (CG 197)	Curitibanos/ SC
11	São Joaquim/ SC
12	São Joaquim/ SC
13	São Joaquim/ SC
14	Palmas/ PR
15	Fraiburgo/ SC
16	Fraiburgo/ SC
17	Campo Tenente/ PR
18	Campo Tenente/ PR
19	Campo Tenente/ PR
20	Campo Tenente/ PR
21	Campo Tenente/ PR
22	Palmeira/ PR
23	Palmeira/ PR
24	Palmeira/ PR
25	Palmeira/ PR
26	Palmeira/ PR
27	Palmeira/ PR
28	Palmeira/ PR
29	Palmeira/ PR
30	Palmeira/ PR
31	Fraiburgo
32	Fraiburgo
33	Fraiburgo
34	Fraiburgo
35	Palmas/ PR
36	Palmas/ PR
37	Palmas/ PR
38	São Joaquim/ SC
39	São Joaquim/ SC
40	São Joaquim/ SC

\*isolados gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. Walter Becker, da Epagri, Estação Experimental de Caçador/ SC;

#isolados gentilmente cedidos pela pesquisadora Dra. Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza, Embrapa/RS.

+isolado gentilmente cedido pelo pesquisador Yoshinori Katsurayama, Epagri, Estação Experimental de São Joaquim/ SC.

## **2. Avaliação das características morfológicas**

Os isolados foram avaliados de acordo com as características de suas colônias em meio de cultura (BDA), sendo estas: a taxa de crescimento, sensibilidade ao fungicida benomyl, características dos conídios, coloração observada em cima e abaixo da placa de Petri, formação de setores, ou seja, áreas específicas de crescimento micelial em uma colônia (ROCA M. et al., 2004) e a formação de peritécios.

### **2.1. Determinação do diâmetro das colônias e da taxa de crescimento**

Discos de micélio (6 mm) foram depositados no centro de placas de petri contendo 10 mL de BDA (39 g/L). As amostras foram incubadas em estufa regulada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro. A taxa de crescimento (TC) dos isolados foi determinada de acordo com a velocidade de crescimento destes em meio BDA. Diariamente, durante seis dias, foi medido o diâmetro das colônias (mm) e a partir destes dados foi calculada a TC diária através da fórmula  $TC = (D_n - 6) / n$ , onde  $D_n$  = diâmetro da colônia n dias após a repicagem e n = número de dias de incubação (TEIXEIRA et al., 2001).

### **2.2. Sensibilidade dos isolados ao fungicida benomyl**

Discos de micélio (6 mm) de cada isolado foram transferidos para placas de Petri contendo 10 mL de BDA suplementadas com três concentrações de benomyl (0, 5 e  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), mantidas em estufa regulada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro.

Diariamente, durante 06 dias, foram medidos o diâmetro das colônias (mm) e a taxa de crescimento de cada um dos isolados. Para a construção da curva de crescimento foram utilizados os dados da medição diária das colônias, e considerado o diâmetro de cada um destes ao sexto dia após a repicagem. A TC foi calculada através da fórmula apresentada no item 2.1.

Os isolados que não cresceram na presença do fungicida, diferindo entre os tratamentos que continham o benomyl, foram considerados sensíveis. Os isolados que cresceram em ambas as concentrações testadas e que não diferiram entre elas foram considerados resistentes.

### **2.3. Avaliação das características dos conídios**

Foram utilizadas suspensões conidiais procedentes das culturas monospóricas crescidas em meio BDA mantidas por 15 dias a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro. A suspensão conidial foi obtida através de raspagem superficial das placas com água destilada e filtragem em gaze esterilizada. Para cada isolado foi montada uma lâmina semipermanente, fixada com uma gota de preparado de Shear (300 ml de acetato de potássio 2%; 120 ml de glicerina e 180 ml de etanol 95%) e fechada com esmalte. As características avaliadas nos conídios foram comprimento (CC), largura (LC), formato e a relação CC/LC. Foram avaliados 25 conídios por lâminas em microscópio ótico (marca Nikon, modelo Labophot), em objetiva de 40X.

### **3. Avaliação das características culturais das colônias**

Os isolados foram repicados nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se discos de micélio (6 mm) que foram depositados em placas contendo meio BDA, as quais foram mantidas no escuro em estufa regulada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias.

Foram feitas três repetições por isolado e as avaliações foram realizadas diariamente para coloração e forma das colônias e para formação de setores. Estas mesmas amostras foram mantidas por mais 30 dias para que se observasse a formação ou não de peritécios. Os peritécios foram coletados com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e esmagados em lâmina semi-permanente fixada com uma gota de preparado de Shear e observadas em microscópio ótico.

### **4. Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental utilizado em todos os ensaios foi o inteiramente casualizado. Para os ensaios de determinação do diâmetro das colônias (mm) e da taxa de crescimento e de sensibilidade destes ao fungicida benomyl foram feitas três repetições para cada isolado. No ensaio de caracterização dos conídios cada conídio analisado representou uma repetição, totalizando 25 repetições por isolado. Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e posterior teste de separação de médias (SNK,  $\alpha=0,05$ ) (SOKAL et al., 1995).

## RESULTADOS

### 1. Determinação do diâmetro e da taxa de crescimento dos isolados

O diâmetro médio final das colônias e a taxa de crescimento micelial dos isolados apresentaram diferenças significativas entre os isolados ao nível de significância de 5% pelo teste F (Tabela 3), sendo que as análises de variância de ambas as variáveis mostrou diferenças significativas entre os isolados (dados não mostrados).

Tabela 3. Análise da variação para o diâmetro médio das colônias e para a taxa de crescimento dos isolados repicados em meio BDA, após 6 dias de incubação.

Causa da Variação	GL	Quadrado médio	
		Diâmetro das colônias	Taxa de crescimento
Isolados	38	491,3**	19,08**
Resíduo	78	1,7	0,07
CV%		2,32	2,00

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Com 7 dias após a repicagem a maioria das colônias já ocupava praticamente toda a área da placa (Figura 1). Os isolados 1, 2, 7, 8, 25, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40 apresentaram crescimento menor, com diâmetro de colônias variando de 36,7 mm a 49,3 mm, diferentes significativamente dos demais isolados, que apresentaram maior diâmetro no crescimento das colônias, variando de 63,3 a 71,0 (Tabela 4). A taxa de crescimento micelial dos isolados variou de 7,33 mm a 14,20 (Tabela 4).

Tabela 4. Diâmetro das colônias e taxa de crescimento de *Colletotrichum* spp. isolados de macieira, oriundos de diversas regiões produtoras do Brasil, inoculados em meio BDA.

Isolado	Procedência (município/ Estado)	Diâmetro das colônias (mm) <sup>1</sup>	Taxa de crescimento <sup>1</sup>
1	Caçador/ SC	43,7 ef	8,73 ef
2	Caçador/ SC	42,0 cdef	8,40 cdef
3	Caçador/ SC	69,7 lm	14,07 lm
4	Vacaria/ RS	64,7 ij	12,93 ij
5	Vacaria/ RS	67,3 jkl	13,47 jklm
6	Frei Rogério/ SC	66,3 ijkl	13,27 ijk
7	Frei Rogério/ SC	38,0 ab	7,60 ab
8	Frei Rogério/ SC	37,7 ab	7,53 ab
9	Frei Rogério/ SC	64,0 ij	12,80 ij
10	Curitibanos/ SC	63,3 i	12,67 i
11	São Joaquim/ SC	64,0 ij	12,80 ij
12	São Joaquim/ SC	66,7 ijkl	13,33 ijk
13	São Joaquim/ SC	71,0 m	14,20 lm
14	Palmas/ PR	64,3 ij	12,87 ij
15	Fraiburgo/ SC	66,0 ijk	13,20 ijk
16	Fraiburgo/ SC	70,3 m	14,07 lm
17	Campo Tenente/ PR	67,0 ijkl	13,40 ijk
18	Campo Tenente/ PR	68,3 kl	13,67 klm
19	Campo Tenente/ PR	68,3 klm	13,67 klm
20	Campo Tenente/ PR	65,3 ijk	13,07 ijk
21	Campo Tenente/ PR	67,0 ijkl	13,40 ijk
22	Palmeira/ PR	64,3 ij	12,87 ijk
24	Palmeira/ PR	65,7 ijk	13,13 ijk
25	Palmeira/ PR	49,3 g	9,87 g
26	Palmeira/ PR	59,3 h	11,87 h
27	Palmeira/ PR	64,0 ij	12,80 ij
28	Palmeira/ PR	64,3 ij	12,87 ij
29	Palmeira/ PR	49,3 g	9,73 g
30	Palmeira/ PR	63,7 ij	12,73 ij
31	Fraiburgo	40,7 bcde	8,13 bcde
32	Fraiburgo	36,7 a	7,33 a
33	Fraiburgo	38,7 abc	7,73 abc
34	Fraiburgo	39,0 abcd	7,80 abcd
35	Palmas/ PR	41,7 cdef	8,33 cdef
36	Palmas/ PR	41,0 bcdef	8,20 bcdef
37	Palmas/ PR	44,0 f	8,80 f
38	São Joaquim/ SC	39,3 abcd	7,87 abcd
39	São Joaquim/ SC	42,3 def	8,47 def
40	São Joaquim/ SC	39,0 abc	7,80 abcd

<sup>1</sup>- Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de separação de médias SNK.

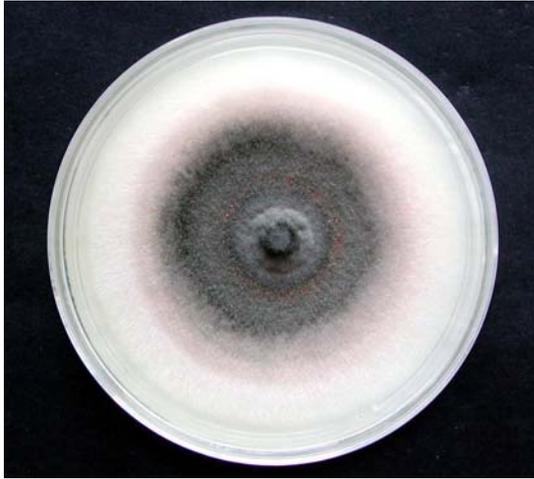


Figura 1. Colônia de *Colletotrichum* spp. ocupando quase toda a placa de Petri, 7 dias após a repicagem.

Foram observadas tendências de crescimento diferentes entre os isolados quando se analisou as curvas de crescimento construídas a partir da medição diária das colônias (Figura 2). As colônias dos isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram diâmetro de colônia maior do que os isolados de *C. acutatum* durante todo o período de incubação, sendo que isolados de *C. acutatum* tiveram diâmetros em média 30% menores do que isolados de *C. gloeosporioides* (Figura 2).

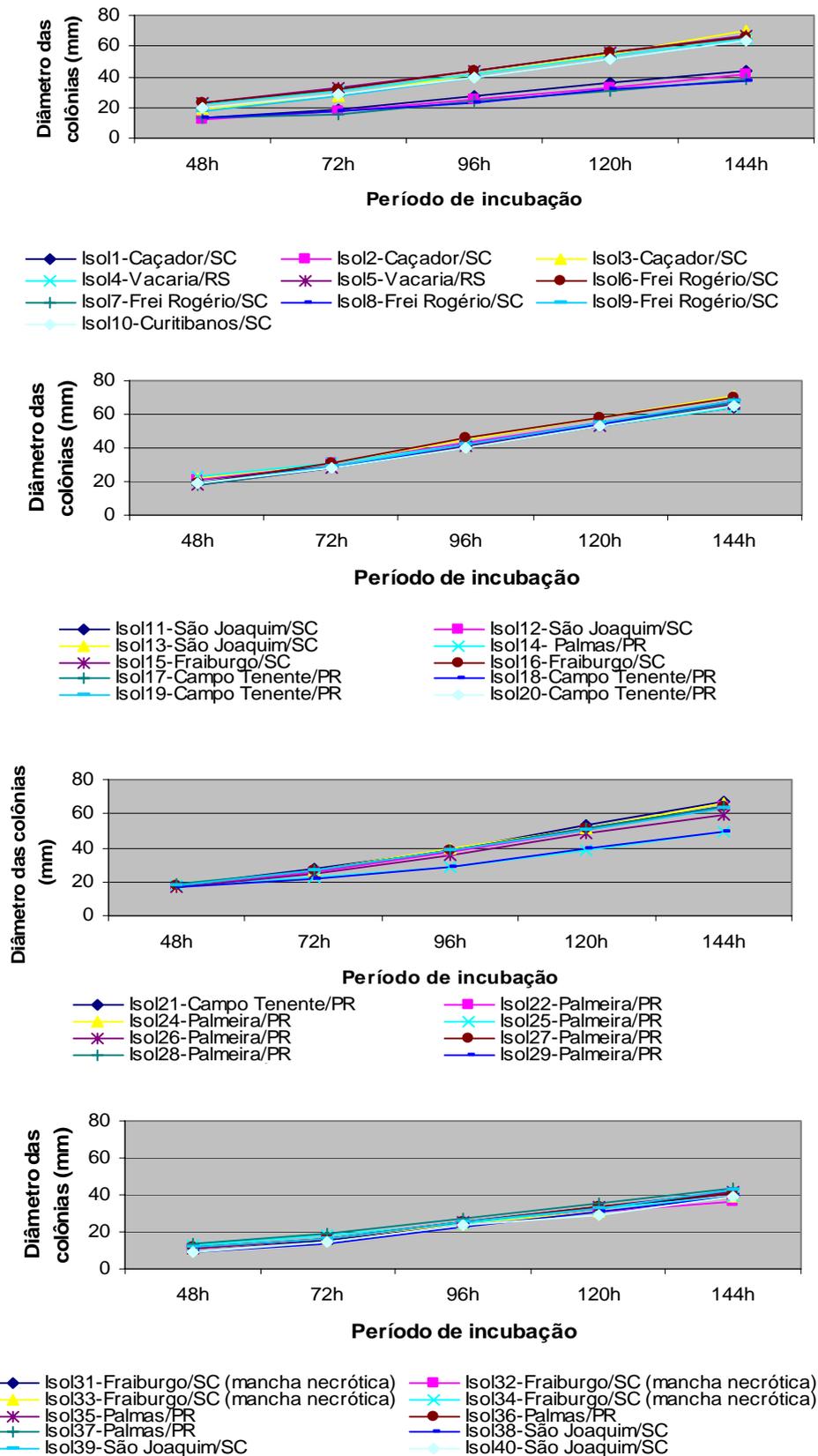


Figura 2. Diâmetro das colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de macieira, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem, em meio BDA.

## 2. Sensibilidade dos isolados ao fungicida benomyl

A interação entre as concentrações de benomyl e os isolados foi significativa ao nível de probabilidade de 5% pelo teste F, quando de analisou os dados do diâmetro final das colônias (Tabela 5).

Foram observadas diferenças entre os isolados dentro de cada concentração e no comportamento destes entre as concentrações (Tabela 8).

Tabela 5. Análise da variação para o diâmetro médio das colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. após 6 dias de incubação.

<b>Causas de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Isolados (A)	38	1127,11**
Concentrações (B)	3	56135,48**
A x B	114	335,33**
Resíduo	195	1,17
CV%	5,00	

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Os isolados foram discriminados em dois diferentes grupos de acordo com a sensibilidade destes à concentração do fungicida no meio de cultura (Tabela 8).

Os isolados que apresentaram resistência ao benomyl foram os isolados 17, 18, 19, 20 e 21, provenientes de um único pomar comercial localizado no município de Campo Tenente/PR, bem como os isolados 1, 2 e 3, provenientes de Caçador, SC; 31, 32, 33 e 34, provenientes de Fraiburgo, SC; 35, 36 e 37 provenientes de Palmas, PR e os isolados 38, 39 e 40, provenientes de São Joaquim, SC. Os que se mostraram sensíveis foram os isolados 4 e 5, de Vacaria, RS; 6, 7, 8 e 9 de Frei Rogério, SC; 10 de Curitiba, SC; 11, 12 e 13 de São Joaquim, SC; 14 de Palmas, PR; 15 e 16 de Fraiburgo, SC; 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 de Palmeira, PR (Figura 3).

Dentre os isolados resistentes, os maiores diâmetros foram observados nas colônias dos isolados 17, 18, 19, 20 e 21, oriundos de Campo Tenente, PR, com médias variando de 60,3 a 68,7 mm de diâmetro na concentração de 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo que na concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  o diâmetro das colônias destes isolados variou entre 50,3 e 58,0 mm (Tabela 8).

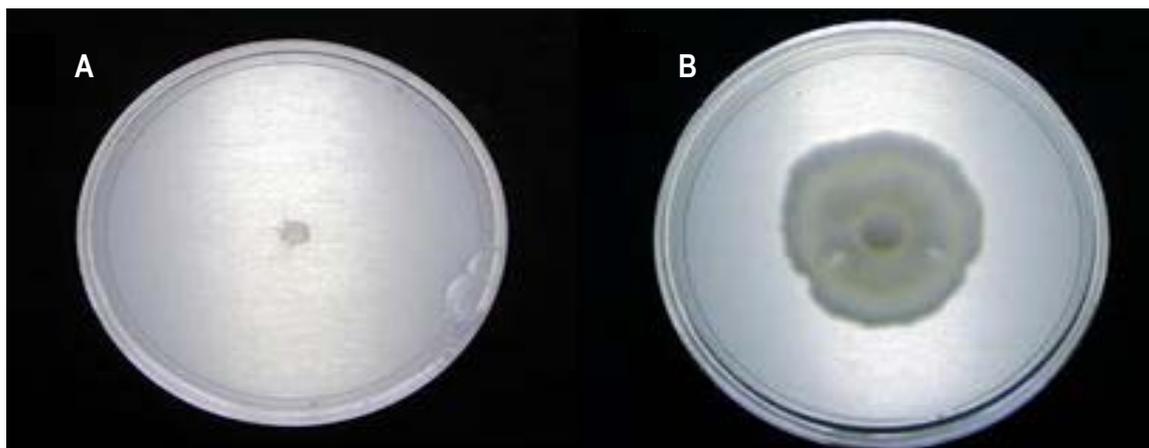


Figura 3. Isolados de *Colletotrichum* spp. submetidos a meio de cultura BDA suplementado com fungicida benomyl ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A – Isolado sensível (10, oriundo de Curitiba, SC); B- isolado resistente (20, proveniente de Campo Tenente, PR).

As taxas de crescimento dos isolados e a interação destas com as concentrações de fungicida testadas foram significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F e o teste de separação de médias (SNK,  $\alpha=0,05$ ) mostrou diferenças estatísticas entre os isolados (Tabela 7).

Tabela 7. Análise da variação para a taxa de crescimento das colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. após 6 dias de incubação.

<b>Causas de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Isolados	38	0,033**
Concentrações	3	0,4342**
Interação	114	0,03**
Resíduo	195	0,02
CV%	7,80	

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

As maiores taxas de crescimento foram observadas nas colônias dos isolados 17, 18, 19, 20 e 21 (Campo Tenente, PR), 31 a 34 (Fraiburgo, SC), 35 a 37 (Palmas, PR) e 38 a 40 (São Joaquim, SC), com médias variando de 0,29 a 0,21 na concentração de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e entre 0,30 e 0,24 na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Tabela 8. Sensibilidade ao benomyl, diâmetro das colônias e taxa de crescimento de isolados de *Colletotrichum* spp em macieira, oriundos de diversas regiões, em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida (0, 5 e 100 µg.mL<sup>-1</sup>).

Isolado	Procedência (município/ Estado)	Sensibilidade ao benomyl	Diâmetro das colônias (mm) <sup>1</sup>			Taxa de crescimento <sup>1</sup>		
			Benomyl (µg.mL <sup>-1</sup> )			Benomyl (µg.mL <sup>-1</sup> )		
			0	5	100	0	5	100
1	Caçador/ SC	Resistente	43,7 Aef	10,7 Cbcd	9,0 Bb	0,26 Aef	0,17 Cbcd	0,18 Bb
2	Caçador/ SC	Resistente	42,0 Acdef	9,00 Cb	8,3 Bb	0,27 Acdef	0,18 Cb	0,16 Bb
3	Caçador/ SC	Resistente	69,7 Almn	0,00 Ca	0,00 Ba	0,28 Almn	0,00 Ca	0,00 Ba
4	Vacaria/ RS	Sensível	64,7 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,24 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba
5	Vacaria/ RS	Sensível	67,3 Ajklm	0,00 Ca	0,00 Ba	0,23 Ajklm	0,00 Ca	0,00 Ba
6	Frei Rogério/ SC	Sensível	66,3 Aijkl	0,00 Ca	0,00 Ba	0,23 Aijkl	0,00 Ca	0,00 Ba
7	Frei Rogério/ SC	Sensível	38,0 Aab	0,00 Ca	0,00 Ba	0,23 Aab	0,00 Ca	0,00 Ba
8	Frei Rogério/ SC	Sensível	37,7 Aab	0,00 Ca	0,00 Ba	0,23 Aab	0,00 Ca	0,00 Ba
9	Frei Rogério/ SC	Sensível	64,0 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba
10	Curitibanos/ SC	Sensível	63,3 Ai	0,00 Ca	0,00 Ba	0,25 Ai	0,00 Ca	0,00 Ba
11	São Joaquim/ SC	Sensível	64,0 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,24 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba
12	São Joaquim/ SC	Sensível	66,7 Aijkl	0,00 Ca	0,00 Ba	0,25 Aijkl	0,00 Ca	0,00 Ba
13	São Joaquim/ SC	Sensível	71,0 An	0,00 Ca	0,00 Ba	0,25 An	0,00 Ca	0,00 Ba
14	Palmas/ PR	Sensível	64,3 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,23 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba
15	Fraiburgo/ SC	Sensível	66,0 Aijk	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Aijk	0,00 Ca	0,00 Ba
16	Fraiburgo/ SC	Sensível	70,3 Amn	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Amn	0,00 Ca	0,00 Ba
17	Campo Tenente/ PR	Resistente	67,0 Aijkl	68,7 Cj	53,7 Bh	0,28 Aijkl	0,26 Cj	0,27 Bh
18	Campo Tenente/ PR	Resistente	68,3 Aklmn	67,7 Cj	55,3 Bi	0,27 Aklmn	0,27 Cj	0,28 Bi
19	Campo Tenente/ PR	Resistente	68,3 Aklmn	66,7 Cij	58,0 Bj	0,27 Aklmn	0,26 Cij	0,28 Bj
20	Campo Tenente/ PR	Resistente	65,3 Aijk	60,3 Ch	50,3 Bg	0,27 Aijk	0,27 Ch	0,28 Bg
21	Campo Tenente/ PR	Resistente	67,0 Aijkl	65,3 Ci	53,3 Bh	0,28 Aijkl	0,27 Ci	0,27 Bh

*continua*

Continuação da Tabela 8

22	Palmeira/ PR	Sensível	64,3 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,28 Aij	0,00 ab	0,00 Ba
24	Palmeira/ PR	Sensível	65,7 Aijk	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Aijk	0,00 Ca	0,00 Ba
25	Palmeira/ PR	Sensível	49,3 Ag	0,00 Ca	0,00 Ba	0,23 Ag	0,00 Ca	0,00 Ba
26	Palmeira/ PR	Sensível	59,3 Ah	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Ah	0,00 Ca	0,00 Ba
27	Palmeira/ PR	Sensível	64,0 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba
28	Palmeira/ PR	Sensível	64,3 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba
29	Palmeira/ PR	Sensível	49,3 Ag	0,00 Ca	0,00 Ba	0,24 Ag	0,00 Ca	0,00 Ba
30	Palmeira/ PR	Sensível	63,7 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba	0,27 Aij	0,00 Ca	0,00 Ba
31	Fraiburgo	Resistente	40,7 Abcde	13,0 Cde	12,7 Bde	0,27 Abcde	0,21 Cde	0,25 Bde
32	Fraiburgo	Resistente	36,7 Aa	12,7 Cde	13,7 Be	0,25 Aa	0,25 Ccde	0,26 Be
33	Fraiburgo	Resistente	38,7 Aabc	14,7 Ce	14,0 Be	0,27 Aabc	0,28 Ce	0,27 Be
34	Fraiburgo	Resistente	39,0 Aabcd	10,0 Cbc	14,0 Be	0,25 Aabcd	0,19 Cbc	0,27 Be
35	Palmas/ PR	Resistente	41,7 Acdef	12,0 Ccde	11,0 Bc	0,27 Acdef	0,27 Ccde	0,27 Bc
36	Palmas/ PR	Resistente	41,0Abcdef	12,0 Ccde	12,0 Bcd	0,27Abcdef	0,22 Ccde	0,24 Bcd
37	Palmas/ PR	Resistente	44,0 Af	23,6 Ccde	11,7 Bcd	0,25 Af	0,29 Ccde	0,24 Bcd
38	São Joaquim/ SC	Resistente	39,3 Aabcd	20,3 Cg	16,3 Bf	0,30 Aabcd	0,29 Cg	0,28 Bf
39	São Joaquim/ SC	Resistente	42,3 Adef	21,3 Cg	15,7 Bf	0,27 Adef	0,24 Cg	0,27 Bf
40	São Joaquim/ SC	Resistente	39,0 Aabcd	18,3 Cf	16,0 Bf	0,30 Aabcd	0,27 Cf	0,30 Bf

<sup>1</sup>Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem entre si em relação às concentrações de fungicida e médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si em relação aos isolados, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de separação de médias SNK.

Foram observadas tendências de crescimento diferentes entre os isolados quando se analisou as curvas de crescimento construídas a partir da medição diária das colônias. Os isolados 17, 18, 19, 20 e 21 (Campo Tenente, PR) foram os que apresentaram maior diâmetro de colônias durante todo o período de incubação em ambas as concentrações testadas, com média de 18,86, 28,34, 40,4, 52,88 e 65,74 mm de diâmetro na concentração de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , 48, 72, 96, 120 e 144 horas de incubação, respectivamente (Figura 4a). Na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  as médias do diâmetro das colônias destes isolados foi de 14,6, 21,48, 32,28, 51,4 e 54,12 mm às 48, 72, 96, 120 e 144 horas de incubação, respectivamente (Figura 4d). Os isolados que apresentaram os menores diâmetros de colônia nas duas concentrações testadas, durante todo o período de incubação, foram os isolados 1 e 2 (Caçador, SC), sendo que os diâmetros médios das colônias foram de 4,5, 5,2, 6,5, 8,35 e 9,85 ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e de 4,0, 4,5, 5,65, 7,35 e 8,65 ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) às 48, 72, 96, 120 e 144 horas de incubação (Figura 4a e 4d).

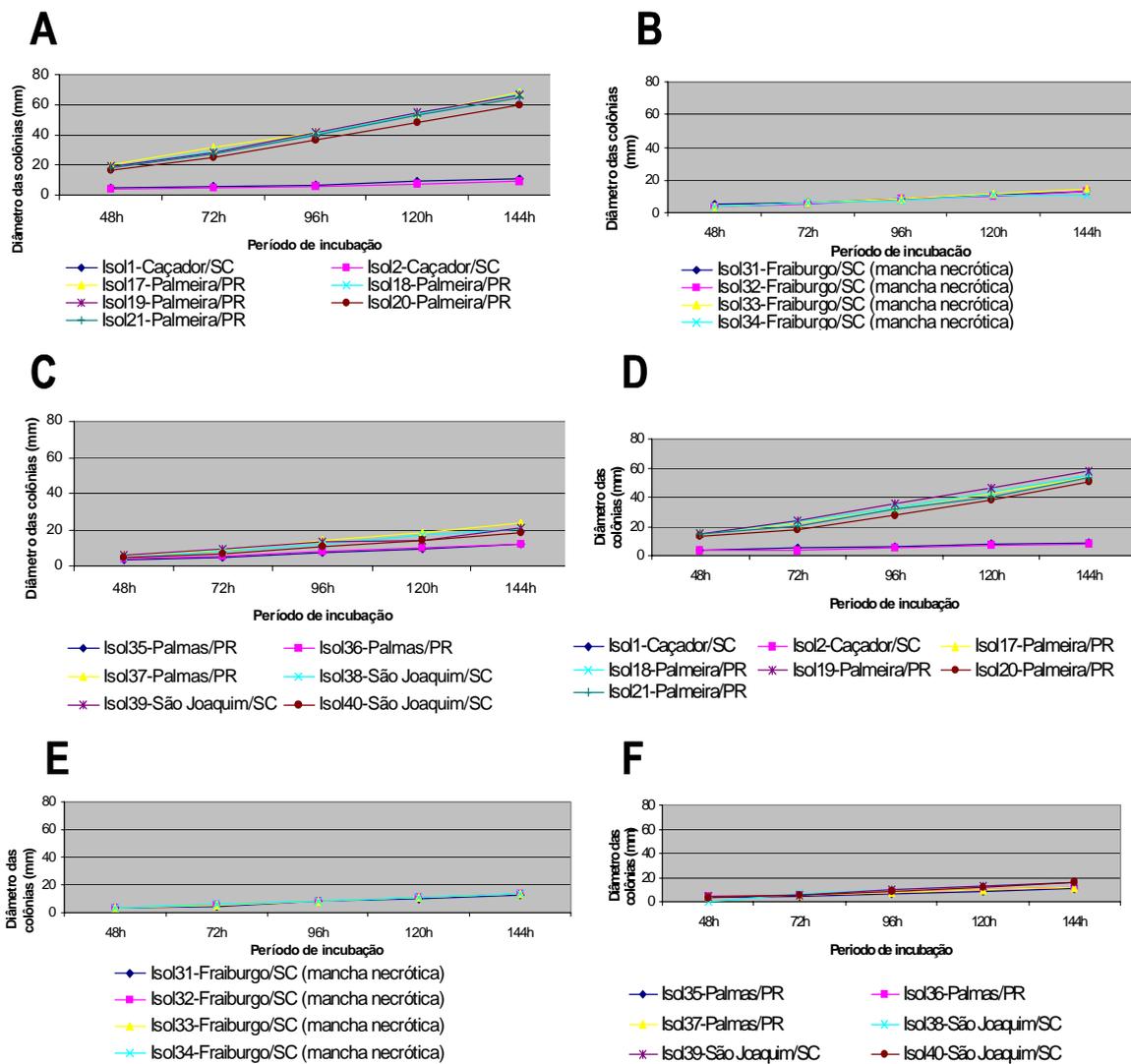


Figura 4. Diâmetro das colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de macieira, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem, em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida benomyl. A, B e C - 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; D, E e F - 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 3. Determinação das características culturais das colônias

De acordo com a observação da coloração das colônias e a formação ou não de setores, os quais foram avaliados sete dias após a repicagem, os isolados foram divididos em 3 diferentes grupos. O primeiro grupo foi formado por isolados que apresentaram coloração rosada em ambos os lados da placa de Petri (verso e reverso) e não apresentaram formação de setores (Figura 5) (Tabela 9), estes isolados foram 1 e 2 (Caçador, SC), os isolados 31, 32, 33 e 34 (Fraiburgo, SC), os isolados 35, 36 e 37 (Palmas, PR) e os isolados 38, 39 e 40 (São Joaquim, SC).

O segundo grupo foi formado pelos isolados que apresentaram colônias de coloração branca-oliva, também observados em ambos os lados da placa de petri (Figura 6b) (Tabela 9), sendo estes os isolados 3 (Caçador, SC), 4 e 5 (Vacaria, RS), 6 e 9 (Frei Rogério, SC), 10 (Curitibanos, SC), 11, 12 e 13 (São Joaquim, SC), 14 (Palmas, PR), 15 e 16 (Fraiburgo, SC), 17, 18, 19, 20 e 21 (Campo Tenente, PR) e 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 (Palmeira, PR). Os isolados 4 (Vacaria, RS), 15 (Fraiburgo, SC), 18 e 19 (Campo Tenente, PR) e 26 (Palmeira, PR) também pertencentes a esse grupo apresentaram formação de setores (Figura 5).

O terceiro grupo foi formado pelos isolados que apresentaram colônias de coloração branco-marrom na parte de baixo da placa de petri e branco- acinzentada na parte de cima da placa, sem a formação de setores e com pouca presença de micélio aéreo (Figura 6c) (Tabela 9), sendo estes os isolados 7 e 8 (Frei Rogério, SC). De forma geral, as colônias de todos os isolados, independente do grupo em que esses foram classificados, apresentaram crescimento circular em meio de cultura (Figura 6).

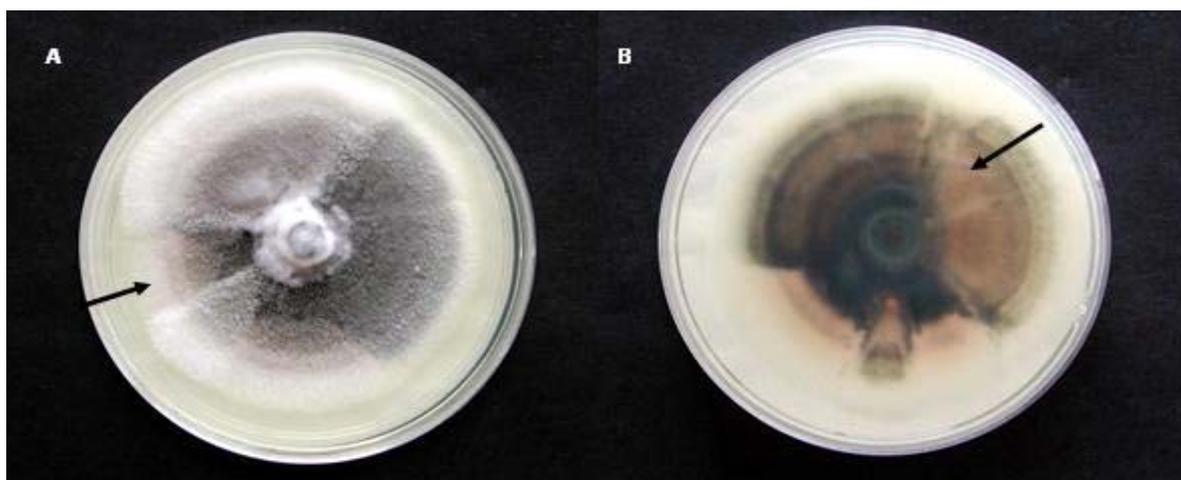


Figura 5. Colônia de *Colletotrichum* spp. apresentando formação de setores em meio de cultura BDA. A – vista frontal da placa de petri; B- vista do verso da placa de petri.

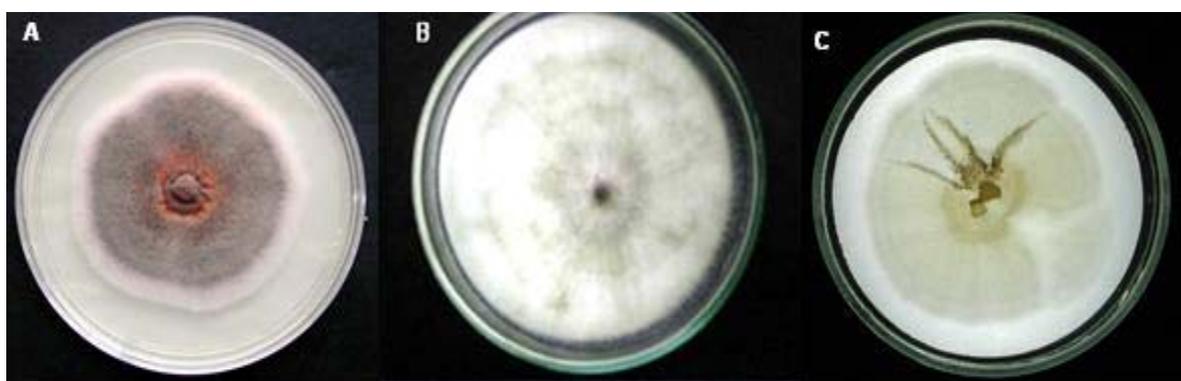


Figura 6. Colônias de *Colletotrichum* representativas de cada um dos três grupos formados no presente estudo. A- Grupo I; B- Grupo II; C- Grupo III.

Através da observação realizada em microscópio óptico das estruturas formadas, após incubação por 30 dias no escuro, em temperatura de 25°C, foi constatada a formação de peritécio nos isolados do segundo e terceiro grupo (Figura 7). Os isolados do primeiro e terceiro grupos não apresentaram a formação de peritécio (Tabela 9)

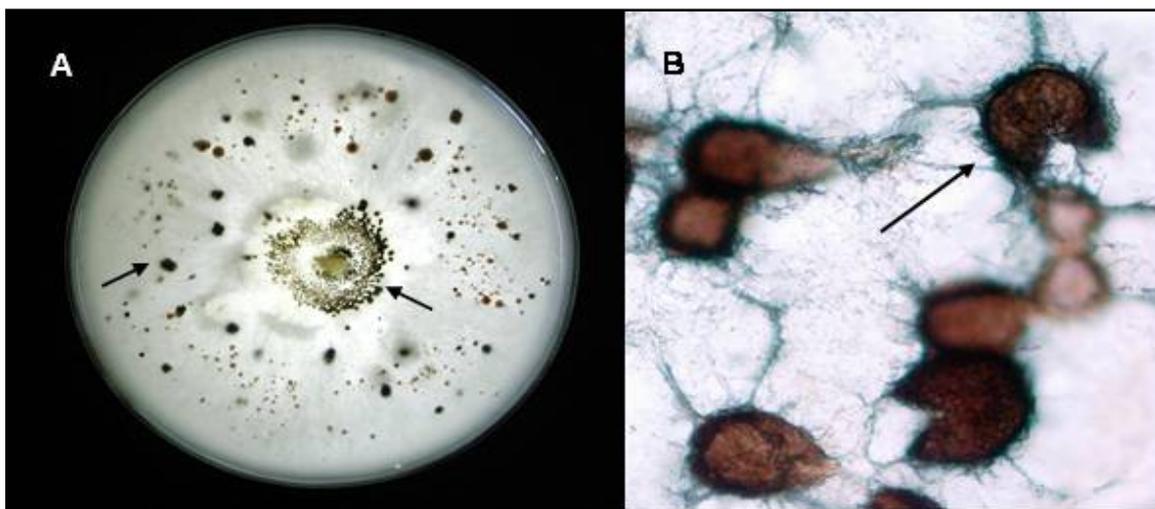


Figura 7. Peritécios formados por *Colletotrichum* spp. em meio BDA (A) e vistos em microscópio óptico (40X) (B).

Tabela 9. Características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. isolados de macieira, oriundos de diversas regiões produtoras do Brasil.

Grupo	Isolados	Características	Procedências
I	1, 2	Sem presença de peritécios	Caçador, SC
	31, 32, 33 e 34	e formação de setores.	Fraiburgo, SC
	35, 36, 37	Crescimento cilíndrico.	Palmas, PR
	38, 39, 40	Colônias de coloração rosada em ambos os lados da placa de petri.	São Joaquim, SC
II	3	Formação de peritécios em meio de cultura;	Caçador, SC
	4, 5	eventual formação de setores;	Vacaria, SC
	6, 9	crescimento cilíndrico.	Frei Rogério, SC
	10	Colônias de coloração branco-oliva em ambos os lados da placa de petri.	Curitibanos, SC
	11, 12, 13		São Joaquim, SC
	14		Palmas, PR
	15, 16		Fraiburgo, SC
	17, 18, 19, 20, 21		Campo Tenente, PR
	22, 24, 25, 26, 27, 28,		PR
	29, 30		Palmeira, PR

*continua*

*Continuação Tabela 9*

<b>Grupo</b>	<b>Isolados</b>	<b>Características</b>	<b>Procedências</b>
III	7 e 8	Formação de peritécios em meio de cultura; formação de setores; crescimento cilíndrico. Colônias de coloração branco-marrom na parte de baixo da placa de petri e branco-acinzentada na parte de cima da placa	Frei Rogério, SC

#### **4. Caracterização morfológica dos conídios**

Houve diferenças significativas entre a relação CC/LC dos isolados (Tabela 10), sendo observados conídios fusiformes (Figura 8a), com uma ou ambas as extremidades afuniladas, de tamanho variando entre 4,3 – 4,8 x 11,4 – 13,9  $\mu\text{m}$  (Tabela 10), principalmente nos isolados que formaram massa de conídios de coloração salmão dispersa no micélio (isolados 1 e 2, e 31, 32, 33 e 34, oriundos de Caçador, SC, e de Fraiburgo, SC, respectivamente), os quais apresentaram colônias de coloração rósea, crescimento mais lento em meio BDA e resistência ao fungicida benomyl.

Também foram observados conídios retos, do tipo bastonete, com ápices obtusos e bases às vezes truncadas, de tamanho médio variando entre 4,7 - 5,5 x 13,4 – 18,0  $\mu\text{m}$  (Figura 8b) (Tabela 10); os isolados que apresentaram este tipo de conídio foram: 3 (Caçador, SC), 4 e 5 (Vacaria, RS), 6 e 9 (Frei Rogério, SC), 10 (Curitibanos, SC), 11, 12 e 13 (São Joaquim, SC), 14 (Palmas, PR), 15 e 16 (Fraiburgo, SC), 17, 18, 19, 20 e 21 (Campo Tenente, PR) e 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 (Palmeira, PR). De forma geral, estes isolados formaram colônias de coloração oliva, crescimento rápido em meio BDA e sensibilidade ao benomyl.

Os conídios observados nos isolados obtidos a partir de lesões de Podridão Amarga típica (isolados 35, 36 e 37, provenientes de Palmas, PR, e os isolados 38, 39 e 40, provenientes de São Joaquim, SC), apresentaram-se bastante irregulares em relação ao

tamanho e formato (dentro de um mesmo isolado), apresentando grande variação em relação ao comprimento e à largura; sendo que as amplitudes médias variaram de 4,1 – 4,9  $\mu\text{m}$  x 10,5 – 15,7  $\mu\text{m}$  (largura x comprimento) (Figura 8c) (Tabela 10).

As relações CC/LC dos conídios dos isolados variaram entre 2,46 a 3,19; sendo que os maiores coeficientes foram observados nos conídios dos isolados de lesões de Podridão Amarga oriundas do estado de SC (Tabela 10).

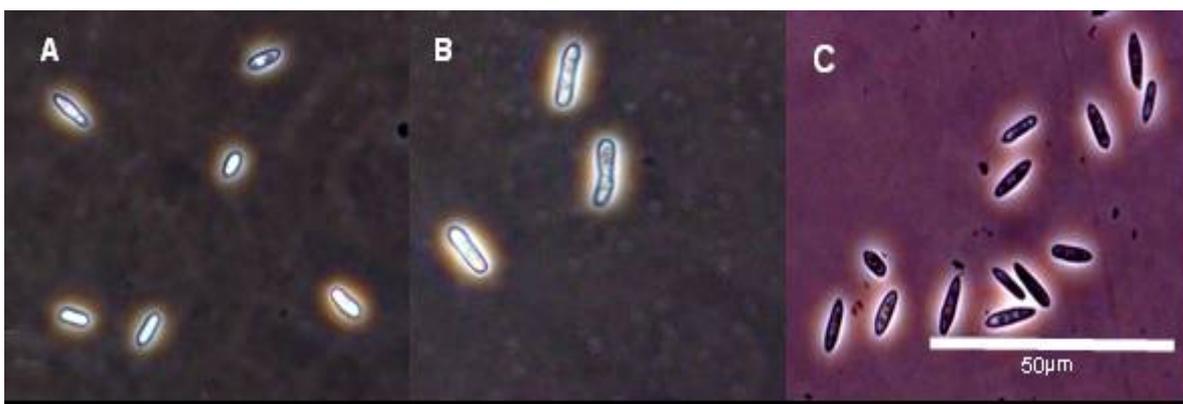


Figura 8. Conídios de *Colletotrichum* spp. observados em aumento de 40 X, através de contraste de fase. A - isolado 1 (proveniente de Caçador, SC); B - isolado 10 (proveniente de Curitiba, SC); C – isolado 38 (proveniente de São Joaquim, SC).

Tabela 10. Características morfológicas dos conídios e classificação da espécie dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Formato	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	Relação comp/ largura	Espécie
36	fusiforme	4,3 x 10,5	2,46 a	<i>C. acutatum</i>
34	fusiforme	4,3 x 11,1	2,58 ab	<i>C. acutatum</i>
8	bastonete	5,2 x 13,4	2,60 ab	<i>C. gloeosporioides</i>
35	fusiforme	4,1 x 10,6	2,60 abc	<i>C. acutatum</i>
7	bastonete	5,4 x 14,1	2,62 abc	<i>C. gloeosporioides</i>
1	fusiforme	4,3 x 11,4	2,65 abc	<i>C. acutatum</i>
37	fusiforme	4,2 x 11,3	2,67 abcd	<i>C. acutatum</i>
31	fusiforme	4,7 x 13,2	2,80 abcde	<i>C. acutatum</i>
2	fusiforme	4,3 x 12,2	2,83 bcdef	<i>C. acutatum</i>
33	fusiforme	4,8 x 13,7	2,83 bcdef	<i>C. acutatum</i>
38	fusiforme	4,6 x 13,0	2,84 bcdef	<i>C. acutatum</i>
9	bastonete	4,9 x 13,9	2,87 bcdef	<i>C. gloeosporioides</i>
11	bastonete	5,5 x 16,0	2,89 bcdefg	<i>C. gloeosporioides</i>
39	fusiforme	4,2 x 12,2	2,92 cdefghi	<i>C. acutatum</i>
28	bastonete	4,9 x 14,4	2,95 cdefgh	<i>C. gloeosporioides</i>
12	bastonete	5,2 x 15,6	2,99 cdefghi	<i>C. gloeosporioides</i>
30	bastonete	4,9 x 14,9	3,04 defghi	<i>C. gloeosporioides</i>
4	bastonete	4,9 x 14,9	3,05 defghi	<i>C. gloeosporioides</i>
32	fusiforme	4,5 x 13,9	3,08 efghijk	<i>C. acutatum</i>
21	bastonete	5,1 x 16,1	3,16 efghijk	<i>C. gloeosporioides</i>
29	bastonete	5,0 x 15,9	3,16 efghijk	<i>C. gloeosporioides</i>
23	bastonete	4,8 x 15,3	3,17 fghijkl	<i>C. gloeosporioides</i>
40	fusiforme	4,9 x 15,7	3,19 fghijkl	<i>C. acutatum</i>
25	bastonete	4,7 x 15,1	3,20 fghijkl	<i>C. gloeosporioides</i>
26	bastonete	4,9 x 15,9	3,22 ghijkl	<i>C. gloeosporioides</i>
22	bastonete	4,8 x 15,7	3,24 hijklm	<i>C. gloeosporioides</i>
20	bastonete	4,9 x 15,9	3,24 ijklmn	<i>C. gloeosporioides</i>
17	bastonete	5,1 x 16,6	3,29 ijklm	<i>C. gloeosporioides</i>
18	bastonete	4,7 x 15,7	3,30 ijklm	<i>C. gloeosporioides</i>
16	bastonete	5,1 x 17,1	3,34 klm	<i>C. gloeosporioides</i>
27	bastonete	4,9 x 16,3	3,35 ghijkl	<i>C. gloeosporioides</i>
10	bastonete	4,9 x 16,3	3,35 jklm	<i>C. gloeosporioides</i>

*continua*

Continuação da Tabela 10

19	bastonete	5,0 x 17,2	3,45 lmn	<i>C. gloeosporioides</i>
13	bastonete	4,8 x 16,6	3,46 lmn	<i>C. gloeosporioides</i>
5	bastonete	4,9 x 17,1	3,50 lmn	<i>C. gloeosporioides</i>
3	bastonete	5,0 x 17,6	3,54 mn	<i>C. gloeosporioides</i>
6	bastonete	5,0 x 18,0	3,59 mn	<i>C. gloeosporioides</i>
15	bastonete	4,8 x 17,4	3,67 n	<i>C. gloeosporioides</i>
14	bastonete	4,7 x 17,4	3,68 n	<i>C. gloeosporioides</i>

## DISCUSSÃO

De uma forma geral, os isolados puderam ser divididos em dois grupos distintos, caracterizados como *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Todos os isolados do grupo I (Tabela 9) foram caracterizados como *C. acutatum* por suas características morfológicas e culturais, como crescimento mais lento em meio de cultura quando comparados a isolados de *C. gloeosporioides* e por produzirem massa de conídios de coloração salmão diretamente no micélio e por geralmente apresentarem conídios de formato elíptico e fusiforme. A presença de *C. acutatum* já havia sido relatada anteriormente em macieira por BERNSTEIN et al. (1995), na identificação de espécies de *Colletotrichum* juntamente com outras espécies como pêsego e pecan, os quais conseguiram distinguir as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* pela morfologia dos esporos e características culturais. Estes mesmos autores observaram que isolados que apresentaram colônias de coloração rósea e presença de massa de conídios de coloração salmão cresceram mais lentamente e apresentavam conídios menores, freqüentemente fusiformes em relação àqueles que apresentaram colônias de coloração oliva, classificando-os como *C. acutatum*. Essas mesmas características também foram observadas em isolados de *C. acutatum* isolados de morango, e serviram como critério de classificação da espécie em trabalho realizado por SMITH et al. (1990).

A produção de conídios em massa de coloração salmão e o formato elíptico e fusiforme destes são características pertencentes à espécie *C. acutatum*, sendo utilizadas em trabalhos de identificação de espécies como os desenvolvidos por KURAMAE-IZIOKA et

al. (1997), com espécies de *Colletotrichum* causadoras de podridões pós-colheita em *citrus*, por LARDNER et al. (1999) e por FREEMAN et al. (1998) com espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em várias frutas.

No presente trabalho, embora os isolados 35, 36, 37 (Palmas, PR) e 38, 39, 40 (São Joaquim, SC), tenham sido isolados de lesões de Podridão Amarga típicas encontradas em frutos de maçã, estes não foram identificados como *Glomerella cingulata*, mas sim como *C. Acutatum*, devido a não formação de peritécio em meio de cultura. Por *Glomerella cingulata* ser um patógeno comumente associado com a cultura da macieira no Brasil (BONETI et al., 2002), era de se esperar que os isolados obtidos a partir de lesões de PA fossem identificados como sendo dessa espécie. Similar resultado foi encontrado com isolados coletados em pomares de maçã dos Estados Unidos onde foi constatado que sintomas de Podridão Amarga em maçã são também causados por *C. acutatum* (SHI et al., 1996; BERNSTEIN et al., 1995; SUTTON, 1990).

Todos os isolados classificados como *C. acutatum* foram identificados como sendo do tipo cromogênico, ou seja, com colônias de coloração rosada (Figura 7). SHI et al. (1996), em trabalho realizado em frutos de maçã, descrevem que tipos cromogênicos estão associados exclusivamente com *C. acutatum*. Isolados cromogênicos de *C. acutatum* têm sido bastante relatados na literatura, sendo isolados a partir dos mais diversos patossistemas e cultivados *in vitro* em condições semelhantes às que foram empregadas neste trabalho, tais como o patossistema *Colletotrichum x Prunus dulcis* (FORSTER et al., 1999), e sendo relatados também em estudos de caracterização de espécies, tais como os realizados por GUERBER et al. (2001) e por LARDNER et al. (1999).

O termo cromogênico pode ser muito informativo, devido à variabilidade fenotípica natural exibida pelas colônias de isolados de *Colletotrichum*, sendo assim um importante critério de classificação. Em trabalho realizado com a caracterização de espécies de *Colletotrichum* isolados a partir de frutos de maçã nos Estados Unidos, a coloração das colônias entre isolados de uma mesma espécie não variou muito, permitindo que as espécies fossem bem distinguidas através da coloração da colônia de seus isolados (SHI et al., 1996).

Os isolados de *C. acutatum* apresentaram, também, abundante produção de conídios em meio de cultura e resistência ao fungicida benomyl, à semelhança do que foi

observado por BONETI et al. (1999a) através do levantamento de espécies envolvidas com a MG no Estado de Santa Catarina, confirmando a identidade dos isolados. A baixa sensibilidade observada nas espécies de *C. acutatum* ao fungicida benomyl vêm sendo utilizada como critério de classificação de espécies em hospedeiros como pessegueiro e macieira (BERNSTEIN et al., 1995; BONETI et al., 1999b), morango, abóbora, melão, cyclamen (ISHII et al., 1998) e em *Citrus* (BROWN et al., 1996; LIYANAGE et al., 1992; PERES et al., 2004).

Esta sensibilidade moderada ou baixa (observadas nos isolados aqui classificados como resistentes) de isolados de *C. acutatum* já foi relatada na literatura por GOES et al. (1998) em isolados oriundos de frutos de *Citrus*, os quais tiveram redução de 40 e 85% no crescimento micelial quando estes foram submetidos a concentrações de benomyl de 1 e 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com PERES et al. (2004) essa sensibilidade moderada é mais freqüente em relação à sensibilidade ou à resistência nesta espécie, porque mutações conferindo altos níveis de resistência ao benomyl aparecem muito raramente ou não existem em populações de *C. acutatum*. Quanto à formação de peritécio, para *C. acutatum*, não foi observada a sua formação em nenhum dos isolados.

Os isolados classificados como *C. gloeosporioides* foram inseridos nos grupos II e III (Tabela 6), tiveram esta classificação com base no estudo anterior realizado por BONETI et al. (1999b) que identificaram como sendo desta espécie os isolados com micélio mais escuro, de cor verde oliva a marrom, que apresentaram crescimento mais rápido em meio de cultura (BDA) e pouca produção de conídios. Outra característica morfológica observada, é na formação de peritécios, pois todos os isolados classificados como *C. gloeosporioides* formaram esta estrutura em meio de cultura, fato que reforça a identidade destes indivíduos nesta espécie. De acordo com trabalho realizado por LATHAM e WILLIAMS (1983), isolados de frutos de maçã que formaram peritécio também apresentaram rápido crescimento em meio BDA e colônias de coloração variando de verde a oliva.

A habilidade na formação de peritécios pelos isolados caracteriza a presença da fase perfeita *Glomerella* spp. Sendo assim, nota-se que os isolados de *C. gloeosporioides* produziram a fase perfeita em meio de cultura (BDA), enquanto que os de *C. acutatum* não produziram. A pronta formação de peritécios em meio de cultura por *C. gloeosporioides*, isolado de macieira, já havia sido anteriormente relatado por CRUSIUS (2000) e por

KATSURAYAMA et al. (2000) trabalhando com isolados causadores de Mancha da Gala na cv. Gala, oriundos de pomares do sul do Brasil, e por SHI et al. (1996) na caracterização de espécies causadoras de Podridão Amarga em pomares de maçã do sudeste dos Estados Unidos.

Entretanto, certos autores afirmam que a produção peritecial é muito sensível às condições ambientais (PEREIRA, 2005), pois a presença do patógeno causador da Mancha da Gala no pomar em sua fase perfeita não foi observada até o momento (KATSURAYAMA et al., 2001), este fato pode ser um indicativo de que a fase sexuada não é crucial para a sobrevivência de *C. gloeosporioides* em condições adversas, como no inverno em que as folhas de macieira caem em função desta ser uma espécie decídua, fazendo com que o patógeno necessite sobreviver em outros tecidos do hospedeiro, em hospedeiros secundários ou desenvolva estruturas de sobrevivência (SHANE et al., 1981).

Dentre os isolados classificados como *C. gloeosporioides*, foram identificados dois grupos quando se levou em conta a sensibilidade ao benomyl, um grupo com isolados sensíveis ao benomyl e outro com isolados insensíveis ao benomyl. Segundo FREEMAN et al. (1998), isolados desta espécie são altamente sensíveis ao fungicida benomyl, pois não apresentaram nenhum tipo de crescimento na presença deste. De acordo com DAVIDSE (1986), isolados de *C. gloeosporioides* são sensíveis ao benomyl por este agir diretamente no metabolismo do fungo inibindo a formação da molécula de tubulina, ao contrário do que ocorre com *C. acutatum* que geralmente apresenta-se resistente ao benomyl. Entretanto, a causa da baixa sensibilidade desta última espécie ao fungicida ainda não é bem conhecida (PERES, 2004).

A maioria dos isolados foi sensível ao fungicida, entretanto os isolados 17, 18, 19, 20 e 21, todos oriundos de um pomar comercial do município de Campo Tenente, PR, mostraram-se resistentes, com crescimento normal na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. A única diferença observada entre os isolados dos dois grupos de *C. gloeosporioides* foi à sensibilidade a este fungicida, pois estes não diferiram estatisticamente para as demais variáveis analisadas. Sendo assim, pode-se dizer que os isolados 17, 18, 19, 20 e 21 são isolados de *C. gloeosporioides* que diferem dos até então trabalhados no patossistema *Colletotrichum* maçã.

Uma das hipóteses sugeridas para a ocorrência desta resistência seja o intensivo uso de fungicidas na região em que os isolados foram coletados, e o tempo em que a doença já está estabelecida na região (aproximadamente 20 anos). Desta forma, a pressão de seleção a que o patógeno foi exposto é maior em relação às demais regiões em que a doença ocorre, proporcionando o favorecimento de isolados resistentes. Um dos mecanismos que podem levar a resistência de patógenos a determinados fungicidas é a mutação (ISHII et al., 1998). A resistência de fungos ao benomyl geralmente é dada por mutações no gene da  $\beta$ -tubulina (PERES et al., 2004), sendo que no gênero *Colletotrichum* esse tipo de resistência já vem sendo relatado na literatura, como em trabalho realizado por BUHR et al. (1994) com a espécie *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, que observou que isolados que possuíam mutação neste gene eram resistentes ao benomyl.

Vários outros patossistemas também apresentaram casos de resistência a este fungicida, como *Venturia inaequalis* em macieira (KOENRAADT et al., 1992), *Mycosphaerella citri* em citrus (WHITESIDE, 1980a) e *Elsinoe fawcettii* também em citrus (WHITESIDE, 1980b). Em interação *Mycosphaerella fijinensis* x *Musa* observaram a ocorrência de isolados resistentes em pomares comerciais ao fungicida benomyl, o qual havia sido utilizado durante 10 anos para controle do patógeno, enquanto que isolados resistentes não foram encontrados em pomares que não possuíam histórico de uso do fungicida (ROMERO et al., 1998).

Estes estudos demonstram a influência do uso contínuo do fungicida no aparecimento de isolados resistentes. Isolados resistentes ao benomyl podem permanecer na natureza por muito tempo mesmo após a interrupção do uso do fungicida (KOENRAADT et al., 1992).

## CONCLUSÃO

- Através de avaliações morfológicas e culturais foi possível observar duas espécies de *Colletotrichum*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, as quais estão envolvidas com a Mancha da Gala na Região Sul do Brasil.

- As variáveis mais eficientes utilizadas para discriminação e identificação dos isolados foram a coloração das colônias, a presença ou não de peritécios, a sensibilidade dos isolados ao fungicida benomyl e a forma dos conídios.
- Através das características morfológicas e culturais não se observaram diferenças entre os isolados das regiões amostradas, mas sim entre isolados de uma mesma região.
- Foi possível observar que na região de Palmeira, PR, existem isolados resistentes ao benomyl, sendo que este tipo de isolado não foi observado em nenhuma das demais regiões amostradas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BONETI, J.I. and KATSURAYAMA, Y. Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork) In: Boneti, J.I.; Ribeiro, L.G.; Katsurayama, Y. (eds) **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis, Epagri, 1999a. 149 p.

BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y.; OZAWA, T. Levantamento das espécies de *Colletotrichum* associadas com a mancha foliar de *Glomerella* em macieira, cv Gala, no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, resumos (143). 1999b.

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

CRUSIUS, L.U. **Epidemiologia da Mancha Foliar da Macieira**. Passo Fundo, UPF, 2000. Tese de Mestrado. 58p.

DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual Review of Phytopathology** 24:43-65. 1986.

FORSTER, H. and ADASKAVEG, J.E. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. **Phytopathology** 89:1056-1065. 1999.

FREEMAN, S.; KATAN, T. and SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **Plant Disease** 82:596-605. 1998.

FREEMAN, S.; NIZANI, Y.; DOTAN, S.; EVEN, S.; SANDO, T. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions. **Plant Disease** 81: 749-752. 1997.

- GOES, A.; KIMATI, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível a benomyl? **Summa Phytopathologica**. 24:246-253. 1998.
- GUERBER, J.C. and CORRELL, J.C. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. **Mycologia** 93:216-229. 2001.
- GUNNELL, P.S. and GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia** 84: 157- 165. 1992.
- ISHII, H.; IWAMOTO, S.; NISHIMURA, K.; FUKAYA, M. Comparative studies on fungicide sensitivity and other characteristics in *Colletotrichum* isolated from various plant species. In.: **The 1998 Brighton Conference – Pests & Diseases**. 529-534. 1998.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & BECKER, W.F.; OZAWA, T. & TSUCHIYA, S. Epidemiologia das Doenças da Macieira no Subtrópico e Perspectivas de Manejo Integrado: Caso da Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.). In: **SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental**, 1., 2001. Florianópolis, SC. Anais... Florianópolis, Epagri, 2001. 161p.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.; OZAWA, T. Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da Mancha Foliar da Gala. **Fitopatologia Brasileira** 25 (suplemento): 383 (resumos). 2000.
- KOENRAADT, H.; SOMERVILLE, S.C.; JONES, A.L. Characteristics of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. **Phytopathology** 82: 1348-1354. 1992.
- KURAMAE-IZIOKA, E.E.; LOPES, C.R.; SOUZA, N.R. and MACHADO, M.A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal Plant Pathology** 103: 323-329. 1997.
- LARDNER, R.; JOHNSTON, P.R.; PLUMMER, K.M. and PERSON, M.N. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. **Mycological Research** 103:275-285. 1999.
- LATHAM, A.J. AND WILLIAMS, J.C. Cultural characteristics and pathogenicity of *Glomerella cingulata* isolates from apple in Alabama. **Plant Disease** 67: 1065-1068. 1983.
- LIYANAGE, H.D.; McMILLAN, R.T.; KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology** 82: 1371-1376. 1992.
- LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum* in **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, volume 9: 291-339, 2001. Passo Fundo.
- PEREIRA, I.S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella* – *Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. Lavras, UFLA, 2005. Tese de mestrado. 92p.

- PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease** 88: 125-130. 2004.
- ROCA M., M.G.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C; DAVIDE, L.C.; ROCHA, M.L.M. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira** 29(1):16-20. 2004.
- ROMERO, R.A.; SUTTON, T.B. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of Black Sigatoka of banana, in Costa Rica. **Plant Disease** 82: 931-934. 1998.
- SHABI, E.; KATAN, T.; GERA, H.; ELISHA, S. Taxonomic determination of pathogenic *Colletotrichum gloeosporioides* of almond, anemone and avocado according to fungicide sensitivity. (Abstract) **Phytoparasitica** 21:2. 1993.
- SHANE, W.W; SUTTON, T.B. The *Glomerella cingulata* perfect stage and apple bitter rot. **Plant Disease** (65):135-137. 1981.
- SHI, Y.; CORRELL, J.C.; GUERBER, J.C. and ROM, C.R. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. **Plant Disease** 80: 692-696. 1996.
- SMITH, B.J. and BLACK, L.L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease** 74: 69-76. 1990.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3<sup>a</sup> ed. New York: WH Freeman, 1995. 881p.
- SUTTON, B.C. **The Coelomycetes Fungi Imperfect whit Pycnidia, Acervuli and Stromata**. CMI, Kew, Surrey, UK. 1980.
- SUTTON, T.B. Bitter Rot. In.: **Compendium of apple and pear diseases**. A. L. Jones and H. S. Aldwinckle, eds. American Phytopathological Society, St Paul, MN. 1990.
- TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L.G.; SARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Cienc. Agrotec.** 25(6): 1314-1320. 2001.
- WHITESIDE, J.O. Detection of benomyl tolerant strains of *Elsinoe fawcettii* in Florida citrus groves and nurseries. **Plant Disease** 64: 871-872. 1980b.
- WHITESIDE, J.O. Tolerance of *Mycosphaerella citri* to benomyl in Florida citrus groves. **Plant Disease** 64: 300-302. 1980a.

## CAPÍTULO II

---

### TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM CULTIVAR RESISTENTE E SUSCETÍVEL

#### INTRODUÇÃO

Testes de patogenicidade através de inoculações realizadas sob condições controladas, em laboratório ou até mesmo a campo, são muito importantes na identificação da sintomatologia e caracterização das relações patógeno-hospedeiro (BIGGS et al., 2001), sendo que conhecimentos aprofundados sobre a etiologia do patógeno são fundamentais para estudos de cruzamentos visando resistência a doenças (FREEMAN et al., 1998).

As doenças causadas por espécies de *Colletotrichum* podem ser agrupadas conforme o tecido primeiramente atacado, como folhas, flores ou frutos (LOPEZ, 2001). No caso da Mancha da Gala, a doença atinge, principalmente, folhas e frutos, independente da idade ou do estágio de desenvolvimento; podendo causar a senescência das folhas e a depreciação dos frutos. Nas folhas, as lesões são inicialmente avermelhadas, sem margens definidas, distribuídas ao acaso no limbo foliar e de tamanho que varia de 1 a 4 mm de diâmetro. Essa lesão evolui até tornar-se amarelo acinzentada, às vezes, com margens marrom avermelhadas (BONETI et al., 1999; VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002). No centro das lesões antigas, desenvolvem-se pontos escuros, acérvulos e peritécios que são corpos de frutificação do fungo (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002). A partir dessas estruturas são iniciados novos ciclos de infecção (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1999). A doença ataca tanto as folhas velhas quanto as mais novas, entretanto, as novas são muito mais suscetíveis (BONETI et al., 1999). Os primeiros sintomas surgem na parte baixa e interna das plantas (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1999; 2002). Geralmente, as folhas lesionadas amarelecem e caem rapidamente (BONETI et al., 1999).

Nos frutos, em qualquer fase de desenvolvimento, surgem numerosas pontuações deprimidas, de aproximadamente 1 mm de diâmetro e de cor marrom claro a marrom escuro. Estas lesões não evoluem para a podridão amarga dos frutos (BONETI et al., 1998). No entanto, as manchas podem ser contaminadas por estirpes associadas à Podridão

Amarga das maçãs que estejam presentes na superfície dos frutos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1999).

O objetivo desta etapa do trabalho foi testar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de pomares de macieira, de diversas regiões produtoras do Brasil, em folhas e frutos de cultivar resistente (Fuji) e suscetível (Gala).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Material vegetal**

Para a inoculação nas folhas das cultivares Gala (suscetível) e Fuji (resistente) foram utilizados ramos coletados do campo, com aproximadamente, 20 cm de comprimento, apresentando de 8 a 10 brotações novas, coletadas no pomar da Estação Experimental de São Joaquim – Epagri, nos meses de novembro a dezembro. Foram inoculados quatro ramos de cada cultivar para cada um dos 39 isolados, totalizando 156 ramos de cada cultivar. Depois de coletados, estes foram acondicionados em caixas de isopor com gelo e imediatamente foram colocados em becker com água destilada para evitar a desidratação dos mesmos até o momento da inoculação.

Para o teste de patogenicidade em frutos, foram utilizados frutos maduros de ambas as cultivares, os quais estavam mantidos em câmara fria por aproximadamente um mês após a colheita. Foram inoculados frutos com e sem ferimento, sendo feitas três perfurações por fruto em apenas um dos lados do fruto, com o auxílio de um alfinete entomológico previamente esterilizado com álcool 70%. Em seguida a realização dos ferimentos foi realizada a inoculação.

### **2. Isolados e inoculação**

Foram utilizados para inoculação 39 isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de diversas regiões produtoras do sul do Brasil, conforme descrito no Capítulo I. Para isso, colônias dos isolados foram mantidas em meio de cultura BDA (39g/ L) durante 14 dias no escuro a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A suspensão de conídios utilizada para as inoculações foi obtida

através de raspagem superficial do micélio das placas de petri e filtragem em gaze esterilizada. Foi realizada a contagem da concentração da suspensão através de hemacitômetro e ajustada para  $1,0 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> através de diluição em água destilada. A inoculação foi realizada através da pulverização da suspensão de conídios utilizando um pulverizador manual Glass Spray SN-60, da marca Sansyo, Japan.

### **3. Inoculação e a avaliação da patogenicidade dos isolados em folhas**

Os ramos mantidos em beckers com água destilada foram inoculados e mantidos no escuro em câmara úmida em temperatura a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com 100% de umidade relativa, durante 44 horas. Depois de passado este período, os ramos foram transferidos para sala de crescimento regulada a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram durante 48 horas, tempo necessário para a manifestação dos sintomas. A testemunha foi inoculada com água destilada e mantida sob as mesmas condições dos demais ramos inoculados com os isolados de *Colletotrichum* spp.

Foi realizada, então, a avaliação da percentagem de incidência e da severidade dos sintomas nos ramos inoculados. Para a avaliação da severidade foi utilizada escala de notas exponencial proposta por KATSURAYAMA (comunicação pessoal), onde 0: sem presença de sintomas; 1: presença de 1 a 2 lesões; 2: de 3 a 5 lesões; 3: de 6 a 11 lesões; 4: de 12 a 24 lesões; 5: de 25 a 49 lesões; 6: de 50 a 74 lesões; 7: mais de 75 lesões. Foram avaliadas as cinco primeiras folhas a partir do ápice de cada ramo inoculado, sendo inoculados quatro ramos de cada cultivar.

### **4. Inoculação e avaliação da patogenicidade dos isolados em frutos**

Após a inoculação nos frutos, estes foram mantidos no escuro na mesma câmara úmida utilizada para o ensaio com as folhas, com 100% de umidade relativa em temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 144 horas. Após este período, os frutos foram transferidos para BOD regulada à mesma temperatura, e mantidos durante 96 horas, até o aparecimento dos sintomas.

Foram realizadas avaliações do número de lesões e da percentagem de incidência nos frutos, bem como do tipo de lesão (Mancha da Gala ou Podridão Amarga) causada por cada isolado. A severidade dos sintomas foi determinada através da contagem do número de lesões em uma área de 7,0 cm<sup>2</sup>, medida através de um disco de papel, colocado sempre no mesmo local do fruto (KATSURAYAMA, comunicação pessoal).

## **5. Delineamento experimental e análise estatística**

Para o ensaio de inoculação de folhas, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado sendo que cada ramo representou uma repetição, ou seja, foram feitas quatro repetições por isolado por cultivar. Para a inoculação dos frutos o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado sendo utilizados três frutos com ferimento e três sem ferimento por isolado para cada cultivar, sendo que cada fruto constituiu uma repetição. Quando cumpridos os pressupostos, os dados de ambos os ensaios foram submetidos à análise de variância e posterior teste de separação de médias (SNK,  $\alpha=0,05$ ) (SOKAL et al., 1995).

## **RESULTADOS**

### **1. Inoculação dos isolados em folhas**

Sintomas de *Colletotrichum* spp. foram observados somente em ramos da cultivar Gala, não sendo observados nenhum sintoma na cultivar resistente Fuji. Entretanto, na cv Gala foram observados dois tipos de sintomas distintos, o de Mancha da Gala (MG), com lesões de coloração marrom, bem definidas e às vezes com margens marrom avermelhadas (Figura 1a), os quais foram observados nos isolados 3 (Caçador, SC); 4, 5 (Vacaria, RS); 6, 9 (Frei Rogério, SC); 10 (Curitibanos, SC); 11, 12, 13 (São Joaquim, SC); 14 (Palmas, PR); 15, 16 (Fraiburgo, SC); 17, 18, 19, 20, 21 (Campo Tenente, PR); 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (Palmeira, PR).

O outro tipo de sintoma observado foi caracterizado por pequenas pontuações necróticas encontradas em grande número e dispersas por toda a área foliar (Figura 1b),

estas lesões foram ocasionadas pelos isolados 31, 32, 33 e 34, que são provenientes de pomar comercial localizado em Fraiburgo, SC.

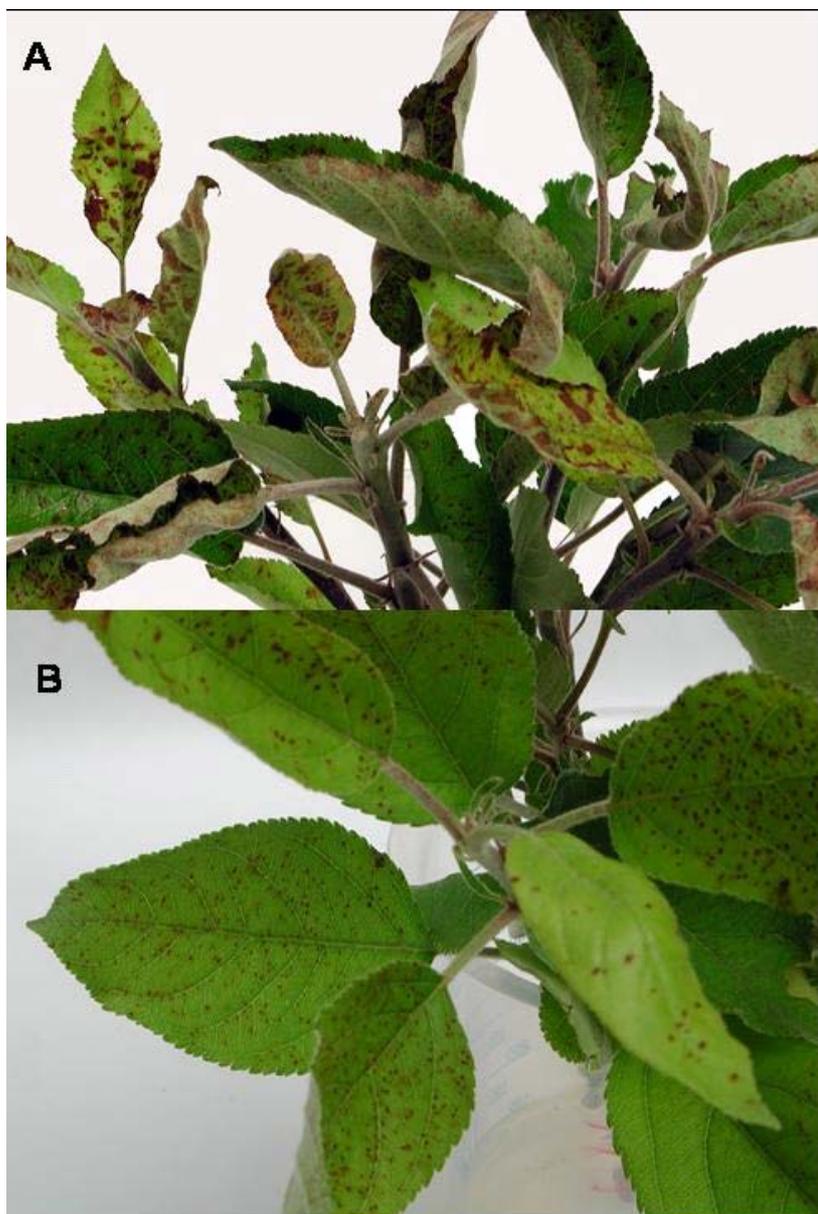


Figura 1. Ramos de macieira cv Gala inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp. apresentando dois tipos diferentes de sintomas: lesões típicas de Mancha da Gala (A) e pontuações de Mancha necrótica (B).

Pela análise de variação, a percentagem de incidência foi significativa entre os isolados testados, a um nível de significância de 5% pelo teste F (Tabela 1).

Tabela 1. Análise da variação para a percentagem de incidência de doença observada em folhas de macieira da cultivar Gala.

<b>Causa da Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Isolados	39	0,3181**
Resíduo	150	0,0461
CV%		23,95

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A percentagem de incidência variou entre 0% (na testemunha) e 100% (Tabela 2). Sendo que os isolados 6, 7, 8 (Frei Rogério, SC) e 35 (Palmas, PR) apresentaram a menor percentagem de incidência de doença observada (50%), seguidos dos isolados 1, 3 (Caçador, SC), 21 (Campo Tenente, PR), 31 (Fraiburgo, SC) e 37 (São Joaquim, SC) com 75% de incidência. Os demais apresentaram 100% de incidência de sintomas causados por *Colletotrichum* spp (Tabela 2).

Os dados referentes ao número de lesões não puderam ser analisados através da estatística paramétrica por não apresentarem homogeneidade de variâncias. Sendo assim, estes dados foram submetidos à análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis, apresentando diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ) em relação ao número de lesões ocasionadas pelos isolados. Entretanto, não foi possível a realização do teste de separação de médias devido a limitações operacionais, tais como o grande número de isolados trabalhados. Os isolados que ocasionaram os maiores índices de severidade foram os isolados 9, 10, 15, 16, 18, 19, 20, 24, 25, 26, 27, 30 e 32, os quais apresentaram médias variando entre 6,8 a 7,0 no índice de severidade, o que representa mais de 75 lesões por folha, e os que menos sintomas ocasionaram foram os isolados 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 21, 31, 35, 36, 37, 38, 39 e 40, com médias variando entre 0,15 a 0,70, praticamente sem presença de sintomas (Tabela 2).

Tabela 2. Percentagem de incidência e severidade média observada nos isolados de *Colletotrichum* spp. de macieira, oriundos de diversas regiões produtoras do Brasil, inoculados em ramos da cultivar Gala.

Isolado	Procedência (município/ Estado)	Incidência (%) <sup>1</sup>	Número de lesões
Testemunha		0,0 a	0,00
35	Palmas/ PR	50 b	0,15
8	Frei Rogério/ SC	50 b	0,20
6	Frei Rogério/ SC	50 b	0,25
37	Palmas/ PR	75 b	0,25
31	Fraiburgo	75 b	0,30
7	Frei Rogério/ SC	50 b	0,35
36	Palmas/ PR	100 b	0,35
38	São Joaquim/ SC	100 b	0,40
40	São Joaquim/ SC	100 b	0,40
3	Caçador/ SC	75 b	0,45
21	Campo Tenente/ PR	75 b	0,50
1	Caçador/ SC	75 b	0,55
2	Caçador/ SC	100 b	0,65
39	São Joaquim/ SC	100 b	0,70
4	Vacaria/ RS	100 b	1,40
11	São Joaquim/ SC	100 b	1,85
5	Vacaria/ RS	100 b	2,20
34	Fraiburgo	100 b	2,65
28	Palmeira/ PR	100 b	2,90
33	Fraiburgo	100 b	3,20
13	São Joaquim/ SC	100 b	3,30
14	Palmas/ PR	100 b	3,45
17	Campo Tenente/ PR	100 b	4,05
12	São Joaquim/ SC	100 b	4,10
29	Palmeira/ PR	100 b	4,70
22	Palmeira/ PR	100 b	4,90
32	Fraiburgo	100 b	5,35
10	Curitibanos/ SC	100 b	6,15
16	Fraiburgo/ SC	100 b	6,15
9	Frei Rogério/ SC	100 b	6,20
26	Palmeira/ PR	100 b	6,20
19	Campo Tenente/ PR	100 b	6,50
25	Palmeira/ PR	100 b	6,50
20	Campo Tenente/ PR	100 b	6,65
30	Palmeira/ PR	100 b	6,80
15	Fraiburgo/ SC	100 b	6,85
24	Palmeira/ PR	100 b	6,85
18	Campo Tenente/ PR	100 b	6,90
27	Palmeira/ PR	100 b	7,00

<sup>1</sup>Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de separação de médias SNK.

## 2. Inoculação dos isolados em frutos

Sintomas foram observados nos frutos das cultivares Gala e Fuji, sintomas típicos de Mancha da Gala foram observados somente na cv Gala e sintomas típicos de Podridão Amarga foram observados para ambas as cultivares testadas. Alguns dos isolados não ocasionaram nenhum tipo de sintoma nas duas cultivares testadas. Os isolados que produziram sintomas típicos de Mancha da Gala (Figura 2a) em frutos de maçã da cv Gala, foram os isolados 4, 5 (Vacaria/ RS), 6 (Frei Rogério, SC), 10 (Curitibanos, SC), 11, 13 (São Joaquim, SC), 14 (Palmas, PR), 16 (Fraiburgo, SC), 17, 18, 19, 20 (Campo Tenente, PR) e 22, 24, 25, 26, 27, 28, 30 (Palmeira, PR). Esses isolados, quando inoculados na cv Fuji ocasionaram sintomas apenas nos frutos com ferimento artificial (dados não mostrados).

Os isolados que ocasionaram sintomas típicos de Podridão Amarga (Figura 2b) foram os isolados 1, 2 (Caçador, SC); 31, 32, 33 e 34 (Fraiburgo, SC); 35, 36, 37 (Palmas, PR) e 38, 39, 40 (São Joaquim, SC). Os isolados 3 (Caçador, SC); 7, 8 e 9 (Frei Rogério, SC); 12 (São Joaquim, SC); 15 (Fraiburgo, SC); 21 (Campo Tenente, PR) e 29 (Palmeira, PR) não produziram nenhum tipo de sintoma em ambas as cultivares testadas quando os frutos não possuíam ferimentos artificiais, sendo observados sintomas de podridão apenas nos frutos com ferimento (dados não mostrados).

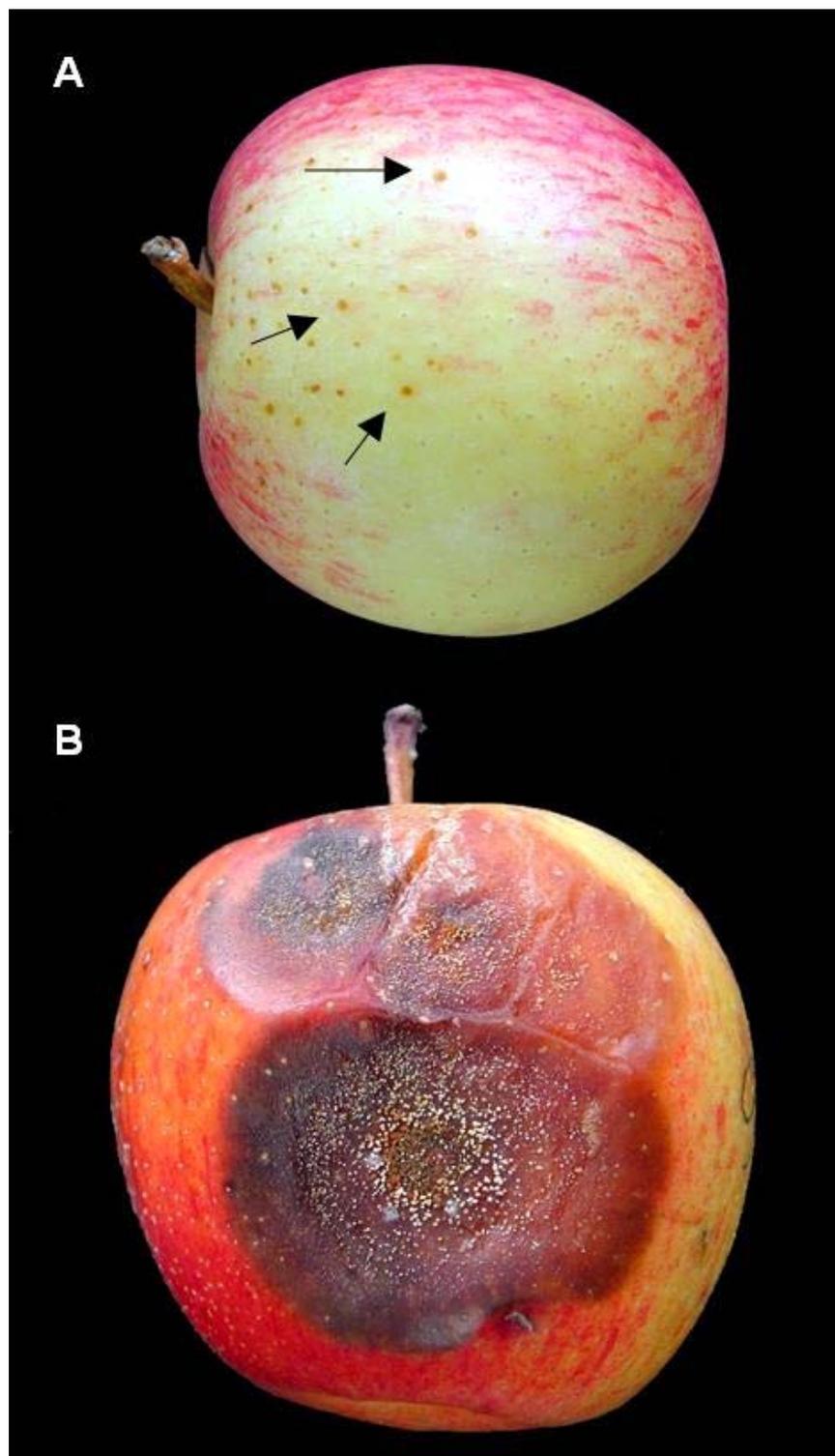


Figura 2. Sintomas provocados pelos isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em frutos de macieira, cv Gala. A- lesões típicas de MG. B- Lesões típicas de PA.

A análise de variação do ensaio de inoculação nos frutos de Gala apresentou efeito significativo para os fatores isolados (A), Fermentos (B) e na interação AxB para variável porcentagem de incidência de doença foi significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 3). Na inoculação dos frutos de Fuji, a interação entre os fatores não foi significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 4).

Tabela 3. Análise da variação para a porcentagem de incidência de doença ocasionada por isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos da cv Gala, com e sem fermento.

<b>Causas de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Isolados (A)	39	778,01**
Fermentos (B)	1	12877,35**
A xB	39	889,14**
Resíduo	160	66,85
CV%	8,19	

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4. Análise da variação para a porcentagem de incidência de doença ocasionada por isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos da cv Fuji, com e sem fermento.

<b>Causas de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Isolados (A)	39	1,487**
Ferimentos (B)	1	45,93 <sup>NS</sup>
A xB	39	0,42 <sup>NS</sup>
Resíduo	160	0,43
CV%	10,60	

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>NS</sup> – não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tanto dentro da cultivar Gala quanto da cultivar Fuji, observou-se que os isolados que ocasionaram sintomas típicos de podridão amarga (1, 2, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40) diferiram significativamente dos isolados que causaram sintomas de Mancha da Gala em relação a porcentagem de incidência de doença, apresentando maiores índices de incidência (Tabela 5).

Os dados referentes ao número de lesões não puderam ser analisados através da estatística paramétrica por não apresentarem homogeneidade de variâncias (dados não mostrados). Sendo assim, estes dados foram submetidos à análise não paramétrica pelo

teste de Kruskal-Wallis, apresentando diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ) em relação ao número de lesões ocasionadas pelos isolados. Entretanto, não foi possível a realização do teste de separação de médias devido a limitações operacionais, tais como o grande número de isolados trabalhados. Na cultivar Gala, os isolados que ocasionaram o maior número de lesões por fruto foram os isolados 1 e 2 (Caçador, SC), 15 e 16 (Fraiburgo, SC), 27 (Palmeira, PR), 31, 32, 33 e 34 (Fraiburgo, SC), 35, 36 e 37 (Palmas, PR) e 40 (São Joaquim, SC), os quais apresentaram médias variando entre 23,33 (nos isolados 16 e 27) a 66,66 (no isolado 33) número de lesões por fruto, e os isolados que ocasionaram menos número de lesões por fruto foram os isolados 3 (Caçador, SC), 4 e 5 (Vacaria, RS), 6, 7, 8 e 9 (Frei Rogério, SC), 10 (Curitibanos, SC), 11, 12, e 13 (São Joaquim, SC), 14 (Palmas, PR), 17, 18, 19, 20 e 21 (Campo Tenente, PR), 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30 (Palmeira, PR), 38 e 39 (São Joaquim, SC) (Tabela 5).

Dentre os isolados que ocasionaram sintomas de Podridão Amarga em frutos da cultivar Gala com fermento, os isolados 33, 34 (Fraiburgo, SC) e 36 (Palmas, PR) foram os que apresentaram maior número médio de lesões por fruto, com media de 66,7, 63,3 e 63,3, respectivamente (Tabela 5).

De forma geral, na cultivar Gala pode-se observar a separação de um grupo formado pelos isolados 2 (Caçador, SC), 31, 32, 33 e 34 (Fraiburgo, SC), 36 (Palmas, PR) e 40 (São Joaquim, SC), e outro formado pelos demais isolados testados (Tabela 5).

Na análise do número de lesões de PA provocadas pela inoculação realizada em frutos da cultivar Fuji, com e sem fermento, observou-se que o isolado que mais se destacou dos demais em relação ao número de lesões foi o isolado 36 (Palmas, PR). Os isolados 7 e 8 (Frei Rogério, SC), 21 (Campo Tenente, PR), 22, 24, 25, 26 e 27 (Palmeira, PR) foram os que ocasionaram o menor número de lesões por fruto. O número de lesões em frutos de Fuji com fermento variou de 0,0 a 2,0 (Tabela 5).

Os mesmos isolados que provocaram sintomas de MG em frutos da cultivar Gala não ocasionaram sintomas em frutos sem fermento da cultivar Fuji. Em frutos com fermento estes causaram podridões, entretanto essas podridões diferem dos sintomas Podridão Amarga observados na cultivar Gala.

De forma geral, todos os isolados testados nos frutos reproduziram os sintomas de lesões de Mancha da Gala quando inoculados artificialmente, os mesmos observados no

material ao qual foi realizado o isolamento monospórico, ou seja, do material proveniente do campo com lesões de MG.

Os isolados 31, 32, 33 e 34 obtidos a partir de lesões de mancha necrótica (MN) de pecíolos, folhas e frutos verdes oriundos do campo, quando inoculados artificialmente em frutos maduros, de ambas as cultivares, produziram lesões típicas de PA, com abundante esporulação sobre as lesões.

Tabela 5. Percentagem de incidência e número médio de lesões observadas de isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em frutos de macieira, cultivares Gala e Fuji.

Isolado	Procedência (município/ Estado)	% de incidência <sup>1</sup>				Número médio de lesões			
		Gala		Fuji		Gala		Fuji	
		Com ferimento	Sem ferimento	Com ferimento	Sem ferimento	Com ferimento	Sem ferimento	Com ferimento	Sem ferimento
Test		0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00	0,00	0,00	0,00
1#	Caçador/ SC	100,00 b	0,00 a	100,00 b	66,66 ab	34,33	0,33	2,00	0,00
2#	Caçador/ SC	100,00 b	0,00 a	100,00 b	66,66 ab	56,66	0,00	2,00	0,00
3	Caçador/ SC	33,33 a	0,00 a	33,33 a	0,00 a	2,33	0,00	0,67	0,00
4	Vacaria/ RS	33,33 a	33,33 a	66,66 ab	0,00 a	3,33	2,00	1,34	0,00
5	Vacaria/ RS	0,00 a	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	0,00	9,67	1,36	0,00
6	Frei Rogério/ SC	100,00 b	100,00 b	33,33 a	0,00 a	7,33	5,33	0,67	0,00
7	Frei Rogério/ SC	33,33 a	0,00 a	33,33 a	0,00 a	0,66	0,00	0,34	0,00
8	Frei Rogério/ SC	0,00 a	0,00 a	33,33 a	0,00 a	0,66	0,00	0,00	0,00
9	Frei Rogério/ SC	66,66 ab	0,00 a	0,00 a	0,00 a	7,00	0,00	0,67	0,00
10	Curitiba/ SC	33,33 a	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	2,00	8,00	0,67	0,00
11	São Joaquim/ SC	0,00 a	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	0,00	10,0	0,67	0,00
12	São Joaquim/ SC	33,33 a	0,00 a	66,66 ab	0,00 a	0,66	0,00	0,67	0,00
13	São Joaquim/ SC	0,00 a	66,66 ab	66,66 ab	0,00 a	0,00	1,00	0,67	0,00
14	Palmas/ PR	33,33 a	100,00 b	33,33 a	0,00 a	0,66	3,00	0,34	0,00
15	Fraiburgo/ SC	100,00 b	0,00 a	66,66 ab	0,00 a	18,00	0,00	0,67	0,00
16	Fraiburgo/ SC	100,00 b	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	23,33	5,33	0,67	0,00
17	Campo Tenente/ PR	33,33 a	66,66 ab	66,66 ab	0,00 a	3,33	6,67	0,67	0,00
18	Campo Tenente/ PR	66,66 ab	66,66 ab	66,66 ab	0,00 a	2,00	1,67	0,67	0,00
19	Campo Tenente/ PR	0,00 a	66,66 ab	66,66 ab	0,00 a	0,33	1,33	0,67	0,00
20	Campo Tenente/ PR	66,66 ab	66,66 ab	66,66 ab	0,00 a	3,33	2,00	0,67	0,00
21	Campo Tenente/ PR	33,33 a	0,00 a	66,66 ab	0,00 a	1,00	0,00	0,67	0,00
22	Palmeira/ PR	33,33 a	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	0,66	9,67	0,67	0,00
24	Palmeira/ PR	33,33 a	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	0,66	3,33	0,67	0,00
25	Palmeira/ PR	33,33 a	66,66 ab	66,66 ab	0,00 a	0,66	2,67	0,67	0,00
26	Palmeira/ PR	100,00 b	66,66 ab	66,66 ab	0,00 a	8,66	1,33	0,67	0,00
27	Palmeira/ PR	100,00 b	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	23,3	4,33	0,67	0,00

*continua*

*Continuação da tabela 5*

28	Palmeira/ PR	66,66 ab	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	6,00	10,33	0,67	0,00
29	Palmeira/ PR	66,66 ab	0,00 a	66,66 ab	0,00 a	2,33	0,00	0,67	0,00
30	Palmeira/ PR	100,00 b	100,00 b	66,66 ab	0,00 a	4,00	7,67	0,67	0,00
31#	Fraiburgo	100,00 b	100,00 b	100,00 b	66,66 ab	61,66	0,00	2,00	0,33
32#	Fraiburgo	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	56,66	0,66	2,00	0,00
33#	Fraiburgo	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	66,66	4,00	2,00	0,33
34#	Fraiburgo	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	63,33	4,00	2,00	1,33
35#	Palmas/ PR	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	46,66	0,00	2,00	1,33
36#	Palmas/ PR	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	63,33	1,66	2,00	2,00
37#	Palmas/ PR	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	34,66	0,00	2,00	0,00
38#	São Joaquim/ SC	100,00 b	66,66 ab	100,00 b	66,66 ab	3,66	0,00	2,00	0,67
39#	São Joaquim/ SC	100,00 b	66,66 ab	100,00 b	66,66 ab	13,66	0,00	2,00	0,34
40#	São Joaquim/ SC	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	60,00	0,00	2,00	1,00

<sup>1</sup> Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de separação de médias SNK. Letras maiúsculas indicam a relação entre os isolados dentro de cada tratamento, letras minúsculas indicam a relação existente entre os tratamentos.

# - isolados causadores de sintomas de Podridão Amarga

## DISCUSSÃO

Com 48 horas de período de molhamento foliar (PMF) sob umidade relativa de 100% foram observados os primeiros sintomas de MG nas folhas da cv. Gala, ou seja, este tempo foi suficiente para que ocorresse a germinação dos conídios e a penetração do patógeno no tecido foliar. Resultado similar ao encontrado por DANTAS (2002), em inoculação do isolado 197SJ de *C. Gloeosporioides*, em tecido foliar da cultivar Gala.

Entretanto, a observação de sintomas para análise nos frutos foram necessários PMF de 144 horas em câmara úmida e posteriormente mais 72 horas em sala de crescimento, levando então, mais tempo que as folhas para que se observem os primeiros sintomas.

O processo de infecção das espécies de *Colletotrichum* envolve uma seqüência comum de eventos composta por adesão do conídio, germinação, alongação do tubo germinativo, formação do apressório, desenvolvimento do *peg* de infecção, penetração de células epidérmicas, crescimento de hifas intracelularmente, necrose celular e desenvolvimento de lesões (JEFFRIES et al., 1990).

Comparando o patossistema *Colletotrichum* x *Malus domestica* com outros patossistemas tais como *Coffea arabica* x *C. gloeosporioides* (CHEN, 2002), *Pinus radiata* x *C. acutatum* f. sp. *Pinea* (NAIR et al., 1981), *Carica papaya* x *C. gloeosporioides* (CHAU et al., 1983), os processos que ocorrem após a germinação até o aparecimento dos sintomas, ou seja, a presença de maior severidade e número médio de lesões, apresentam variação de tempo, sendo considerados bastante específicos, dependendo do genótipo da planta e do hospedeiro testado.

Com as inoculações realizadas em folhas e frutos nas cvs Gala e Fuji, foi possível observar sintomas típicos de MG nos frutos, de ambas as cultivares (com exceção de alguns casos) e, em folhas da cv Gala, sendo que todos esses isolados eram *C. gloeosporioides*. Os isolados de *C. acutatum* (1, 2, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40) ocasionaram lesões típicas de Podridão Amarga, nos frutos em ambas as cultivares, entretanto, não causaram sintomas de Podridão Amarga, quando inoculados em folhas de ambas as cultivares testadas.

Os isolados oriundos de lesões necróticas observadas na cultivar Gala, os quais foram classificados como *C. acutatum* causaram sintomas típicos de Podridão Amarga em

frutos maduros da cultivar Gala, entretanto em folhas da cultivar Gala ocasionaram numerosas lesões necróticas de pequeno tamanho que não evoluíram em tamanho até o final do experimento, 5 dias após a inoculação. Estas lesões necróticas foram semelhantes às anteriormente descritas por KATSURAYAMA & BONETI (2001).

O fato de apenas isolados de *C. gloeosporioides* terem sido patogênicos em folhas da cultivar Gala causando sintomas típicos de MG, corrobora com os trabalhos realizados por CRUSIUS (2000) e CARVALHO et al. (2000), também em macieira nas mesmas cultivares.

Embora todos os isolados provenientes de lesões de MG tenham sido classificados como *C. gloeosporioides* e terem reproduzido os sintomas de MG em folhas da cultivar Gala, alguns deles não provocaram lesões em frutos, a exemplo dos isolados 9 (Frei Rogério, SC); 12 (São Joaquim, SC), 15 (Fraiburgo, SC) e 29 (Palmeira, PR).

Isto pode ter ocorrido devido à presença de ceras na superfície dos frutos maduros, pois quanto mais avançado o estágio de maturação do fruto, maior a quantidade de ceras formadas, pois os ensaios foram realizados com frutos de aproximadamente 30 dias após a colheita. Esta presença de ceras pode impedir o processo de penetração do fungo pois impede o depósito de um filme de água, o que desfavorece a germinação de esporos de fungos (SKIPP et al., 1995, BALARDIN, 2006).

Nestes isolados, que não foram capazes de infectar os frutos, pode ter ocorrido ainda à deficiência na produção de enzimas específicas como a cutinase, as quais atuam nas etapas de pré-penetração dos fungos (PERFECT, 1999). A cutina é um polímero insolúvel presente na cutícula, que é constituída por uma camada lipídica que recobre a superfície dos tecidos vegetais (BALARDIN, 2006). Trabalhos desenvolvidos com mutantes de *Colletotricum* incapazes de produzir cutinase, no patossistema *Colletotrichum* x *Carica papaya*, mostraram que estes foram incapazes de causar infecções em frutos sem ferimento, por não conseguirem penetrar no tecido dos frutos inoculados (DICKMAN et al., 1986). Entretanto, a diferença na patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* em frutos maduros e imaturos não havia sido constatada até 1982 (SUTTON et al., 1983).

Isolados de *C. acutatum* são conhecidos por ocasionarem lesões típicas de Podridão Amarga (PA), em frutos de macieira, ou seja, lesões concêntricas apresentando massa de conídios de coloração salmão distribuída ao longo da lesão (CARVALHO et al., 2000;

CRUSIUS, 2000). Em ensaios de inoculação artificial em frutos de macieira, DENARDI et al. (2003), observaram sintomas de PA com resultados satisfatórios após 10 dias de incubação à temperatura de 25°C e umidade relativa de aproximadamente 100%.

Apesar de terem sido observados sintomas de PA nos frutos, não foi observado esse tipo de sintoma em tecido foliar; provavelmente pelo fato de o período de molhamento foliar (PMF) de 48 horas não tenha sido suficiente para o processo de infecção, visto que para que ocorra o desenvolvimento de podridões em folhas são necessárias condições extremamente favoráveis, de elevada umidade e temperatura (BONETI et al., 1999). No campo o patógeno se desenvolve entre 10 e 35°C, com temperatura diária para o desenvolvimento da doença de 20°C, umidade relativa acima de 90% e precipitação acima de 40 mm (BLEICHER et al., 2002). Resultado semelhante foi observado por CARVALHO (1997) que observou que isolados de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum* patogênicos em frutos não causaram sintomas em folhas da cv Gala.

Alguns dos isolados de *C. acutatum* (31, 32, 33 e 34, oriundos de Fraiburgo, SC) formaram pequenas pontuações necróticas, semelhante às observadas no material coletado a campo e utilizado no isolamento monospórico. Estas lesões necróticas, reproduzidas em inoculação artificial, tanto em folhas quanto em frutos verdes diferem dos sintomas, até então conhecidos, causados por espécies do gênero *Colletotrichum* em maçã. A confirmação dos sintomas através do postulado de Koch comprova que esses isolados foram capazes de causar sintomas até então desconhecidos na cultura. Entretanto, quando inoculados em frutos maduros de ambas as cultivares testadas, os isolados ocasionaram lesões de Podridão Amarga.

KATSURAYAMA & BONETI (2001) observaram que isolados oriundos de lesões necróticas quando inoculados em frutos verdes de macieira, cv Gala, reproduzem os mesmos sintomas observados a campo.

Esta diferença de sintomas de acordo com o estágio de desenvolvimento dos frutos, onde em frutos verdes desenvolvem-se lesões necróticas e em frutos maduros desenvolvem-se sintomas típicos de Podridão Amarga, fornece indícios de que existe resistência ontogênica, ou seja, de acordo com o estágio de desenvolvimento dos frutos ocorre a maior ou menor resistência ao patógeno. Em estudos sobre a ocorrência de Podridão Amarga em macieira, realizados anteriormente por SITTERLY et al. (1960)

observaram que a ocorrência de PA apresentou uma correlação positiva em relação ao estágio de maturação destes, inferindo que a maior suscetibilidade observada em frutos maduros deve-se à maior quantidade de açúcares presentes nos tecidos destes, tornando o metabolismo interno dos frutos maduros diferente do metabolismo dos frutos verdes.

No patossistema *Colletotrichum X Coffea arabica*, não foi observado esta diferença nos sintomas relacionada com o estágio de desenvolvimento dos frutos (PEREIRA, 2005), mostrando que cada patossistema possui uma particularidade e que o desenvolvimento ou não da doença é totalmente dependente do genótipo da interação entre o patógeno e seu hospedeiro.

No presente trabalho, os isolados classificados como *C. acutatum* relacionados com a Podridão Amarga em frutos maduros de macieira, foram incapazes de causar sintomas quando inoculados em folhas, diferentemente ao relatado por BONETI et al. (1999) os quais observaram a presença de PA nos pomares de macieira causando podridão em folhas em anos com condições climáticas favoráveis, principalmente no verão.

Nenhum dos isolados inoculados provocou sintomas em folhas da cv Fuji, comprovando a resistência desta cultivar à doença. De acordo com KATSURAYAMA et al. (2002), inicialmente a resistência à Mancha da Gala era controlada por um único gene homocigoto recessivo, ou seja, é do tipo qualitativa. Entretanto, em trabalhos posteriores realizados por DANTAS et al. (2005), dos quais realizaram inoculações de *C. gloeosporoides* em diversos cruzamentos entre cultivares resistentes e suscetíveis, dentre os quais engloba as cultivares Gala e Fuji, inferiram a presença de três genes que segregam de forma independente, sendo um gene dominante e nos dois outros por genes recessivos que atuam de forma complementar.

A quebra de resistência não observada na cultivar Fuji quando em inoculação de uma população dos 39 isolados de *Colletotrichum*, comprova que ocorre uma relação de incompatibilidade entre patógeno e hospedeiro. Esta relação decorre da presença no patógeno de um gene chamado de gene de avirulência (AVR) se sua expressão determina a produção de sinais que provocam uma resposta na planta com o gene específico de resistência (KEEN, 1990). No entanto, a expressão do gene de avirulência não impede o patógeno de ser virulento para hospedeiros que não tenham o correspondente gene de resistência, como no caso observado para a cultivar Gala. FLOR (1956) demonstrou a

complementaridade dos sistemas gênicos do hospedeiro e do patógeno. Após investigar exaustivamente as interações entre vários genótipos de linho e do fungo *Melampsora lini*, ele propôs o modelo de relação gene-a-gene. Segundo ele, a incompatibilidade acontece quando uma planta possui um gene dominante de resistência que corresponde a um gene de avirulência em um determinado patógeno. Uma única planta pode ter muitos genes de resistência, assim como o patógeno também pode ter vários genes de avirulência. A resposta de defesa, que evita a infecção, se dá a partir do momento em que a planta “reconhece” um particular produto do patógeno controlado pelo gene de avirulência.

Conforme LINDSAY et al. (1993), estes produtos do gene de avirulência implicados na percepção do ataque pela planta abrangem um grupo de moléculas coletivamente chamadas elicitor. Após detectarem a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque através da indução de proteínas de defesa. Estas proteínas inibem o desenvolvimento do patógeno através da digestão das paredes celulares do fungo, da fortificação das paredes celulares da planta, e/ou da biossíntese de compostos antimicrobianos, as fitoalexinas (CHASAN, 1994).

## CONCLUSÃO

- Através das inoculações em folhas e frutos de macieira nas cultivares Gala e Fuji, foi possível dividir os isolados em três distintos tipos de sintomas, ou seja, isolados causadores de Mancha da Gala, de Podridão Amarga e de manchas necróticas.
- Os isolados 31, 32, 33 e 34, provenientes de Fraiburgo, SC, classificados como *C. acutatum*, diferem no tipo de sintoma produzido, ocasionando lesões necróticas em folhas da cultivar Gala e lesões de Podridão Amarga em frutos maduros de macieira.
- Nenhum dos isolados testados provocou lesões de MG em folhas e frutos de macieira da cultivar Fuji, caracterizando esta cultivar como altamente resistente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALARDIN, R. Fundamentos da resistência em plantas. In: [http://www.balardin.com.br/adm/arquivos/5\\_fundderesistencia.pdf](http://www.balardin.com.br/adm/arquivos/5_fundderesistencia.pdf) Acesso em 17/ 01/ 2006.

BIGGS, A.R.; MILLER, S.S. Relative susceptibility of selected apple cultivars to *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease** 85 (6): 657-660. 2001.

BLEICHER, J.; BERTON, O.; BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y. Doenças fúngicas dos frutos. In.: **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.

BONETI, J.I. and KATSURAYAMA, Y. Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork) In: Boneti, J.I.; Ribeiro, L.G.; Katsurayama, Y. (eds) **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis, Epagri, 1999. 149 p.

BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira** São Paulo: BASF, 1998.

CARVALHO, F.M.S.; LEITE Jr., R.P; UENO, B. Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 25 (1): 72-78. 2000.

CHAU, K.F.; ALVAREZ, A.M. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. **Phytopathology** 73(8): 1113-1116. 1983.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. 2002. 163p.

CRUSIUS, L.U. **Epidemiologia da Mancha Foliar da Macieira**. Passo Fundo, UPF, 2000. Tese de Mestrado. 58p.

DANTAS, A.C.M.; VIEIRA, E.A.; NODARI, R.O.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. Classificação e estudo da herança da resistência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causador da Mancha da Gala em macieira. In.: **51º Congresso Brasileiro de Genética – Resumos**. 2005. pg 693.

DANTAS, A.C.M. **Aplicação de técnicas de cultivo in vitro, de marcadores moleculares e bioquímicos no melhoramento genético da macieira (*Malus* spp.)**. Pelotas, UFPEL, 2002. Tese de doutorado. 183 p.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M.M. Resistência genética à Podridão Amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos. **Revista Brasileira de Fruticultura** 25 (3): 494-497. 2003.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. **Physiological Molecular Plant Pathology** 28: 235-242. 1986.

FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rusts. **Advance Genetic**, New York, v. 8, p 29-54. 1956.

FREEMAN, S.; KATAN, T. and SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **Plant Disease** 82:596-605. 1998.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & BECKER, W.F.; OZAWA, T. & TSUCHIYA, S. Epidemiologia das Doenças da Macieira no Subtrópico e Perspectivas de Manejo Integrado: Caso da Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.). In: **SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental**, 1., 2001. Florianópolis, SC. Anais... Florianópolis, Epagri, 2001. 161p.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. Efeito da temperatura na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp in **Relatório Técnico ABPM – Projetos de Pesquisas 2001-2002**. Fraiburgo: ABPM, 2002.

KEEN, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 24, p 447-463, 1990.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum* in **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, volume 9: 291-339, 2001. Passo Fundo.

NAIR, J.; CORBIN, J.B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pineae*. **Phytopathology** 71(8): 777-783. 1981.

PEREIRA, I.S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella* – *Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. Lavras, UFLA, 2005. Tese de mestrado. 92p.

PERFECT, S.E.; HUGHES, B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology** 27: 186-198. 1999.

SITTERLY, W.R.; SHAY, J.R. Physiological factors affecting the onset of susceptibility of apple fruit to rotting by fungus pathogens. **Phytopathology** 50: 91-93. 1960.

SKIPP, R.A.; BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, E.H.A. & TEMPLETON, M.D. *Colletotrichum*. In: **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Pergamon/Elsevier Sci. Ltd. Public.: Oxford, vol.II: 119-142, 1995.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3ª ed. New York: WH Freeman, 1995. 881p.

SUTTON, T.B.; SHANE, W.W. Epidemiology of the perfect stage of *Glomerella cingulata* on apples. **Phytopathology** 73: 1179-1183. 1983.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. **Características e controle de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999). 16p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular técnica, 25).

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.; BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y; CZERMAINSKI, A.B.C. **Manejo das Doenças de Verão na Produção Integrada de Maçã**. Circular técnica EMBRAPA n° 36. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2002.

## CAPÍTULO III

---

### GERAÇÃO DE HETEROCARIONTES DE *Colletotrichum* spp.

#### INTRODUÇÃO

O conceito de que a recombinação genética em fungos é restrita somente ao ciclo sexual com o envolvimento de processos meióticos foi derrubado por PONTECORVO et al. (1953). A formação de heterocariontes entre diferentes indivíduos é um importante fator no ciclo de vida de muitos fungos e pode servir como primeiro passo para o ciclo parassexual (LESLIE, 1993). A diversidade genética de fungos, principalmente naqueles de reprodução assexuada, pode ser aumentada através de anastomose, heterocariose e recombinação mitótica, sendo que processos parassexuais têm sido considerados como mecanismos responsáveis pela diversidade genética em fungos conidiais (CATEN, 1981). O modo de reprodução de muitas populações de *Colletotrichum* é exclusivamente vegetativo; dessa forma, a troca de material genético entre dois indivíduos só ocorre pela anastomose e heterocariose (PEREIRA, 2005).

Pode-se definir heterocariose como sendo a coexistência de núcleos do mesmo ou de diferentes genótipos, mas com constituição genética diferenciada, no mesmo micélio e na mesma célula da hifa de um fungo, sendo que esta pode originar-se da germinação de um esporo heterocariótico originando um talo heterocariótico, ou da introdução de núcleos geneticamente diferentes em um micélio homocariótico onde todos os núcleos são similares, ou ainda da fusão de alguns núcleos em um indivíduo homocariótico haplóide e a subsequente sobrevivência, multiplicação e disseminação dos núcleos diplóides entre os haplóides (BALARDIN, 2006).

Em razão da importância que os trabalhos sobre a formação de heterocariontes possuem em relação aos estudos sobre diversidade genética de fungos, esse capítulo objetivou a obtenção de heterocariontes e posterior caracterização morfológica, cultural e patogênica destes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Obtenção de mutantes não utilizadores de nitrato (mutantes *nit*)

Discos de micélio de 6 mm da região mais externa do crescimento de cada uma das colônias dos 39 isolados foram depositados em placas de petri descartáveis (9 mm de diâmetro) contendo meio autoclavado de gel de extrato de malte (MEA) a 3,5% e clorato de potássio (KClO<sub>3</sub>) em quatro diferentes concentrações (1,5; 3,0; 4,5 e 6,0%). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições para cada isolado, sendo colocados 4 discos de isolados diferentes na mesma placa, devidamente identificados, o que totalizou 40 placas para cada concentração.

Os isolados foram mantidos no escuro, em estufa regulada a 24°C. As avaliações foram realizadas aos 3, 6 e 9 dias, avaliando-se o número de colônias em crescimento, das quais foi realizado uma curva de padrão de resposta baseada na médias dentro de cada período para cada isolado.

A partir dos dados obtidos sobre o número de colônias que cresceram em meio contendo KClO<sub>3</sub>, 9 dias após a repicagem, para as quatro concentrações testadas, fez-se uma tabela de contingência para inferir se o local de procedência dos isolados exerce influência sobre número de colônias observadas na presença de KClO<sub>3</sub>. Os dados foram submetidos a uma tabela de contingência e posterior teste de  $\chi^2$  com nível de significância de 5% (BEIGUELMAN, 1991).

### 2. Formação dos heterocariontes

Para a formação de heterocariontes as colônias que apresentaram crescimento após 9 dias de incubação no meio MEA, suplementado com as diferentes concentrações de KClO<sub>3</sub> foram repicadas para placas de petri contendo meio mínimo (MM), contendo 2g de NaNO<sub>3</sub>/L de meio básico (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (30g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1g), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5g), KCl (0,5g), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (10mg), agar (20g), solução de elementos mínimos (0,2 mL). A solução de elementos mínimos é composta por ácido cítrico (5g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (5g), Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O (1g), CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O (0,25g), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (50 mg), H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (50 mg), NaMoO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O (50 mg)/ 95 mL de água destilada). Os meios foram autoclavados e as placas incubadas em

B.O.D. a 24°C, no escuro. Neste meio MM foram realizadas 96 combinações (Tabela 1), com 3 repetições por pareamento. Foram realizadas avaliações do crescimento aéreo das colônias semanalmente, sendo que as colônias que apresentaram crescimento normal, ou seja, semelhante ao observado em meio BDA, foram descartadas. Pois os mutantes *nit* apresentam neste meio crescimento ralo com pouco ou nenhum micélio aéreo (REIS, 1998).

As colônias de crescimento ralo foram mantidas por 8 semanas, para que se observasse a formação ou não de heterocariontes entre os isolados, ou seja, a existência ou não de micélio aéreo normal na zona de contato entre as duas colônias (Figura 2).

Como parâmetro de avaliação para o crescimento aéreo foi utilizada tabela proposta por REIS (1998), o qual é considerado um pareamento forte (+) para a complementação, quando a zona de micélio aéreo se desenvolveu na área de contato entre os isolados depois de quatro semanas. Foi considerado pareamento fraco ( $\pm$ ) quando a zona de complementação foi fina passadas seis semanas ou se a complementação foi evidente somente depois de sete semanas. Combinações sem complementação visível após sete semanas foram consideradas negativas (-).

Tabela 1. Pareamentos realizados entre os isolados de *Colletotrichum* spp. em meio MM

1 x 1	1 x 2	1 x 3	1 x 4	2 x 2
2 x 3	2 x 4	3 x 3	3 x 4	4 x 4
5 x 5	5 x 6	5 x 7	5 x 8	6 x 6
6 x 7	6 x 8	7 x 7	7 x 8	8 x 8
9 x 9	9 x 10	9 x 11	9 x 12	10 x 10
10 x 11	10 x 12	11 x 11	11 x 12	12 x 12
13 x 13	13 x 14	13 x 15	13 x 16	14 x 14
14 x 15	14 x 16	15 x 15	15 x 16	16 x 16
17 x 17	17 x 18	17 x 19	17 x 20	18 x 18
18 x 19	18 x 20	19 x 19	19 x 20	20 x 20
21 x 21	21 x 22	21 x 24	21 x 25	22 x 22
22 x 24	22 x 25	24 x 24	24 x 25	25 x 25
26 x 26	26 x 27	26 x 28	26 x 29	27 x 27
27 x 28	27 x 29	28 x 28	28 x 29	29 x 29
30 x 30	30 x 31	30 x 32	30 x 33	31 x 31
31 x 32	31 x 33	32 x 32	32 x 33	33 x 33
34 x 34	34 x 35	34 x 36	34 x 37	35 x 35
35 x 36	35 x 37	36 x 36	36 x 37	37 x 37
38 x 38	38 x 39	39 x 40	39 x 39	39 x 40
40 x 40				

#### **4. Avaliação das características morfológicas**

Os heterocariontes, juntamente com seus isolados de origem, foram avaliados de acordo com as características de suas colônias em meio de cultura (BDA), sendo que as características avaliadas foram: a taxa de crescimento, sensibilidade ao fungicida benomyl, comprimento (CC), largura (LC) e formato dos conídios, coloração observada em cima e abaixo da placa de petri e formação de setores.

##### **4.1. Determinação do diâmetro das colônias e da taxa de crescimento dos heterocariontes**

Discos de micélio (6 mm) de cada um dos heterocariontes gerados e de seus isolados de origem foram inoculados no centro de placas de petri contendo 10 mL de BDA (39 g/L) e mantidos em estufa regulada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro até 6 dias. Foi realizada avaliação do diâmetro das colônias e taxa de crescimento para cada heterocarionte a partir dos dados da medição diária, com 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após inoculação dos heterocariontes. A taxa de crescimento diária foi calculada através da fórmula  $TC = (D_n - 6) / n$ , onde  $D_n$  = diâmetro da colônia n dias após a repicagem e n = número de dias de incubação (TEIXEIRA et al., 2001).

##### **4.2. Sensibilidade dos isolados ao fungicida benomyl**

Discos de micélio (6 mm) foram inoculados no centro de placas de petri contendo 10 mL de BDA suplementadas com três concentrações de benomyl (0, 5 e  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). As amostras foram incubadas em estufa regulada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro.

Diariamente, durante 6 dias, foi medido o diâmetro das colônias (mm) e a partir destes dados foi calculada a curva e a taxa de crescimento de cada um dos isolados trabalhados. Para a construção da curva de crescimento foram utilizados os dados da medição diária das colônias, e considerado o diâmetro de cada um destes ao sexto dia após a repicagem. A taxa de crescimento (TC) foi calculada através da fórmula apresentada anteriormente no item 4.1.

Os isolados foram classificados como resistentes e sensíveis de acordo com a sua sensibilidade ao benomyl. Foram considerados resistentes aqueles que cresceram em

ambas as concentrações testadas, em semelhança ao observado em meio BDA. Os isolados considerados sensíveis foram aqueles que não apresentaram crescimento em presença do fungicida, independente da concentração deste.

### **4.3. Avaliação das características dos conídios**

As características avaliadas nos conídios foram comprimento (CC), largura (LC) e formato. Para isso, foram utilizadas culturas monospóricas crescidas em meio BDA durante 15 dias a  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , no escuro. A suspensão conidial foi obtida através de raspagem superficial das placas com água destilada e filtragem em gaze esterilizada. Para cada isolado foi montada uma lâmina semi-permanente, fixada com uma gota de preparado de Shear (300 ml de acetato de potássio 2%; 120 ml de glicerina e 180 ml de etanol 95%) e fechada com esmalte. As avaliações do comprimento e largura dos conídios foram realizadas em microscópio ótico (marca Nikon, modelo Labophot), em objetiva de 40X. Foi montada uma lâmina por isolado, e para cada lâmina montada foram avaliados 25 conídios. Além do comprimento (CC) e largura dos conídios (LC), determinou-se também a relação CC/LC.

### **5. Avaliação das características culturais das colônias**

Foram avaliadas a coloração e forma das colônias e a formação de setores em meio BDA. Os isolados foram repicados nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se discos de micélio (6 mm) que foram depositados em placas contendo meio BDA, as quais foram mantidas no escuro em estufa regulada a  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 7 dias.

Foram feitas três repetições por isolado e as avaliações foram realizadas diariamente. Estas mesmas amostras foram mantidas por mais 30 dias para que se observasse a formação ou não de peritécios. Os peritécios foram coletados com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e esmagados em lâmina semi-permanente fixada com uma gota de preparado de Shear e observadas em microscópio ótico.

## **6. Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental utilizado em todos os ensaios foi o inteiramente casualizado. Para os ensaios de determinação do diâmetro de colônias e da taxa de crescimento dos heterocariontes e de sensibilidade destes ao fungicida benomyl foram feitas três repetições para cada heterocarionte, bem como para seus isolados de origem.

No ensaio de caracterização dos conídios, ou seja do comprimento (CC) e largura dos conídios (LC), determinou-se também a relação CC/LC, cada conídio analisado representou uma repetição, totalizando 25 repetições por heterocarionte avaliado.

Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e posterior teste de separação de médias (SNK,  $\alpha=0,05$ ) (SOKAL et al.,1995).

## **7. Determinação da patogenicidade dos heterocariontes**

Foi realizado teste de patogenicidade em folhas das cultivares Fuji e Gala, obtidas de ramos de aproximadamente 20 cm, colhidas no início do período vegetativo. Imediatamente a colheita, os ramos foram acondicionados em becker com água destilada e foi realizada a inoculação de todos os heterocariontes obtidos.

Após a inoculação os ramos foram mantidos no escuro em câmara úmida em temperatura a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com 100% de umidade relativa, durante 44 horas. Depois de passado este período, os ramos foram transferidos para sala de crescimento regulada a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram durante 48 horas, tempo necessário para a manifestação dos sintomas.

Foi realizada, então, a avaliação da percentagem de incidência e da severidade dos sintomas nos ramos inoculados. Para a avaliação da severidade foi utilizada escala de notas exponencial proposta por KATSURAYAMA (comunicação pessoal), onde 0: sem presença de sintomas; 1: presença de 1 a 2 lesões; 2: de 3 a 5 lesões; 3: de 6 a 11 lesões; 4: de 12 a 24 lesões; 5: de 25 a 49 lesões; 6: de 50 a 74 lesões; 7: mais de 75 lesões.

Foram avaliadas as cinco primeiras folhas a partir do ápice de cada ramo inoculado, sendo inoculados quatro ramos de cada cultivar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que cada ramo representou uma repetição. Os índices de

severidade foram submetidos à análise de variância e posterior teste de separação de médias (SNK,  $\alpha=0,05$ ).

## RESULTADOS

### 1. Obtenção de mutantes não utilizadores de nitrato (mutantes *nit*)

Após 9 dias em que os isolados estavam em meio extrato de malte +  $\text{KClO}_3$ , foi avaliado o número de colônias que haviam crescido em cada uma das concentrações testadas. O número de colônias que cresceram nas diferentes concentrações de  $\text{KClO}_3$  foi muito variável entre os isolados, de acordo com os locais de procedência destes, sendo que se observou que quanto maior a concentração de  $\text{KClO}_3$  presente no meio, menor o número de colônias que cresceram (Figura 1). Nesta etapa do trabalho foram consideradas apenas as colônias que apresentaram crescimento micelial, isto devido ao fato de que o crescimento dos isolados do tipo selvagem está restringido em meio contendo clorato, provavelmente devido ao fato de este ser um análogo do nitrato (CORRELL et al., 1987). Deste modo, ele é reduzido pela enzima nitrato redutase transformando-se em clorito, o qual é altamente tóxico. Uma vez que os mutantes *nit* não conseguem utilizar clorato, se desenvolvem bem em meios contendo este nutriente. A maioria dos mutantes *nit* possui lesões na via de assimilação do nitrato e são por isso incapazes de utilizar este elemento (KLITTICH & LESLIE, 1988)



Tabela 2. Tabela de contingência do local de origem dos isolados de Mancha Foliar e Podridão Amarga e das diferentes concentrações de  $KClO_3$ , para a variável número de colônias.

<b>Mancha Foliar</b>	<b>1,5%</b>	<b>3,0%</b>	<b>4,5%</b>	<b>6,0%</b>	<b>TOTAL</b>	<b>X<sup>2</sup></b>
Caçador/ SC	10 (8,49)	10 (8,02)	04 (6,25)	04 (5,22)	28	
Vacaria/ RS	06 (8,19)	07 (7,74)	07 (6,03)	07 (5,04)	27	
Frei Rogério/ SC	13 (11,52)	10 (10,89)	08 (8,48)	07 (7,09)	38	
Curitibanos/ SC	04 (3,94)	04 (3,72)	03 (2,90)	02 (2,42)	13	
São Joaquim/ SC	07 (4,85)	03 (4,58)	03 (3,57)	03 (2,98)	16	
Palmas/ PR	03 (3,94)	04 (3,72)	03 (2,90)	03 (2,42)	13	
Fraiburgo/ SC	07 (6,07)	04 (5,73)	06 (4,46)	03 (3,73)	20	
Campo Tenente/ PR	16 (16,68)	16 (15,76)	13 (12,28)	10 (10,26)	55	
Palmeira/ PR	25 (27,30)	28 (25,80)	20 (20,10)	17 (16,80)	90	
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>	<b>86</b>	<b>67</b>	<b>56</b>	<b>300</b>	<b>7,59</b>
<b>Podridão Amarga</b>						
Palmas/ PR	11 (8,28)	02 (3,89)	02 (1,94)	04 (4,87)	19	
São Joaquim/ SC	06 (8,71)	06 (4,10)	02 (2,05)	06 (5,12)	20	
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>39</b>	<b>3,84</b>

## 2. Geração dos Heterocariontes

De acordo com a classificação proposta por REIS (1998), todas as complementações observadas foram consideradas fortes (+) (Figura 2), pois se formaram 3 semanas após o pareamento dos isolados em MM, sendo que após este período não ocorreram mais complementações positivas (dados não mostrados).

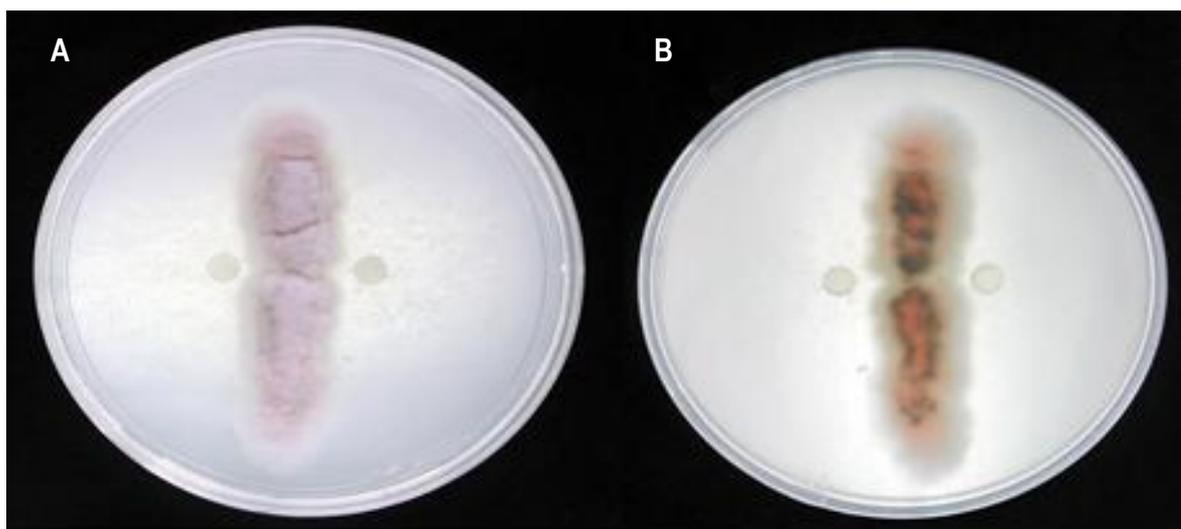


Figura 2. Pareamento dos isolados 32 e 33 em MM (3 semanas após a repicagem), inicialmente mantidos em meio extrato de malte +  $\text{KClO}_3$  (1,5%). Vistas verso (a) e reverso da placa (b).

Foram obtidos 15 heterocariontes, 9 destes (H1 até H9) foram formados em meio de cultura com 4,5%  $\text{KClO}_3$ , a partir dos pareamentos entre os isolados 26 x 27 e 27 x 28, todos procedentes de Palmeira, PR. Três heterocariontes (H10, H11 e H12), foram gerados em meio com 1,5% de  $\text{KClO}_3$ , dos pareamentos entre isolados 32 x 33, procedentes de Fraiburgo, SC, e em meio com concentração de 6% de  $\text{KClO}_3$  foram gerados 3 heterocariontes do pareamento entre os isolados 17 e 18, procedentes de Campo Tenente, PR (Tabela 3).

Para avaliações posteriores cada heterocarionte foi considerado um indivíduo diferente, pois mesmo que alguns foram originados de uma mesma combinação de isolados, estes foram oriundos de discos de micélio diferentes e estavam sujeitos a terem sofrido processos diferentes de mutação (Tabela 3).

Tabela 3. Denominação dos heterocariontes formados através de pareamento de discos de micélio de *Colletotrichum* spp. em meio mínimo, de acordo com os isolados dos quais tiveram origem.

Denominação	Isolados de origem	Procedência dos isolados de origem	Concentração KClO <sub>3</sub> (%)
H1	26 x 27	Palmeira x Palmeira	4,5
H2	26 x 27	Palmeira x Palmeira	4,5
H3	26 x 27	Palmeira x Palmeira	4,5
H4	27 x 28	Palmeira x Palmeira	4,5
H5	27 x 28	Palmeira x Palmeira	4,5
H6	27 x 28	Palmeira x Palmeira	4,5
H7	17 x 18	Campo Tenente x Campo Tenente	4,5
H8	17 x 18	Campo Tenente x Campo Tenente	4,5
H9	17 x 18	Campo Tenente x Campo Tenente	4,5
H10	32 x 33	Fraiburgo x Fraiburgo	1,5
H11	32 x 33	Fraiburgo x Fraiburgo	1,5
H12	32 x 33	Fraiburgo x Fraiburgo	1,5
H13	17 x 18	Campo Tenente x Campo Tenente	6,0
H14	17 x 18	Campo Tenente x Campo Tenente	6,0
H15	17 x 18	Campo Tenente x Campo Tenente	6,0

### 3. Avaliação das características culturais e morfológicas dos heterocariontes

#### 3.1. Determinação do diâmetro e da taxa de crescimento das colônias

Os heterocariontes formados em meio de cultura suplementado com KClO<sub>3</sub> (H1 até H9 e H13, H14 e H15) diferiram estatisticamente dos demais isolados (Tabela 4) apresentando as maiores médias para diâmetro de colônias, variando de 52,33 a 68,33 mm (Tabela 5). Os heterocariontes H10, H11 e H12, apresentaram as menores médias de diâmetro de colônias, de 41,33 a 42,67 mm. A taxa de crescimento dos isolados foi significativamente diferente entre eles ao nível de 5% de significância pelo teste F (Tabela 4), com médias variando de 0,39 a 0,41 para todos os heterocariontes formados (Tabela 5).

A análise de variância do diâmetro das colônias e da taxa de crescimento dos isolados mostrou diferenças significativas entre estes, sendo que nenhum dos heterocariontes diferiu estatisticamente dos isolados a partir dos quais foram gerados (Tabela 5).

Tabela 4. Análise da variação para o diâmetro médio das colônias e para a taxa de crescimento dos heterocariontes e seus isolados de origem, repicados em meio BDA, após 6 dias de incubação.

Causa da Variação	GL	Quadrado médio	
		Diâmetro das colônias	Taxa de crescimento
Isolados	21	270,8**	10,83**
Resíduo	44	2,7	0,10
CV%		2,90	2,90

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 5. Diâmetro das colônias e taxa de crescimento de heterocariontes de *Colletotrichum* spp. e de seus isolados de origem, em meio BDA.

Isolado	Isolados de origem	Diâmetro das colônias (mm) <sup>1</sup>	Taxa de crescimento <sup>1</sup>
H1	26 x 27	60,67 def	12,14 def
H2	26 x 27	60,67 def	12,14 def
H3	26 x 27	59,00 d	11,80 d
H4	27 x 28	61,00 def	12,20 def
H5	27 x 28	62,33 def	12,47 def
H6	27 x 28	60,67 def	12,14 def
H7	17 x 18	58,67 d	11,74 d
H8	17 x 18	62,00 def	12,40 def
H9	17 x 18	62,00 def	12,40 def
H10	32 x 33	42,67 c	8,54 c
H11	32 x 33	41,33 bc	8,27 bc
H12	32 x 33	42,67 c	8,54 c
H13	17 x 18	58,33 d	11,67 d
H14	17 x 18	59,00 d	11,80 d
H15	17 x 18	59,67 de	11,94 de
17	Campo Tenente/ PR	67,00 gh	13,40 gh
18	Campo Tenente/ PR	68,34 h	13,67 h
26	Palmeira/ PR	59,34 d	11,87 d
27	Palmeira/ PR	64,00 efg	12,80 efg
28	Palmeira/ PR	64,34 fg	12,87 fg
32	Fraiburgo/ SC	36,67 a	7,34 a
33	Fraiburgo/ SC	38,67 ab	7,74 ab

<sup>1</sup>- Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de separação de médias SNK.

Foram observadas tendências de crescimento diferentes entre os heterocariontes quando se analisou as curvas de crescimento construídas a partir da medição diária das colônias (Figura 3). Os heterocariontes H10, H11, H12 apresentaram crescimento destoante dos demais, apresentando menor crescimento micelial em relação aos outros heterocariontes, sendo que após 144 horas de incubação estes apresentaram diâmetro de colônia em média 30% menor do que os demais (Figura 3).

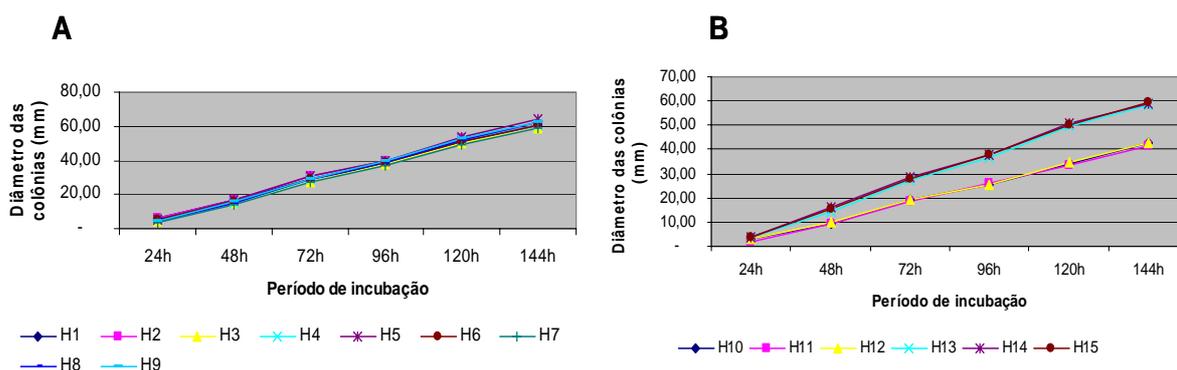


Figura 3. Diâmetro das colônias (mm) de 15 heterocariontes formados de *Colletotrichum* spp.

### 3.2. Sensibilidade dos isolados ao fungicida benomyl

A interação entre as doses de fungicida testadas foi significativa ao nível de probabilidade de 5% pelo teste F, quando se analisou os dados do diâmetro final das colônias (Tabela 6).

Tabela 6. Análise da variação para o diâmetro final das colônias de heterocariontes de *Colletotrichum* spp. e de seus isolados de origem após 6 dias de incubação.

Causas de Variação	GL	QM
Isolados	21	1539,30**
Concentrações	3	16752,00**
Interação	63	426,3**
Resíduo	110	1,2
CV%	3,19	

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Através do teste de separação de médias os heterocariontes foram discriminados em dois diferentes grupos de acordo com a sensibilidade destes à concentração do fungicida no meio de cultura. Os heterocariontes que não cresceram na presença do fungicida, diferindo estatisticamente entre os tratamentos que continham o fungicida, foram considerados sensíveis (Tabela 9). Os heterocariontes que se mostraram sensíveis foram H1, H2, H3, H4, H5, H6, H10, H11, H12, assim como seus isolados de origem (26, 27, 28, 32 e 33).

Os heterocariontes que apresentaram crescimento diferente estatisticamente no meio com fungicida ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em relação ao meio sem a presença de benomyl, foram considerados resistentes. Os heterocariontes considerados resistentes foram H7, H8, H9, H13, H14 e H15, bem como seus isolados de origem (17 e 18).

As taxas de crescimento dos heterocariontes e a interação destas entre as concentrações de fungicida testadas, foram significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 8) e o teste de separação de médias (SNK,  $\alpha=0,05$ ) mostrou diferenças estatísticas entre os heterocariontes e entre os tratamentos (Tabela 9). As maiores taxas de crescimento foram observadas nas colônias dos heterocariontes H9, H11 e H15, com médias variando de 0,43 a 0,47 na concentração de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e entre 0,45 e 0,47 na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Tabela 8. Análise da variação para a taxa de crescimento das colônias de heterocariontes de *Colletotrichum* spp. e seus isolados de origem após 6 dias de incubação.

<b>Causas de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Heterocariontes	21	0,096**
Doses	3	1,079**
Interação	63	0,02**
Resíduo	110	0,01
CV%	0,39	

\*\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tanto para a variável diâmetro final das colônias como para a variável taxa de crescimento, os heterocariontes H10, H11 e H12 mostraram-se diferentes estatisticamente

dos demais. Em relação aos heterocariontes formados e seus isolados de origem, os heterocariontes H7, H8 e H9 foram os únicos que diferiram estatisticamente dos que os deram origem (isolados 17 e 18) para ambas as variáveis, apresentando diâmetro final e taxa de crescimento menores do que estes.

Tabela 9. Sensibilidade ao benomyl, diâmetro das colônias e taxa de crescimento de heterocariontes de *Colletotrichum* spp., em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida (5 µg.mL<sup>-1</sup> e 100 µg.mL<sup>-1</sup>).

Isolado	Isolados de origem	Sensibilidade ao benomyl	Diâmetro das colônias (mm) <sup>1</sup>			Taxa de crescimento <sup>1</sup>		
			0 µg.mL <sup>-1</sup>	5 µg.mL <sup>-1</sup>	100 µg.mL <sup>-1</sup>	0 µg.mL <sup>-1</sup>	5 µg.mL <sup>-1</sup>	100 µg.mL <sup>-1</sup>
H1	26 x 27	Sensível	60,67 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa	0,39 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa
H2	26 x 27	Sensível	60,67 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa	0,39 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa
H3	26 x 27	Sensível	59,00 Cd	0,00 Ba	0,00 Aa	0,41 Cd	0,00 Ba	0,00 Aa
H4	27 x 28	Sensível	61,00 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa	0,40 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa
H5	27 x 28	Sensível	62,33 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa	0,41 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa
H6	27 x 28	Sensível	60,67 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa	0,41 Cdef	0,00 Ba	0,00 Aa
H7	17 x 18	Resistente	58,67 Cd	59,33 Be	47,67 Ad	0,43 Cd	0,42 Be	0,45 Ad
H8	17 x 18	Resistente	62,00 Cdef	59,33 Be	48,00 Ad	0,42 Cdef	0,42 Be	0,46 Ad
H9	17 x 18	Resistente	62,00 Cdef	58,67 Be	47,67 Ad	0,42 Cdef	0,43 Be	0,45 Ad
H10	32 x 33	Sensível	42,67 Cc	13,00 Bbc	17,33 Ac	0,42 Cc	0,40 Bbc	0,47 Ac
H11	32 x 33	Sensível	41,33 Cbc	12,67 Bbc	16,67 Ac	0,46 Cbc	0,47 Bbc	0,47 Ac
H12	32 x 33	Sensível	42,67 Cc	13,67 Bbc	17,00 Ac	0,42 Cc	0,42 Bbc	0,49 Ac
H13	17 x 18	Resistente	58,33 Cd	56,67 Bd	46,00 Ad	0,43 Cd	0,42 Bd	0,47 Ad
H14	17 x 18	Resistente	59,00 Cd	56,00 Bd	46,33 Ad	0,42 Cd	0,42 Bd	0,46 Ad
H15	17 x 18	Resistente	59,67 Cde	55,67 Bd	45,67 Ad	0,42 Cde	0,43 Bd	0,47 Ad
17	Campo Tenente, PR	Resistente	67,0 Cgh	68,7 Bf	53,7 Ac	0,28 Cgh	0,26 Bf	0,27 Ae
18	Campo Tenente, PR	Resistente	68,3 Ch	67,7 Bf	55,3 Ac	0,27 Ch	0,27 Bf	0,28 Ae
26	Palmeira, PR	Sensível	59,3 Cd	0,00 Ba	0,00 Aa	0,27 Cd	0,00 Ba	0,00 Aa
27	Palmeira, PR	Sensível	64,0 Cefg	0,00 Ba	0,00 Aa	0,27 Cdfg	0,00 Ba	0,00 Aa
28	Palmeira, PR	Sensível	64,3 Cfg	0,00 Ba	0,00 Aa	0,27 Cfg	0,00 Ba	0,00 Aa
32	Fraiburgo, SC	Sensível	36,7 Ca	12,7 Bbc	13,7 Ab	0,25 Ca	0,25 Bbc	0,26 Ab
33	Fraiburgo, SC	Sensível	38,7 Cab	14,7 Bc	14,0 Ab	0,27 Cab	0,28 Bc	0,27 Ab

<sup>1</sup> - Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem entre si em relação às concentrações de fungicida e médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si em relação aos isolados, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de separação de médias SNK

Foram observadas tendências de crescimento diferentes entre os isolados quando se analisou as curvas de crescimento construídas a partir da medição diária das colônias, sendo que os heterocariontes H10, H11 e H12 apresentaram crescimento menor em relação aos outros durante os seis dias de incubação (Figura 4). Ao sexto dia após a repicagem estes heterocariontes apresentaram diâmetro cerca de 75% e 60% menor do que os demais nas concentrações de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

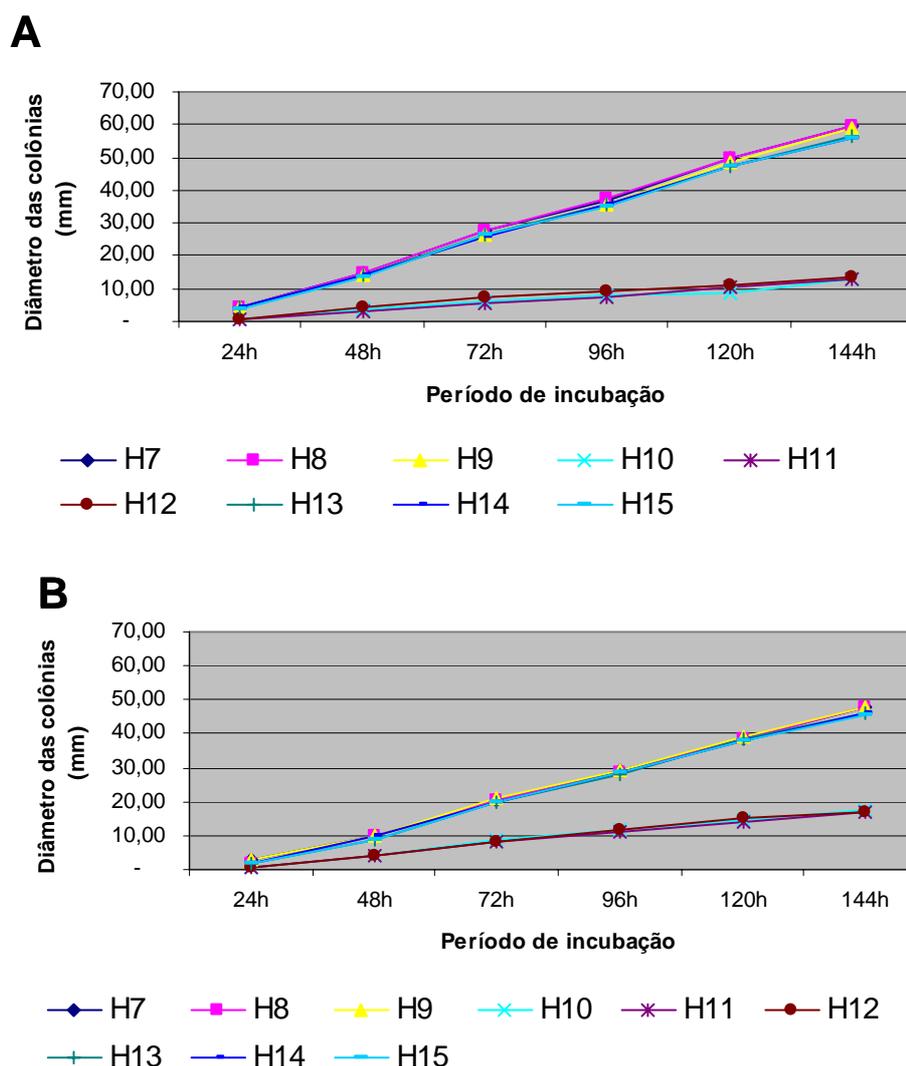


Figura 4. Diâmetro das colônias (mm) de heterocariontes de *Colletotrichum* spp. oriundos de macieira, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem, em meio BDA suplementado com duas diferentes doses de fungicida benomyl. A -  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; B -  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 3.3. Determinação das características culturais das colônias

Os heterocariontes foram agrupados em dois grupos de acordo com a observação da coloração das colônias e a formação ou não de setores, avaliados 7 dias após a repicagem (Figura 5). As colônias de todos os heterocariontes apresentaram crescimento cilíndrico em meio de cultura, sendo que os heterocariontes de *C. gloeosporioides* apresentaram maior crescimento (Figura 5a) e os heterocariontes de *C. acutatum* apresentaram menor crescimento (Figura 5b). Sendo assim, os heterocariontes pertencentes ao grupo I são representantes de *C. acutatum* enquanto os pertencentes ao grupo II de *C. gloeosporioides*.

Foi constatada a formação de peritécio (Figura 6) nos heterocariontes H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14 e H15, enquanto que os heterocariontes H10, H11 e H12 não apresentaram a formação de peritécio (Tabela 10).

Tabela 10. Características culturais de heterocariontes de *Colletotrichum* spp.

Grupo	Isolados	Características	Isolados de origem	Espécie
I	H10, H11, H12	Sem presença de peritécios e formação de setores. Crescimento cilíndrico. Colônias de coloração rosada em ambos os lados da placa de petri.	32 x 33	<i>C. acutatum</i>
II	H1, H2, H3 H4, H5, H6 H7, H8, H9 H13, H14, H15	Formação de peritécios em meio de cultura; sem formação de setores; crescimento cilíndrico. Colônias de coloração branco-oliva em ambos os lados da placa de petri.	26 x 27 27 x 28 17 x 18 17 x 18	<i>C. gloeosporioides</i>

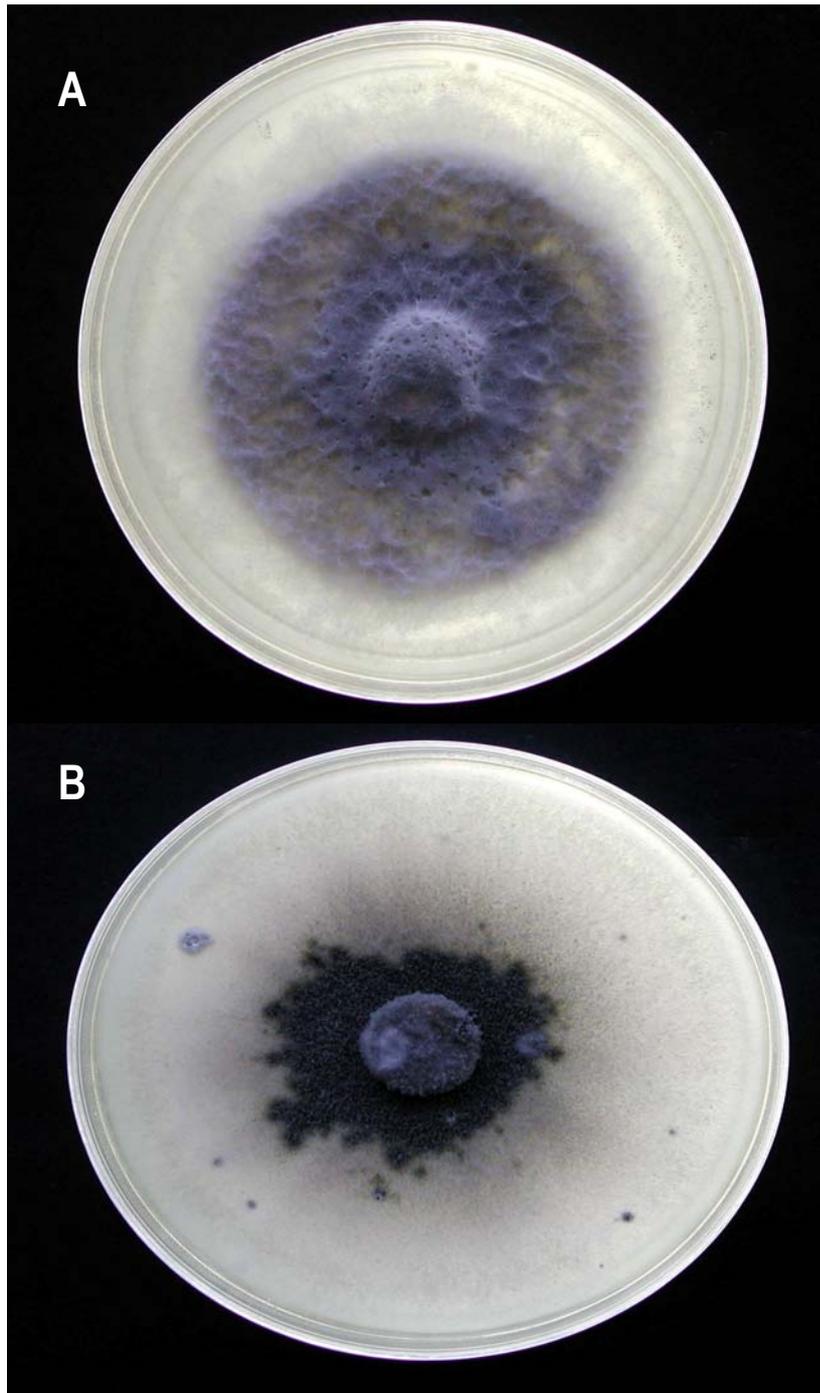


Figura 5. Colônias dos heterocariontes de *Colletotrichum* spp. A- *C. gloeosporioides*; B- *C. acutatum*.

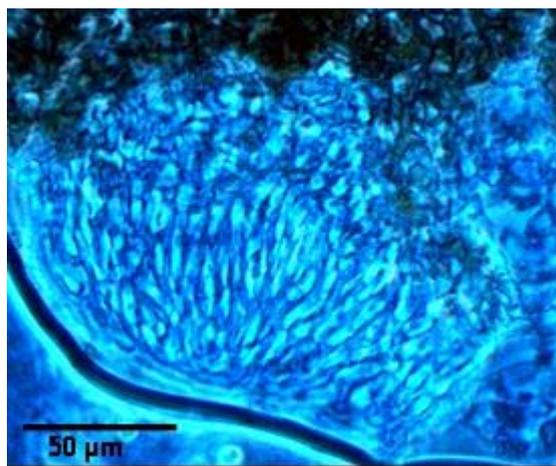


Figura 6. Peritécio de *Colletotrichum gloeosporioides* apresentando ascas em seu interior. Foto em contraste de fase.

#### 4. Caracterização morfológica dos conídios

Foram observados conídios fusiformes, com uma ou ambas as extremidades afuniladas, de tamanho variando entre 4,8 – 5,0 x 12,8 – 13,4 μm (Figura 7a, Tabela 11) em 3 dos heterocariontes de *C. acutatum*, provenientes de pareamento entre os isolados 32 e 33 (Fraiburgo, SC). E conídios de formato do tipo bastonete, retos com ápices obtusos e bases às vezes truncadas, de tamanho variando entre 4,6 - 5,0 x 13,1 – 16,5 μm, em 12 dos heterocariontes formados (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14, H15) todos classificados como *C. gloeosporioides* (Figura 7b, Tabela 11).

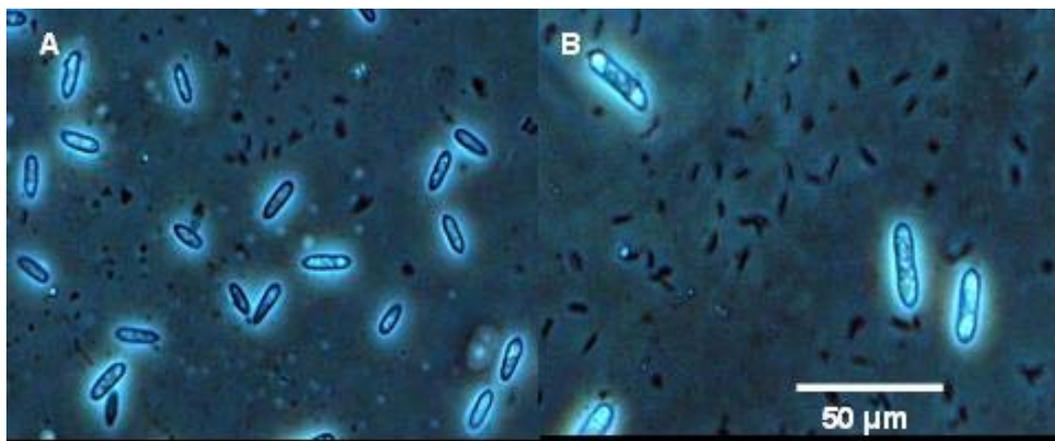


Figura 7. Conídios de alguns dos isolados dos heterocariontes de *Colletotrichum* spp. observados em aumento de 40 X, através de contraste de fase. Isolados H10 (A) e H13 (B).

Não houve diferenças significativas entre os isolados em relação à largura dos conídios, entretanto, em relação ao comprimento, os isolados H1 e H2 diferiram dos demais. Em relação à CC/LC os isolados H5 e H11 diferiram estatisticamente dos demais foram os. A maior relação CC/LC foi observada nos conídios do isolado H1, procedentes dos isolados 26 e 27 (Palmeira, PR) e a menor nos conídios do isolado H11, procedente dos isolados 32 e 33 (Fraiburgo, SC) (Tabela 11).

Comparando-se as dimensões dos conídios dos heterocariontes com as dos conídios dos isolados que lhes deram origem, constatou-se que os isolados que menos diferiram daqueles foram os de numeração H10, H11 e H12, pois a única diferença observada foi em relação ao índice CC/LC apresentado pelo isolado H11. Já os isolados que mais diferem dos que lhes deram origem são os isolados H3 e H15, sendo que o primeiro difere estatisticamente em todos os parâmetros analisados (comprimento, largura, CC/LC) e o segundo difere em relação ao comprimento e ao índice CC/LC (Tabela 11).

Tabela 11. Características dos conídios dos heterocariontes de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Formato	Largura x Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Relação comp/ largura	Espécie
H1	bastonete	5,0 x 16,4	3,30 hi	<i>C. gloeosporioides</i>
H2	bastonete	5,0 x 16,5	3,27 ghi	<i>C. gloeosporioides</i>
H3	bastonete	4,6 x 13,8	3,00 cdefg	<i>C. gloeosporioides</i>
H4	bastonete	4,9 x 14,9	3,03 cdefgh	<i>C. gloeosporioides</i>
H5	bastonete	4,9 x 13,1	2,69 ab	<i>C. gloeosporioides</i>
H6	bastonete	5,0 x 15,6	3,13 defghi	<i>C. gloeosporioides</i>
H7	bastonete	4,7 x 13,5	2,85 bcd	<i>C. gloeosporioides</i>
H8	bastonete	4,9 x 15,8	3,24 fghi	<i>C. gloeosporioides</i>
H9	bastonete	4,8 x 14,3	2,99 cdefg	<i>C. gloeosporioides</i>
H10	fusiforme	4,8 x 13,4	2,81 bc	<i>C. acutatum</i>
H11	fusiforme	5,0 x 12,8	2,56 a	<i>C. acutatum</i>
H12	fusiforme	5,0 x 13,3	2,66 bcd	<i>C. acutatum</i>
H13	bastonete	5,0 x 14,8	2,97 cdef	<i>C. gloeosporioides</i>
H14	bastonete	5,0 x 15,5	3,09 cdef	<i>C. gloeosporioides</i>
H15	bastonete	4,6 x 13,6	2,93 bcde	<i>C. gloeosporioides</i>
17	bastonete	5,1 x 16,6	3,29 hi	<i>C. gloeosporioides</i>
18	bastonete	4,7 x 15,7	3,30 hi	<i>C. gloeosporioides</i>
26	bastonete	4,9 x 15,9	3,22 efghi	<i>C. gloeosporioides</i>
27	bastonete	4,9 x 16,3	3,35 i	<i>C. gloeosporioides</i>
28	bastonete	4,9 x 14,4	2,95 cdef	<i>C. gloeosporioides</i>
32	fusiforme	4,5 x 13,9	3,08 efghi	<i>C. acutatum</i>
33	fusiforme	4,8 x 13,7	2,83 bc	<i>C. acutatum</i>

#### 4. Determinação da patogenicidade dos heterocariontes

##### 4.1. Inoculação dos heterocariontes em folhas

Com exceção dos heterocariontes H10, H11 e H12, todos os demais ocasionaram lesões típicas de MG em ramos de macieira da cv Gala e não provocaram quaisquer tipos de sintomas em ramos da cv Fuji. Entretanto, todos eles apresentaram patogenicidade mais baixa do que os isolados que lhes deram origem. Os isolados H10,

H11 e H12 diferiram dos isolados dos quais provinham (isolados 32 e 33) e não diferiram da testemunha (Tabela 12).

Dentre os heterocariontes patogênicos a folhas, H1, H2, H6, H7, H8, H9, H13, H14 e H15 foram os que apresentaram as maiores médias de severidade. Os heterocariontes H3, H4 e H5 ocasionaram menor severidade da doença (0,21, 0,22 e 0,18, respectivamente) (Tabela 12).

Tabela 12. Percentagem de incidência e severidade média dos heterocariontes de *Colletotrichum* spp. isolados de macieira, inoculados em tecido foliar da cultivar Gala.

<b>Isolado</b>	<b>Isolados de origem</b>	<b>Incidência (%)</b>	<b>Severidade média<sup>1</sup></b>
Testemunha		0,00	0,00 a
H1	26 x 27	100	0,35 c
H2	26 x 27	100	0,39 c
H3	26 x 27	100	0,21 b
H4	27 x 28	100	0,22 b
H5	27 x 28	100	0,18 b
H6	27 x 28	100	0,43 c
H7	17 x 18	100	0,38 c
H8	17 x 18	100	0,43 c
H9	17 x 18	100	0,40 c
H10	32 x 33	0,0	0,00 a
H11	32 x 33	0,0	0,00 a
H12	32 x 33	0,0	0,00 a
H13	17 x 18	100	0,42 c
H14	17 x 18	100	0,42 c
H15	17 x 18	100	0,40 c

<sup>1</sup> Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de separação de médias SNK.

## DISCUSSÃO

Em relação à geração dos heterocariontes, a concentração de  $\text{KClO}_3$  não interferiu significativamente no crescimento das colônias e posterior pareamento dos isolados. Entretanto, em concentração de 4,5% foram observados maior formação de heterocariontes. Como a hipótese de nulidade foi rejeitada, através do teste  $\chi^2$ , pode-se dizer que a variação encontrada no número de isolados que cresceram na presença de  $\text{KClO}_3$ , ou seja, nos supostos mutantes, de acordo com o local de onde estes foram coletados não se deve ao acaso, sendo que o local de procedência exerce influência no comportamento dos isolados, tanto de Mancha da Gala quanto de Podridão Amarga.

De acordo com DEBETS (1998), evidências de recombinação parassexual têm sido encontradas em membros das mais variadas classes de fungos, sendo estas observadas mais facilmente em trabalhos em laboratório, a exemplo dos trabalhos desenvolvidos com *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* por CISAR et al. (1999) e CISAR et al (1996), respectivamente.

Os pareamentos sempre ocorreram entre isolados oriundos de um mesmo local, comprovando que isolados procedentes de um mesmo local são geneticamente mais parecidos entre si do que com isolados oriundos de outros locais, pois de acordo com LESLIE (1993) descreve que a compatibilidade vegetativa é regulada por múltiplos locos de incompatibilidade vegetativa, denominados genes *vic* ou *het*. Se dois isolados diferem em apenas um desses locos *vic*, isto já é suficiente para impedir a formação de um heterocarionte estável (LESLIE et al., 1992).

Estudos genéticos realizados com isolados de *Colletotrichum* spp. indicaram que o número de locos *vic* nesse gênero situa-se entre 2 (dois) e 7 (sete) (CORRELL et al., 2000). Na maioria dos casos em que a compatibilidade vegetativa é homogênea, isto é, dois isolamentos são considerados compatíveis, ocorre a identidade genética ao nível de todos os locos *vic* (LESLIE, 1993).

As evidências de recombinação através de transferência de material genético têm importantes implicações para a evolução dos patógenos assexuais (CARVALHO, 1997), visto que a reprodução de muitas populações de *Colletotrichum* é exclusivamente vegetativa e que, na ausência de uma fase sexuada, a única maneira de troca de

material genético entre dois isolados é através de anastomose ou de heterocariose (KATAN, 2000).

A principal diferença observada entre os heterocariontes e os seus isolados de origem foi em relação ao tamanho dos conídios, sendo que os heterocariontes H3 e H15 diferiram dos seus isolados de origem. Nas demais características morfológicas dos heterocariontes apresentaram-se estatisticamente similares às de seus isolados de origem. Embora tenha sido constatada no presente trabalho, essa diferença em relação ao tamanho dos conídios não deve ser tomada como único critério de classificação, pois há muitas evidências de que caracteres taxonômicos convencionais, tais como forma e tamanho de conídios e apressórios, variam amplamente em função das condições ambientais (MILLS et al., 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; SUTTON, 1992; WALLER, 1992).

Com a análise de patogenicidade dos heterocariontes em folhas de macieira, cv Gala e Fuji, os heterocariontes H10, H11 e H12 não foram patogênicos a nenhuma das cultivares, diferentemente dos isolados que lhes deram origem (isolados 32 e 33), os quais causaram sintomas de mancha necrótica (MN) em folhas da cv Gala.

Isso implica em dizer que no processo de “fusão” dos isolados, para posterior formação dos heterocariontes, ocorreu alguma modificação na região contendo o(s) gene(s) que regulam a patogenicidade do patógeno nesse patossistema, fazendo com que este perdesse a capacidade de ocasionar sintomas em folhas de macieira. Os demais heterocariontes (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14 e H15) não apresentaram este tipo de modificação, pois ocasionaram sintomas típicos de MG em folhas da cv Gala, e não foram patogênicos a folhas da cv Fuji.

## CONCLUSÃO

- Os heterocariontes foram formados apenas entre isolados oriundos de um mesmo local e entre isolados pertencentes à mesma espécie.
- Todos os heterocariontes apresentaram características culturais e morfológicas semelhantes às dos isolados dos quais tiveram origem; classificados em *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

- Os heterocariontes oriundos de isolados que causaram sintomas típicos de MG em folhas da cv Gala, foram patogênicos induzindo sintomas típicos de MG e não patogênicos em folhas da cv Fuji. Já os heterocariontes oriundos de isolados de mancha necrótica não foram patogênicos a nenhuma das cultivares testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALARDIN, R. Fundamentos da resistência em plantas. In: [http://www.balardin.com.br/adm/arquivos/5\\_fundderesistencia.pdf](http://www.balardin.com.br/adm/arquivos/5_fundderesistencia.pdf) Acesso em 17/ 01/ 2006.
- BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. 2 ed. **Revista Brasileira de Genética**. 1991.
- CARVALHO, F.M.S. **Caracterização cultural, morfológica e genética de espécies de *Colletotrichum* associadas a doenças em macieira**. Tese de mestrado. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1997.
- CATEN, C.E. Parasexual processes in fungi. In: **"The fungi nucleus"**. p 191-214. Cambridge University Press. 1981.
- CISAR, C.R.; TEBEEST, D.O. Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata*. **Current Genetics** 35: 127-133. 1999.
- CISAR, C.R.; THORNTON, A.B.; TEBEEST, D.O. Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Teleomorph: *Glomerella cingulata*) with different host specificities mate on Northern Jointvetch. **Biological Control** 7: 75-83. 1996.
- CORRELL, J.C.; GUERBER, J.C.; WASILWA, L.A.; SHERRIL, J.F.; MORELOCK, T.E. Inter and Intra-Species Variation in *Colletotrichum* and Mechanisms which Affect population Structure. In: ***Colletotrichum – Host Specificity, Pathology and Host Pathogen Interaction***. St Paul, Minnesota: APS, 145-179, 2000.
- DEBETS, A.J.M. Parasexuality in fungi: Mechanisms and significance in wild populations. In.: **Molecular Variability of Fungal Pathogens**. CAB International: New York, 1998. p 41-52.
- KATAN, T. Vegetative Compatibility in *Colletotrichum*. In: ***Colletotrichum – Host Specificity, Pathology and Host Pathogen Interaction***. St Paul, Minnesota: APS, 45-56, 2000.
- LESLIE, J.F. Fungal Vegetative Compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, 31: 127-150. September, 1993

LESLIE, J.F.; DOE, F.J.; PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D.; JONZ, J. Fumonisin B<sub>1</sub> production and vegetative compatibility of strains from *Gibberella fujikuroi* mating population "A" (*Fusarium moniliforme*). **Mycopathologia**, 117: 37-45, 1992.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters** 98: 137- 143. 1992.

PEREIRA, I.S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella* – *Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos**. Lavras, UFLA, 2005. Tese de mestrado. 92p.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in genetics** 5: 141-238. 1953.

REIS, S.I.R. **Grupos de Compatibilidade Vegetativa em *Colletotrichum kahawae* J. M. Waller & P. B. Bridge, sp. nov.** Lisboa: Universidade técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. Trabalho conclusão de curso. 1988. 78p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3<sup>a</sup> ed. New York: WH Freeman, 1995. 881p.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P.R.; MEEHAN, B.M.; BROWN, A.E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome** 39: 499-512. 1996.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: ***Colletotrichum: Biology, pathology and control***. England, CAB international Wallingford, 1-26, 1992.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L.G.; SARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Cienc. Agrotec.** 25(6): 1314-1320. 2001.

WALLER, J.M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: ***Colletotrichum: Biology, pathology and control***. England, CAB international Wallingford, 167-185, 1992

## CAPÍTULO IV

---

### ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE *Colletotrichum* spp

#### INTRODUÇÃO

Desde que os métodos tradicionais de classificação não vêm se mostrando satisfatórios para diferenciar espécies de *Colletotrichum*, métodos moleculares têm ganhado popularidade nos últimos tempos (FREEMAN et al., 1998). Os métodos de estudos baseados nas seqüências de DNA possibilitam uma análise mais precisa da variação genética, pois podem detectar alterações mutacionais em regiões codificadoras, de um número limitado de genes que se expressam em enzimas (SREENIVASAPRAD et al., 1994; CORREL et al., 1993). De acordo com FALEIRO et al. (2004) o conhecimento da variabilidade genética do patógeno tem grande importância em estudos de patogenicidade e relacionados ao melhoramento genético visando resistência à doença que este causa.

Estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares em *Colletotrichum* vêm sendo desenvolvidos com diversas espécies, entre elas *C. graminicola* (VALERIO et al., 2005; HORVATH et al., 2004); *C. gossypii* (SILVA-MANN et al., 2001); *C. acutatum* (FREEMAN et al., 2001; GUERBER et al., 2003); *C. gloeosporioides* (ABRANG et al., 2005; WEEDS et al., 2003).

O uso de marcadores moleculares como RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) tem sido amplamente utilizado no estudo da variabilidade de populações de fungos (GUTHRIE et al., 1992; MILLS et al., 1992). Em *Colletotrichum*, esse tipo de marcador molecular tem sido utilizado para estimar a diversidade genética intraespecífica do gênero (FREEMAN et al., 1996; FREEMAN et al., 1998) e até mesmo para identificação de espécies (FREEMAN & KATAN, 1997), como no trabalho desenvolvido por HAYDEN et al. (1994) que diferenciou espécies de *Colletotrichum* patogênicas a diversas frutas tropicais usando perfil de banda de RAPD. Dentro deste contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar a diversidade genética de diferentes isolados e heterocariontes de *Colletotrichum* spp.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Crescimento e liofilização dos isolados**

Massa micelial dos 39 isolados e de 15 heterocariontes foi cultivada em meio líquido de batata dextrose (BD), mantido sob agitação constante a 24°C, no escuro, durante 7 dias. Para isso, foram utilizados discos de micélio de 24 mm. Após este período, o micélio dos isolados foi filtrado com o auxílio de bomba de vácuo e papel filtro e liofilizado durante 24 horas. As amostras foram mantidas sobre refrigeração (4°C) até a extração do DNA.

### **2. Extração e quantificação de DNA**

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por DOYLE & DOYLE (1987) com algumas modificações. Em torno de 50 a 100 mg de micélio liofilizado foram triturados em almofariz, na presença de nitrogênio líquido até formar um fino pó. Imediatamente adicionou-se em torno de 1,0 mL de tampão de extração (CTAB 2%; 1,4M NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,4%  $\beta$ -mercaptoetanol).

As amostras foram transferidas para microtubos de eppendorf 1,5 mL e colocadas em banho-maria à temperatura de 55°C, durante 30 minutos. Passado este período, foram adicionados em cada tubo 650  $\mu$ L de CIA (clorofórmio:alcoól isoamílico; 24:1), agitando levemente os tubos até que se formasse uma emulsão. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm, em estufa refrigerada (4°C) para obtenção de uma dupla fase. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para um novo microtubo, onde foi realizada uma segunda extração, adicionado-se 200  $\mu$ L de tampão de extração, sem  $\beta$ -mercaptoetanol e, em seguida, 650  $\mu$ L de CIA (24:1). Os tubos foram levemente agitados, novamente, até que se formasse uma nova emulsão e centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm em estufa refrigerada (4°C). Este passo foi repetido por mais duas vezes.

Após a transferência final para um novo tubo foi adicionado em cada amostra um volume igual de etanol absoluto gelado (-20°C). Os tubos foram colocados em freezer (-

20°C), onde permaneceram por aproximadamente 4 horas para que ocorresse a precipitação do DNA.

Passado este período, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm, para obtenção do *pellet*, o qual foi submetido à lavagem com etanol 70% por duas vezes e deixado secar ao ar. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA), contendo RNase (10 µg.mL<sup>-1</sup>) e incubado em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. De cada amostra foram feitas duas repetições e as amostras foram mantidas a -20°C até o seu uso.

A estimativa da concentração de DNA extraído foi feita em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, tendo como padrão DNA Fago Lambda as concentrações de 40, 100 e 200 ng/µl. Depois de estimada a concentração de DNA, o mesmo foi diluído em água mili-Q autoclavada para uma concentração de 3,0 ng/µl.

A quantificação foi realizada sob voltagem de 60V durante 3 horas e a visualização das bandas foi feita sob luz ultravioleta. Os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta e registrado através de fotodocumentadora (Single UV M-20, UVP®), com auxílio do programa DigDoct.

### 3. Reações de amplificação

Os DNAs foram submetidos à reação de polimerização em cadeia (PCR) através da amplificação com marcador molecular RAPD, onde foi realizada em um volume de 13,75 µl contendo: 1,3 µl tampão 10X (100 mM de Tris-HCl pH 8,7; 500 mM de KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% gelatina); 3 µl de DNA (3 ng/l); 3 µl de iniciadores (5 ng/µl); 1,04 µl BSA (10 mg/ml); 1,14 µl dNTPs (2,5 mM de cada nucleotídeo); 0,65 µL de MgCl<sub>2</sub> (na concentração de 50 mM); 0,2 µl *Taq* polimerase (5 U/µl) e 3,42 µl água mili-Q autoclavada. Após misturados todos os componentes acima descritos, foram adicionados a cada amostra 30 µL de óleo mineral e estas foram levadas ao termociclador PTC-100 (MJ Research). O programa de amplificação utilizado consistiu de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto; 35°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos, e um ciclo final a 72°C por 5 minutos.

A escolha dos iniciadores foi baseada em trabalhos realizados com espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* (WEEDS et al., 2003; SAHA et al., 2002; SILVA-

MANN et al., 2002), sendo que inicialmente foram testados 14 diferentes iniciadores decâmeros de seqüência arbitrária provenientes dos Kits da OPERON Technologies Inc.

Aos produtos de amplificação do DNA foram acrescentados 5 µL de tampão de carregamento [2,5 mg/mL de azul de bromofenol; 400 mg/mL de sacarose; 0,02 mg/mL de brometo de etídio; 12,1 mg/mL de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0]. O produto da amplificação foi revelado em gel de agarose (1,5%) e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), em aparato de eletroforese horizontal submersa, com tampão de cuba TBE 1X [54 mg/mL de Tris-HCl; 27,5 mg/mL de ácido bórico; 0,01 M de EDTA pH 8,0], com condições de corrida de eletroforese na voltagem de 100 V e potência constante de 60 W por 4 horas. Após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e registradas através de fotodocumentadora (Single UV M-20, UVP®).

As bandas resultantes das reações de RAPD foram avaliadas quanto a sua ausência ou presença no gel, construindo-se uma matriz binária para os dados correspondentes às bandas polimórficas, onde 1 representou a presença de bandas e 0 a ausência destas. Para a determinação da similaridade entre os isolados foi utilizado o índice de similaridade de Jaccard (ROHLF, 1951), agrupamento dos isolados pelo método UPGMA e construção do dendograma correspondente, foi utilizado o programa NTSYSpc 2.02 (State University of New York, EUA).

## **RESULTADOS**

### **1. Quantificação de DNA**

O protocolo de extração de DNA utilizado foi satisfatório para a obtenção de amostras de DNA para análise com marcadores RAPD. A quantidade de DNA obtida variou entre 50 e 200 ng/ µL, sendo que as amostras apresentaram boa qualidade para utilização deste tipo de marcador molecular (Figura 1).

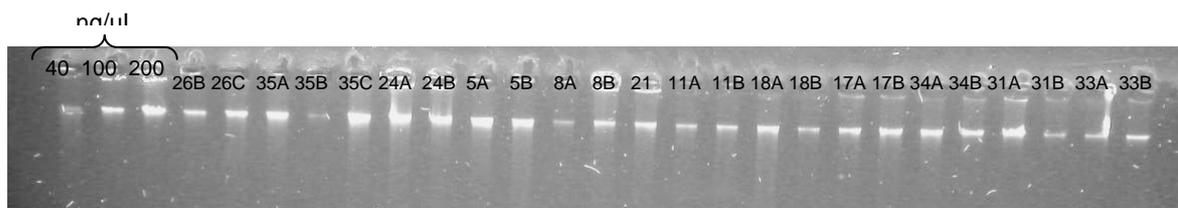


Figura 1. Gel de quantificação do DNA micelial de 24 isolados de *Colletotrichum* spp. Em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml)

## 2. Análise RAPD

A partir de 14 iniciadores inicialmente testados, 10 iniciadores foram selecionados por apresentarem maior polimorfismo. O número de bandas amplificadas por iniciador variou entre 21 (OPB10) e 11 (OPA14) (Tabela 1). Ao total foram analisados 165 fragmentos polimórficos, de peso molecular variando entre 0,35–2,5 kb. A Figura 2 mostra o polimorfismo gerado pelo iniciador OPA 19 em 39 dos 54 isolados trabalhados.

Tabela 1. Primers, seqüência de nucleotídeos, número e peso molecular obtido na amplificação dos iniciadores RAPD em isolados de *Colletotrichum* spp.

Primers	Seqüência de nucleotídeo (5' – 3')	Nº médio de bandas amplificadas/iniciador	Peso molecular (pb)
OPA 02	TGCCGAGCTG	20	500 - 2300
OPA 04	AATCGGGCTG	16	500 – 2072
OPA 07	GAAACGGGTG	16	350 - 2300
OPA 14	TCTGTGCTGG	11	600 - 2200
OPA 19	CAAACGTCCG	17	480 - 2300
OPAN 11	GTCCATGCAG	20	500 - 2300
OPB 01	GTTTCGCTCC	14	850 - 2200
OPB 10	CTGCTGGGAC	21	350 - 2300
OPD 07	TTGGCACGGG	15	700 - 2500
OPD 18	GAGAGCCAAC	15	400 - 2300
<b>Total</b>		<b>165</b>	

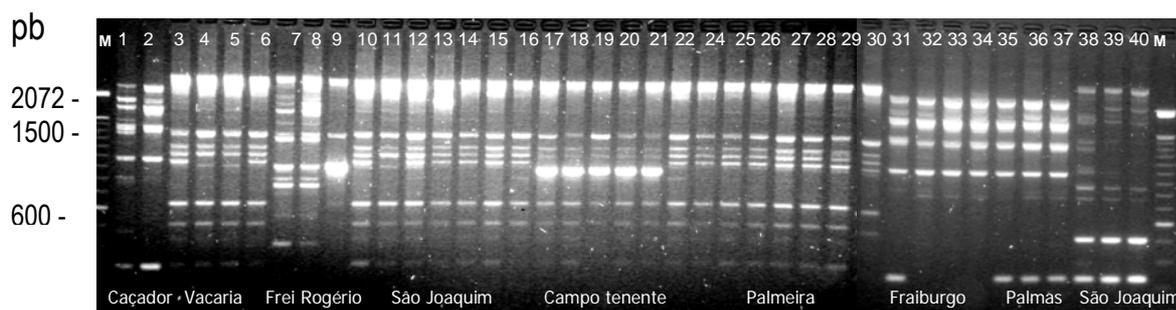


Figura 2. Polimorfismo gerado pelo iniciador OPA 19 em 39 isolados de *Colletotrichum* spp. em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etideo (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Os iniciadores aqui testados foram capazes de distinguir geneticamente isolados que se mostraram diferentes uns dos outros em relação a algumas características culturais e morfológicas analisadas, a exemplo da sensibilidade ao fungicida benomyl (Figura 3) onde os isolados de *C. gloeosporioides* resistentes ao benomyl são facilmente distinguidos dos demais.

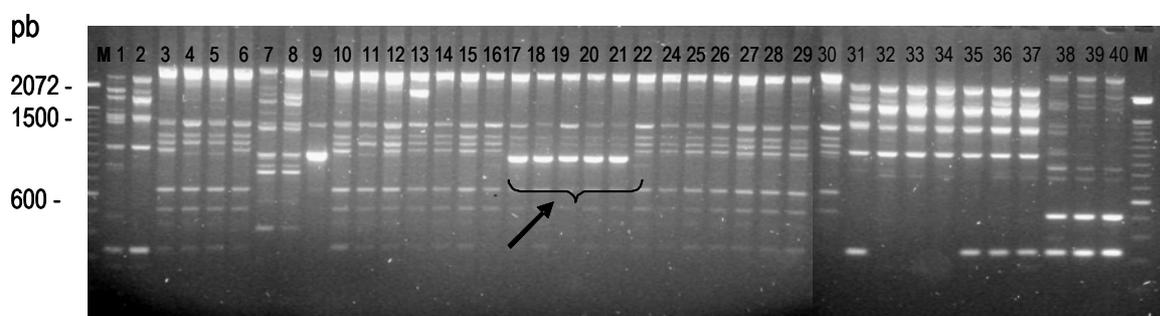


Figura 3. Polimorfismo gerado pelo iniciador OPA 07 em 39 isolados de *Colletotrichum* spp. A flecha mostra os isolados 17, 18, 19, 20 e 21 resistentes ao benomyl com bandas monomórficas.

A partir das bandas amplificadas foi calculada a similaridade genética entre os isolados e gerado um dendograma (Figura 4).

A análise separou os isolados em sete grupos, sendo que dois destes grupos foram formados apenas pelos heterocariontes. O primeiro grupo foi formado pelos

isolados 1 e 2, ambos oriundos de Caçador/ SC, apresentando 100% de similaridade genética, ambos os isolados ocasionaram lesões de Podridão Amarga em frutos.

O segundo grupo foi formado pelos isolados 31, 32, 33 e 34 (Fraiburgo, SC) e pelos isolados 35, 36 e 37 (Palmas, PR), os quais apresentaram similaridade genética variando entre 80 - 100%. O terceiro grupo foi formado pelos heterocariontes H10, H11 e H12 (provenientes de pareamento entre isolados oriundos de Fraiburgo, SC), apresentando similaridade genética variando entre 83 e 86,5% entre eles.

O quarto grupo foi o que englobou o maior número de isolados, compreendendo todos aqueles que ocasionaram lesões de Mancha da Gala em folhas da cultivar Gala. Estão compreendidos neste grupo os isolados 3 (Caçador, SC); 4 e 5 (Vacaria, RS); 6 e 9 (Frei Rogério, SC); 10 (Curitibanos, SC); 11, 12 e 13 (São Joaquim, SC); 14 (Palmas, PR); 15 e 16 (Fraiburgo, SC); 17, 18, 19, 20 e 21 (Palmeira, PR); 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 (Campo Tenente, PR), com similaridade genética entre os isolados variando entre 91,0 e 100% (Figura 4).

O quinto grupo foi formado pelos heterocariontes H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14 e H15; sendo que o coeficiente de similaridade entre esses isolados variou de 58 a 97%. Os isolados 7 e 8 (provenientes de Frei Rogério, SC) formaram o sexto grupo, sendo que o coeficiente de similaridade genética entre eles foi de 98%. O sétimo grupo foi formado pelos isolados 38, 39 e 40 (São Joaquim, SC), com 100% de similaridade genética, os quais ocasionaram sintomas de Podridão Amarga em frutos das cultivares Gala e Fuji (Figura 4).

Em relação aos grupos formados pelos heterocariontes, o grupo formado pelos heterocariontes H10, H11 e H12, apresentaram coeficiente de similaridade variando entre 85 e 87%. Os demais heterocariontes H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H13, H14 e H15, formaram um grupo (V) variando entre 58 e 97%. O coeficiente de similaridade entre os dois grupos de heterocariontes foi de 18,5%, com grande divergência genética entre eles, à semelhança do observado com os isolados dos quais tiveram origem. Nos heterocariontes H10, H11 e H12 foram divergentes geneticamente dos isolados de origem (32 e 33), observado em destaque nos primers OPB01 e OPD18 (Figura 5).

No contexto geral, analisando-se todos os grupos a similaridade genética encontrada entre os isolados variou entre 18,5 a 100%. Nota-se ainda que os

heterocariontes formaram grupos separados dos demais isolados, sendo que entre eles e os isolados que lhes deram origem, o coeficiente de similaridade genética variou entre 35 e 50% (Figura 4).

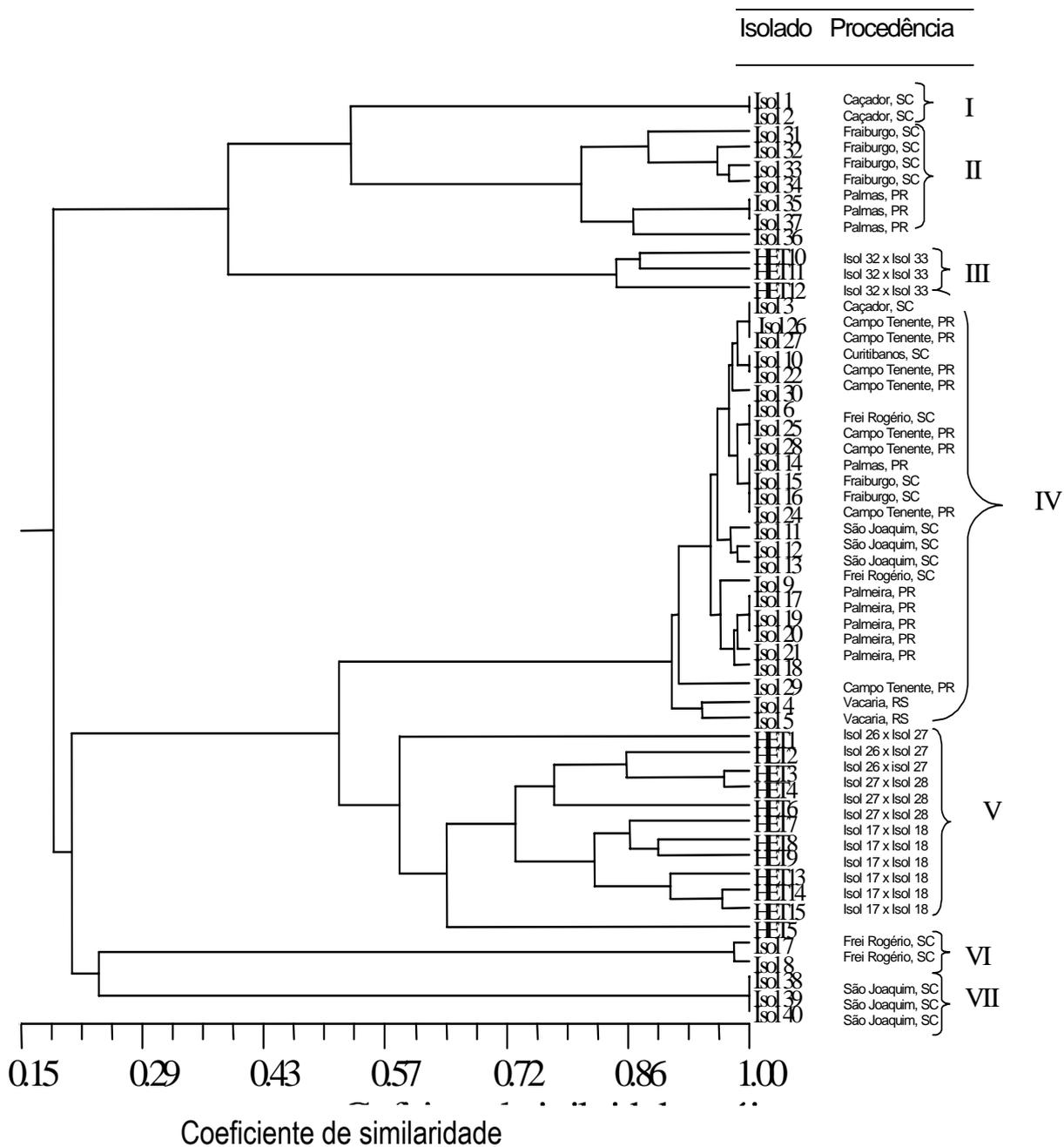


Figura 4. Dendrograma gerado a partir da análise de bandas obtidas por iniciadores RAPD em 39 isolados e 15 heterocariontes de *Colletotrichum*.

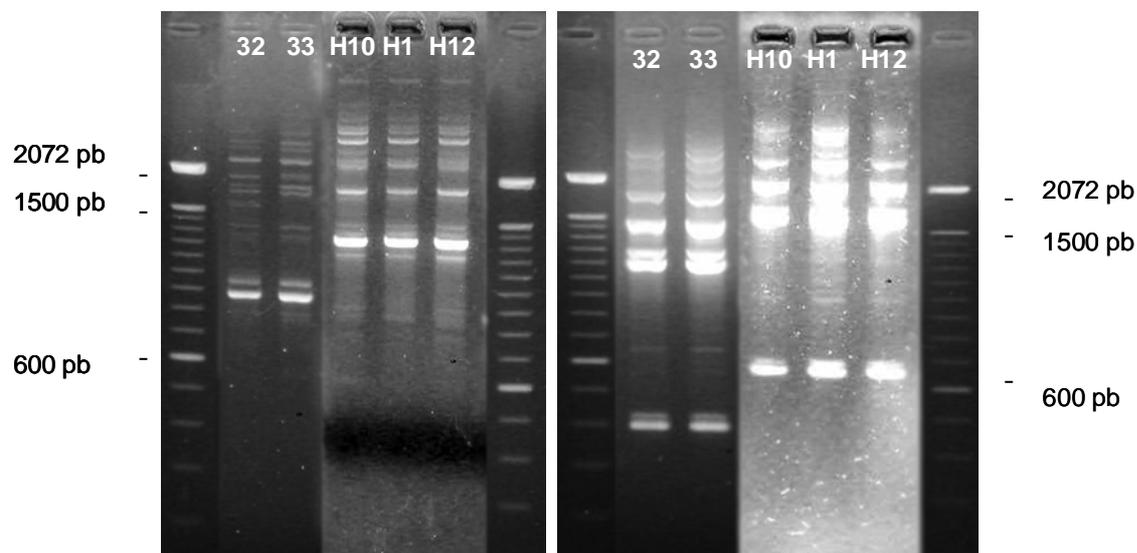


Figura 5. Polimorfismo gerado pelos iniciadores RAPD OPB01 (esquerda) e OPD18 (direita) entre heterocariontes de *Colletotrichum* spp e seus isolados de origem.

## DISCUSSÃO

A análise dos isolados de *Colletotrichum* spp. através do marcador RAPD revelou polimorfismo entre eles, separando-os em 7 grupos. Nota-se que os isolados que causaram sintomas típicos de MG (*C. gloeosporioides*), ficaram agrupados em um único grupo (grupo IV), com coeficiente de similaridade variando entre 91 e 100%. Essa similaridade é semelhante à encontrada anteriormente por CARVALHO (1997) em isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de macieiras do Paraná e de Santa Catarina, que encontrou similaridade genética entre os isolados variando de 91 a 99%.

Os isolados (7 e 8), ambos oriundos de Frei Rogério, SC e classificados como *C. gloeosporioides* foram separados dos demais através da análise por RAPD. Sugere-se que estes isolados sejam saprófitas de *Colletotrichum*, pois pelo teste de patogenicidade estes não ocasionaram quaisquer tipos de sintomas nas folhas e nos frutos de macieira em ambas as cultivares testadas. Estes isolados, quando inoculados em frutos com ferimentos, produziram micélio sob os tecidos inoculados, mas não ocasionaram

quaisquer tipos de lesões, à semelhança do observado por FREEMAN et al. (2001) em isolados não patogênicos de *C. acutatum*, em morango e em outras plantas.

Os isolados 1 e 2 (Caçador, SC), 31, 32, 33, e 34 (Fraiburgo, SC), 35, 36 e 37 (Palmas, PR), 38, 39 e 40 (São Joaquim, SC) de *C. acutatum*, que ocasionaram sintomas típicos de Podridão Amarga (PA) nos frutos apresentaram alta dissimilaridade genética entre eles (variando entre 18,5 e 100%), sendo que os isolados 38, 39 e 40 oriundos de lesões de PA coletados em pomares no município de São Joaquim, SC, foram os que se apresentaram mais distante geneticamente dos demais, apresentando um índice de dissimilaridade de 81,5%. Essa alta divergência encontrada entre isolados de *C. acutatum* já vem sendo relatada em outros patossistemas como em morango, em que se observou que na espécie *C. acutatum*, a dissimilaridade genética entre os isolados variou entre 0 e 80% (DENOYES-ROTHAN et al., 2003), em seringueira (*Hevea brasiliensis*) onde se observou que isolados de *C. acutatum* possuíam alta dissimilaridade genética, superior a 90% (SAHA et al., 2002) e em *Citrus* onde isolados de *C. acutatum* apresentaram dissimilaridades genéticas de até 96% (KURAMAE-IZIOKA et al., 1997). Entretanto, isolados de *C. acutatum* oriundos de macieira mostraram-se muito similares entre si, com similaridade genética de 91 a 99% em trabalho realizado por CARVALHO (1997).

Os grupos formados quando se analisou o tipo de sintoma ocasionado não coincidem com os grupos formados pela análise por marcadores RAPD, ao contrário do observado por SAHA et al. (2002) no patossistema *Colletotrichum* – *Hevea brasiliensis*, que encontrou relação entre os grupos formados pela análise através de marcadores RAPD e os grupos formados pelo tipo de sintoma ocasionado pelos isolados. Os grupos formados através da análise das características culturais e morfológicas se aproximam mais dos formados pela análise molecular, em relação aos formados pelo teste de patogenicidade. Os isolados que foram classificados como *C. gloeosporioides* ficaram todos em um grande grupo, com exceção dos isolados 7 e 8 (provenientes de Frei Rogério, SC) que já haviam sido separados dos demais através da caracterização cultural; os isolados de *C. acutatum* foram os que se mostraram mais divergentes pela análise molecular, sendo geralmente os isolados mais próximos eram procedentes de um mesmo local. Semelhante ao que foi aqui observado, KURAMAE-IZIOKA et al. (1997),

trabalhando com o patossistema *Colletotrichum* spp. x *Citrus* que encontraram relação entre os grupos formados pela análise RAPD e os grupos formados pela análise de crescimento e resistência ao benomyl, mas não com a patogenicidade.

Observou-se uma estreita relação entre os grupos formados pela análise molecular e o local de procedência dos isolados. Este tipo de relação entre o mesmo local de origem e alta similaridade genética já vem sendo observado por alguns autores em outros patossistemas, como por exemplo, VALÉRIO et al. (2005) que estudando o patossistema *C. graminicola* – sorgo não encontraram congruência entre os grupos formados por RAPD e pelos formados através da análise de virulência, mas inferem que isolados oriundos de um local de origem comum são agrupados em um mesmo grupo através da análise molecular. Ou ainda, MUNAUT et al. (2002) estudando o patossistema *C. gloeosporioides* X *Stylosanthes* spp., que encontraram relação entre origem geográfica dos isolados e distâncias genéticas entre estes, sendo que isolados oriundos de uma mesma região mostraram-se mais próximos geneticamente do que isolados oriundos de regiões diferentes.

Embora tenha se observado que isolados oriundos de um mesmo local ficaram agrupados mais próximos uns dos outros do que dos oriundos de outros locais, não se pode dizer que estes apresentem divergência a tal ponto de se isolarem reprodutiva ou geograficamente, visto que o coeficiente de similaridade genética entre eles foi alto, variando entre 91 e 100%.

Entretanto, é possível que futuramente essa similaridade diminua e os isolados se constituam em populações distintas de acordo com cada região, como o observado por VALERIO et al. (2005) em trabalho com isolados de *Colletotrichum graminicola* provenientes de várias regiões do Brasil; sendo que o fato de a principal forma de disseminação dos conídios de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* ser através de respingos de água (LOPEZ, 2001) possa influenciar em grande parte a formação de populações distintas, visto que dessa maneira os esporos são disseminados a curtas distâncias.

## CONCLUSÃO

- A análise através de marcador RAPD revelou amplo polimorfismo entre os isolados e os heterocariontes estudados. Os isolados que ocasionaram sintomas típicos de MG em macieira ficaram agrupados em um grande grupo. Entretanto, a maior variabilidade genética foi observada nos isolados de *C. acutatum*.
- O marcador RAPD foi capaz de distinguir os isolados de *C. gloeosporioides* resistentes ao fungicida benomyl.
- Os grupos formados pelos iniciadores RAPD coincidem em grande parte com os grupos formados pelas características culturais e morfológicas dos isolados e com os locais de onde estes foram coletados. Entretanto, os grupos formados pela análise molecular não coincidem com os grupos formados através da análise dos sintomas ocasionados em folhas e frutos de macieira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, F.M.S. **Caracterização cultural, morfológica e genética de espécies de *Colletotrichum* associadas a doenças em macieira**. UEL, Londrina, Tese de mestrado. 117p. 1997.
- CORRELL, J.C.; MORELOCK, T.E.; GUERBER, J.C. Vegetative Compatibility and Virulence of the Spinach Anthracnose Pathogen, *Colletotrichum dematium*. **Plant Disease**, 77 (7): 688-691, 1993.
- DENOYES-ROTHAN, B.; GUERIN, G.; DÉLYE, C.; SMITH, B.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Genetic Diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. **Phytopathology** 93 (2): 219-228, 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15, 1987.
- FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology** 91(10): 986-992. 2001.
- FREEMAN, S.; KATAN, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopathology** 87: 516-521. 1997.
- FREEMAN, S.; KATAN, T; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease** 82: 596-605. 1998.

- FREEMAN, S.; KATAN, T; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruit whit molecular and pathogenicity tests. **Applied and Environmental Microbiology** 62: 1014-1020. 1996.
- GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers – a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology** 82: 832-835. 1992.
- KURAMAE-IZIOKA, E.E.; LOPES, C.R.; SOUZA, N.L.; MACHADO, M.A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 103: 323-329. 1997.
- LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum* in **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, volume 9: 291-339, 2001. Passo Fundo.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters** 98: 137- 143. 1992.
- MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARAITE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wilde native Mexican *Stylosanthes* spp. and taxonomic implications. **Mycology Research** 106 (5): 579-593. 2002.
- ROHLF, F.J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York Version v. 43: 282-287. 1951.
- SAHA, T.; KUMAR, A.; RAVINDRAN, M.; JACOB, C.K., ROY, B; NAZEER, M.A. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphism. **Mycology Research** 106 (2): 215-221. 2002.
- SILVA-MANN, R.; MACHADO, J. da C.; CARVALHO, K.C.S.; VIEIRA, M.G.C. Estudo da variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodão por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia brasileira**, 27 (1): 27-32, 2002.
- SREENIVASAPRASAD,S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. **Mycology Research** 98: 186-188. 1994.
- VALÉRIO, H.M.; RESENDE, M.A.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; CASELA, C.R. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. **Mycopathologia** 159: 449-459. 2005.
- WEEDS, P.L.; CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C.D.; CHARCHAR, M.J.d'A.; RAMESH, C.R.; KEXIAN,Y.; KELEMU, S. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. **Phytopathology** 93 (2): 176-185. 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises morfológicas, o teste de patogenicidade e a análise molecular foram eficientes na classificação e na caracterização da diversidade genética das espécies de *Colletotrichum* spp envolvidas com a Mancha da Gala no sul do Brasil. Foram observadas duas espécies de *Colletotrichum* envolvidas com a Mancha da Gala nos pomares do Sul do Brasil, sendo elas identificadas como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Fazendo-se um paralelo entre os grupos formados pela patogenicidade e os grupos formados pela análise molecular, a patogenicidade separou os isolados em três grupos, a molecular os separou em sete diferentes grupos. A principal diferença foi observada entre a maior divergência caracterizada pelo marcador RAPD nos isolados causadores de Podridão Amarga em frutos, divididos em três grupos.

A cultivar Gala apresenta grande suscetibilidade aos mais diferentes isolados das diferentes regiões produtoras de maçã, sendo que isolados das regiões de Campo Tenente, PR e Fraiburgo, SC apresentaram particularidades como resistência ao benomyl e lesões de mancha necrótica, respectivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho trazem importantes contribuições para os produtores de maçã no que diz respeito ao controle da doença, pois a correta classificação e o conhecimento apurado da etiologia das espécies envolvidas no patossistema são fundamentais para o estabelecimento de estratégias de controle e manejo.

A cultivar Fuji apresenta alta resistência ao *Colletotrichum*, importante fonte de resistência para estudos na área de biologia básica e avançada no que diz respeito à geração de subsídios para estudos relacionados a mecanismos de resistência, e para estudos de caracterização de proteínas traduzidas. Em estudos de genômica funcional, a cultivar Fuji por representar uma fonte de resistência confiável até então, representa um modelo para estudos de genes expressos induzidos e constitutivos para resistência a Mancha Foliar da Gala. Buscando com isto a incorporação destes genes em cultivares suscetíveis, como a cultivar Gala e suas mutações.

O patossistema *Colletotrichum* x *Malus domestica* ainda é complexo, sendo que trabalhos voltados à histologia da interação patógeno-hospedeiro, de estrutura

populacional através de uma amostragem mais ampla entre as regiões produtoras, busca da existência de raças através de cultivares diferenciadoras, até estudos utilizando marcadores moleculares que atuem no Dna ribossomal, fazem-se extremamente necessários para a melhor compreensão e posteriores avanços nos estudos e no controle da doença.