

Morgana Elis Lopes

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE  
*Colletotrichum* sp., AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM  
GOIABEIRA-SERRANA (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Morgana Elis

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*  
*sp.*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM GOIABEIRA-SERRANA  
(*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret. / Morgana Elis Lopes  
; orientador, Rubens Onofre Nodari ; co-orientador, Pedro  
Boff. - Florianópolis, SC, 2013.

110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Caracterização  
Morfológica . 3. *Colletotrichum sp.* 4. Antracnose. 5.  
goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). I. Nodari, Rubens  
Onofre. II. Boff, Pedro. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais. IV. Título.

Morgana Elis Lopes

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE  
*Colletotrichum* sp., AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM  
GOIABEIRA-SERRANA (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret.**

Dissertação julgada e aprovada em 08 de outubro de 2013, em sua forma final, pelo orientador e membros da banca orientadora, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Florianópolis, 08 de outubro de 2013.

---

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari  
Coordenador do PPGRGV

**Banca examinadora:**

---

Dr.<sup>a</sup> Eliane Rute de Andrade  
Externo/EPAGRI/SC

---

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup> Karine Louise dos Santos  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari  
Universidade Federal de Santa Catarina



Aos meus pais e irmãos, dedico.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, irmãos e sobrinhos por todo amor, afeto, compreensão, apoio e todas as inúmeras coisas que não caberiam em milhões de páginas. Agradeço infinitamente à vocês pelo simples fato de existirem e estarem na minha vida.

Agradeço, sem palavras, ao meu orientador Rubens Onofre Nodari, primeiramente pela honra de trabalhar com alguém que eu admiro e por aceitar enfrentar comigo todos os obstáculos. Muito obrigada ao meu co-orientador Pedro Boff pela ajuda, instrução, sabedoria e os e-mails mais motivadores do mundo. Muito obrigada ao professor Nelson Massola e sua equipe e ao Professor Robson por todo auxílio, disponibilidade e orientação. Ao professor Marciel pela ajuda e disponibilização de isolados.

Muito obrigada Gregório Lombardi por toda ajuda (esse trabalho é nosso). Obrigada Vanessa, Vinicius, Thiago, Lido, Fernando, Luciano, Leila, Ramon, Glauco, Monique, Hellen, Hugo, Antônio, Pâmela, Clarissa, Poliana (toda família Francescato), Diana, Liliana, Angelo, Karine, Juan, Roberta, Kelly e algumas outras pessoas do LFDGV, pela ajuda em vários momentos dessa caminhada.

Meu imenso obrigada aos membros do laboratório de fitopatologia (LABFITOP - UFSC), sem a ajuda de vocês nada disso teria sido possível. As Epagris, CAV, CAPES, CNPq, UFSC, CCA, LFDGV e todos os órgãos que tornaram esse trabalho possível.

Em 2,5 anos muitas pessoas passam pelas nossas vidas, mas apenas algumas tornam-se imensamente especiais. Independente do motivo razão ou circunstância meu muito obrigada Leilane, Stefan, Daniela, Murilo, Amanda, Gregório, Caroline Cristofolini, Dorival, Pablo, Alison (Beto), Kaká e Rafaela.

Muito obrigada a todos os professores o PPGRGV pelo aprendizado. Muito obrigada Berna por toda paciência e dedicação. Obrigada ao pessoal da Workout gym pela amizade e risadas diárias.

Muito obrigada a todos os meus amigos de Joinville e Canoinhas que felizmente são muitos e fazem parte de uma caminhada mais longa. Obrigada as minhas colegas de apartamento Mônica e Joelma por toda ajuda e compreensão.



Sê

Se não puderes ser um pinheiro no topo de uma colina.

Sê um arbusto no vale, mas sê o melhor arbusto à margem do regato.

Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.

Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva, e dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada, sê uma senda.

Se não puderes ser o sol, sê uma estrela.

Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso.

Mas sê o melhor no que quer que sejas.

Pablo Neruda



## RESUMO

A goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg) é uma frutífera pertencente à família das mirtáceas. Essa espécie está passando pelo processo de domesticação em seu centro de origem e diversidade. A antracnose é a principal doença da goiabeira-serrana no sul do Brasil e é causada pelo fungo *Colletotrichum* sp.. Este fungo pertence à classe dos *Coelomycetes* e se mostra como um dos principais fatores que limitam o cultivo de forma econômica dessa frutífera causando, em muitos casos, 100% de perda nos frutos de goiabeira-serrana. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo diagnosticar a ocorrência de antracnose (*Colletotrichum* sp.) e caracterizar seu agente causal em goiabeira-serrana, procedente de distintas regiões de ocorrência natural e de cultivo no sul do Brasil. Nesse sentido, foram realizadas as etapas dos postulados de Koch, os testes de especificidade e patogenicidade, as análises culturais e caracterizados o índice de crescimento micelial, bem como o formato e as dimensões de conídios e apressórios de 45 isolados de *Colletotrichum*. Com o cumprimento de todas as fases dos postulados de Koch foi possível confirmar a real ocorrência de antracnose nos frutos de goiabeira-serrana e também, através obtenção da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), verificar que os isolados de *Colletotrichum* apresentam diferentes níveis de patogenicidade, se comportam de maneira diferenciada de acordo com o a forma de inoculação e são capazes de infectar frutos de outras espécies (ex: macieira), mostrando que os mesmos não são patógenos específicos de goiabeira-serrana. O índice de crescimento micelial dos isolados variou de 5,1 mm/dia a 7,4 mm/dia. O comprimento (C) dos conídios variou de 13,7  $\mu\text{m}$  a 18,8  $\mu\text{m}$ , a largura (L) variou de 4,01  $\mu\text{m}$  a 5,62  $\mu\text{m}$  e a relação C/L dos mesmos variou de 2,5 a 4,1. A dimensão dos apressórios variou de 7,0  $\mu\text{m}$  a 18,6  $\mu\text{m}$  para comprimento, de 4,0  $\mu\text{m}$  a 7,9  $\mu\text{m}$  para largura e de 1,13 a 1,48 para relação C/L. Mesmo com a existência de uma grande zona de sobreposição dos valores para todas as características avaliadas, os dados encontrados se enquadram nos estimados para duas espécies do gênero *Colletotrichum*. Análises culturais como coloração, topografia, presença de setores, massa conidial, bem como formato e tamanho de conídios e apressório corroboraram com o enquadramento dos 45 isolados de *Colletotrichum* de goiabeira-serrana nos padrões estabelecidos para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*.



## ABSTRACT

The feijoa (*Acca sellowiana* Berg) is a fruit belonging to the Myrtaceae family. This species is in the process of domestication in its center of origin and diversity. Anthracnose is a major disease of feijoa in southern Brazil and is caused by the fungus *Colletotrichum* sp.. This is a fungus that belongs to the family of *Coelomycetes* and it is one of the main factors that limit the economic exploitation of this fruit by causing, in many cases, loss of 100 % in the goiabeira-serrana fruit production. Thus, this study aims to diagnose the occurrence of anthracnose (*Colletotrichum* sp.) and characterize its causal agent in feijoa, coming from different naturally occurring regions and cultivation in southern Brazil. Accordingly, it was applied the steps of Koch's postulates, tested the isolates specificity and pathogenicity, analyzed the cultural features and characterized the mycelial growth rate, as well as the shape and size of conidia and appressoria of 45 *Colletotrichum* isolates. With the completion of all phases of Koch's postulates it was possible to confirm the actual occurrence of anthracnose in feijoa fruits. By obtaining the area under the disease progress curve (AUDPC), it was verified that the *Colletotrichum* isolates presented different levels of pathogenicity, behaved differently according to the inoculation method and the same *Colletotrichum* isolates are able to infect fruit of other species, indicating that they are not feijoa pathogen-specific. The rate of mycelial growth of the isolates ranged from 5.1 mm/day to 7.4 mm/day. The length (L) of the conidia ranged from 13.7  $\mu\text{m}$  to 18.8  $\mu\text{m}$  in width (W) ranging from 4.01  $\mu\text{m}$  to 5.62  $\mu\text{m}$  and the ratio L/W of the same ranged from 2.5 to 4.1. The size of appressoria varied from 7.0  $\mu\text{m}$  to 18.6  $\mu\text{m}$  for length, from 4.0  $\mu\text{m}$  to 7.9  $\mu\text{m}$  for width and 1.13 to 1.48 for the L/W. Even with the existence of a large overlap region for values of the all evaluated traits, the data obtained suggests that the isolates do fit in the two species of the genus *Colletotrichum*. Cultural analyzes as colony colour, topography, presence of sectors, conidial mass, as well as format and size of conidia and appressoria corroborate to frame the 45 *Colletotrichum* isolates from feijoa to the standards established for *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa ilustrativo dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Números indicam os locais de coletas dos 45 isolados de <i>Colletotrichum</i> utilizados neste estudo.....	42
<b>Figura 2</b> – A) Lesão de <i>Colletotrichum</i> sp. em goiabeira-serrana, cujo tamanho e esporulação foram utilizadas para fins de caracterização. B) Secção do fruto separando a lesão ao meio para isolamento. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	45
<b>Figura 3</b> - Frutos de goiabeira-serrana sadios, contendo o inóculo de <i>Colletotrichum</i> sp. em concentração previamente calibrada. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	48
<b>Figura 4</b> - Frutos de goiabeira-serrana imersos em solução de hipoclorito 1%, durante 10 min. Foto: Morgana Elis Lopes .....	49
<b>Figura 5</b> - Frutos de Goiabeira-serrana inoculados com os métodos M1 e M2 e o controle (H <sub>2</sub> O). Foto: Morgana Elis Lopes .....	50
<b>Figura 6</b> - Imagens mostrando a diferença no diâmetro de crescimento entre dois isolados com 6 dias de incubação. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	55
<b>Figura 7</b> – Conídios de <i>Colletotrichum</i> sp. Isolados de frutos de goiabeira-serrana. Imagem captada pelo sistema vídeo câmera (Olympus® CH2), em um aumento de 40X. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	58
<b>Figura 8</b> - Imagem importada e utilizada para a realização das análises de comprimento e largura de conídios pelo programa ScopePhoto. ....	59
<b>Figura 9</b> – Apressórios de <i>Colletotrichum</i> sp isolados de frutos de goiabeira-serrana. Imagem captada pelo sistema vídeo câmera (Olympus® CH2), em um aumento de 40X. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	60

<b>Figura 10</b> - Imagem importada e utilizada para a realização das análises de comprimento e largura dos apressórios pelo Programa ScopePhoto.....	61
<b>Figura 11</b> - Lesão de antracnose encontrada nos frutos utilizados para a realização dos postulados de Koch. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	63
<b>Figura 12</b> - Frutos completamente acometidos após inoculação com os métodos M1 e M2 e frutos sadios do tratamento controle, feito com água (H <sub>2</sub> O). Foto: Morgana Elis Lopes .....	65
<b>Figura 13</b> - Fruto inoculado sem a existência das perfurações (a esquerda) e fruto inoculado na presença de perfurações (direita). Foto: Morgana Elis Lopes. ....	66
<b>Figura 14</b> - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores métodos de inoculação ( presença ou ausência de perfurações) e diferentes acessos de goiabeira-serrana. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de perfurações, no mesmo acesso, e maiúscula referente a resposta dos quatro acessos à presença ou ausência de perfurações nos frutos. ....	69
<b>Figura 15</b> - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes isolados. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de perfurações, no mesmo acesso, e maiúscula referente a resposta dos três acessos à presença ou ausência de perfurações nos frutos de goiabeira (Psidium guajava). ....	72
<b>Figura 16</b> - Fruto de macieira da variedade fuji inoculado com a existência das perfurações (a esquerda) e fruto de macieira da variedade	

gala inoculado com a presença de perfurações (a direita), no mesmo intervalo de tempo. Foto: Morgana Elis Lopes. .... 74

**Figura 17** - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores presença ou ausência de lesão e variedades de maçã. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de lesão e maiúscula referente a resposta das duas variedades à presença ou ausência de lesão. .... 74

**Figura 18** - Reação de frutos de macieira inoculados com *Colletotrichum* sp após duas semanas de incubação. A e B - inoculados sem a existência de perfurações. C e D - inoculados com a presença de perfurações. Foto: Morgana Elis Lopes. .... 75

**Figura 19** - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores presença ou ausência de lesão e isolados de *Colletotrichum*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de lesão e maiúscula referente a resposta dos três isolados à presença ou ausência de lesão. .... 75

**Figura 20** - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores variedades Fuji e Gala, presença ou ausência de lesão e isolados de *Colletotrichum*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator variedades de maçã para a mesma condição de inoculação e maiúscula referente a resposta de cada variedade de macieira aos três isolados e aos métodos de inoculação. .... 76

**Figura 21** - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores variedades Fuji e Gala, presença ou ausência de lesão e isolados de *Colletotrichum*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator variedades de maçã para a mesma

condição de inoculação e maiúscula referente a resposta de cada variedade de macieira aos três isolados e aos métodos de inoculação. .... / /	
<b>Figura 22</b> – Colônia micelial de dois isolados com o mesmo tempo de incubação. (A) - VCR e (B) URU 1. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	80
<b>Figura 23</b> - Padrões de micélio aéreo: (A) Alto, (B) Intermediário e (C) Baixo, encontrados respectivamente nos isolados LGS 2, FRB 2 e FRB 6. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	86
<b>Figura 24</b> - Setor formado no isolado SJQ 3: (A) - Setor na parte superior da placa de petri e (B) - Setor no reverso da placa de petri. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	87
<b>Figura 25</b> - Massa conidial (na cor laranja) visível no reverso e na parte superior da colônia, no isolado URU 2. Foto: Morgana Elis Lopes. ....	88
<b>Figura 26</b> - Formatos de conídios propostos por Sutton (1998). (A) conídios fusiformes e com extremidades afiladas e (B) conídios cilíndricos com extremidade arredondada. Fonte: Sutton (1998) .....	94
<b>Figura 27</b> - (A) Presença conídios cilíndricos do isolado SJQ 1 e (B) Presença de conídios cilíndricos e fusiformes do isolado PSM 3. ....	94
<b>Figura 28</b> - Formato dos apressórios propostos por Sutton (1998). (A) Apressório clavado, (B) Apressório globoso e (C) apressório irregular. Fonte: Sutton (1998). ....	100
<b>Figura 29</b> - Formato dos apressórios (A) Apressório clavado, (B) Apressório globoso e (C) apressório irregular, presentes no isolado FRB7. Foto Morgana Lopes. ....	101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Identificação dos isolados, localidade, estado de procedência e em qual tipo de vegetação o fruto coletado se encontrava. ....	42
<b>Tabela 2</b> - Padrões para análise de topografia e coloração das colônias. Padrões utilizados pelo grupo de pesquisa do gênero <i>Colletotrichum</i> da Universidade de São Paulo.....	56
<b>Tabela 3</b> - Resumo da análise da variância, para os fatores progresso da doença em frutos de goiabeira-serrana com e sem perfurações, progresso da doença nos quatro acessos de goiabeira-serrana, e diferença de patogenicidade dos dois isolados (FRB 6 e SJQ 6).....	67
<b>Tabela 4</b> - Resumo da análise da variância, para os fatores progresso da doença em frutos de goiabeira ( <i>Psidium guajava</i> ) com e sem perfuração e progresso da doença nos três isolados de <i>Colletotrichum</i> . ....	71
<b>Tabela 5</b> - Resumo da análise da variância, para os fatores progresso da doença em frutos de macieira ( <i>Malus domestica</i> ) com e sem lesão, progresso da doença nas variedades de maçã fuji e gala, e diferença de patogenicidade dos 3 isolados (VCR, LGS 2 e SJC).....	73
<b>Tabela 6</b> - Resumo da análise da variância para índice de crescimento micelial de 45 isolados, de <i>Colletotrichum</i> sp. repicados em meio BDA. ....	79
<b>Tabela 7</b> - Índice de crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. isolados de goiabeira-serrana e inoculados em meio BDA. ....	80
<b>Tabela 8</b> - Padrões de topografia, cor do micélio aéreo, cor do reverso da colônia, presença/ausência de setores e cor de massa conidial, encontrados nos 45 isolados analisados .....	83

<b>Tabela 9</b> - Resumo da análise da variância para as variáveis comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios dos 45 isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. em goiabeira-serrana.....	89
<b>Tabela 10</b> - Teste de separação de médias para comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) dos conídios de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em goiabeira-serrana.....	90
<b>Tabela 11</b> - Índice (%) de ocorrência de cada formato de apressório encontrado nos 45 isolados. ....	95
<b>Tabela 12</b> - Resumo da análise da variância para comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) de apressório dos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de goiabeira-serrana.....	97
<b>Tabela 13</b> - Teste de separação de médias para comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) dos apressórios de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. em goiabeira-serrana.....	97
<b>Tabela 14</b> - Índice (%) de ocorrência de cada formato de apressório encontrado nos 45 isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. de goiabeira-serrana. ....	102

## TERMOS E ABREVIATURAS

**B.O.D** - Incubadora com temperatura controlada e fotoperíodo;

**SC** - Santa Catarina

**RS** - Rio Grande do Sul

**atm** - atmosfera

**BDA** - Batata Dextrose Ágar

**g/l** - gramas por litro

**ml** - mililitros

**µl** - microlitros

**mm** - milímetros

**H<sub>2</sub>O** - água

**cm** - centímetros

**µm** - micrometros

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**USP** - Universidade de São Paulo

**ICM** - Índice de Crescimento Micelial

Siglas utilizadas para os locais de procedência dos frutos:

**FRB1** - Isolado 01 da localidade de Fraiburgo

**FRB2** - Isolado 02 da localidade de Fraiburgo

**FRB3** - Isolado 03 da localidade de Fraiburgo

**FRB4** - Isolado 04 da localidade de Fraiburgo

**FRB5** - Isolado 05 da localidade de Fraiburgo

**FRB6** - Isolado 06 da localidade de Fraiburgo

**FRB7** - Isolado 07 da localidade de Fraiburgo

**LGS1** - Isolado 01 da localidade de Lages

**LGS2** - Isolado 02 da localidade de Lages  
**LGS3** - Isolado 03 da localidade de Lages  
**LGS4** - Isolado 04 da localidade de Lages  
**LGS5** - Isolado 05 da localidade de Lages  
**LAM** - Isolado da localidade de Lages - localidade de lambedor  
**SJQ1** - Isolado 01 da localidade de São Joaquim  
**SJQ2** - Isolado 02 da localidade de São Joaquim  
**SJQ3** - Isolado 03 da localidade de São Joaquim  
**SJQ4** - Isolado 04 da localidade de São Joaquim  
**SJQ5** - Isolado 05 da localidade de São Joaquim  
**SJQ6** - Isolado 06 da localidade de São Joaquim  
**SJQ7** - Isolado 07 da localidade de São Joaquim  
**SJQ8** - Isolado 08 da localidade de São Joaquim  
**CUT1** - Isolado 01 da localidade de Curitiba  
**CUT2** - Isolado 02 da localidade de Curitiba  
**URU1** - Isolado 01 da localidade de Urubici  
**URU2** - Isolado 02 da localidade de Urubici  
**UPM** - Isolado da localidade de Urupema  
**PSM1** - Isolado 01 da localidade de Passos Maia  
**PSM2** - Isolado 02 da localidade de Passos Maia  
**PSM3** - Isolado 03 da localidade de Passos Maia  
**PSM4** - Isolado 04 da localidade de Passos Maia  
**PSM5** - Isolado 05 da localidade de Passos Maia  
**PSM6** - Isolado 06 da localidade de Passos Maia  
**CMB** - Isolado da localidade de Cambará do Sul  
**SMC** - Isolado da localidade de São Marcos  
**MFR** - Isolado da localidade de Mafra

**ITU** - Isolado da localidade de Ituporanga

**SJC** - Isolado da localidade de São José do Cerrito

**RQM** - Isolado da localidade de Rancho Queimado

**ALZ** - Isolado da localidade de Abelardo Luz

**IPE1** - Isolado 01 da localidade de Ipê

**IPE2** - Isolado 02 da localidade de Ipê

**PNL** - Isolado da localidade de Paineira

**VCR** - Isolado da localidade de Passos Maia

**SND** - Isolado da localidade de Sananduva

**VSG** - Isolado da localidade de Água doce



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
2.1. OBJETIVO GERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	31
3.1. <i>Acca sellowiana</i> .....	31
3.2. O GÊNERO <i>Colletotrichum</i> .....	33
3.3. SINTOMATOLOGIA E INFECÇÃO.....	34
3.3.1. Epidemiologia.....	35
3.3.2. <i>Colletotrichum</i> sp. em goiabeira-serrana.....	36
3.3.3. Diferenciação de espécies de <i>Colletotrichum</i> sp. ....	36
3.3.4. Patogenicidade.....	38
3.3.5. Especificidade.....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	41
4.2. ESTABELECIMENTO DO PATÓGENO EM MEIO DE CULTURA .....	44
4.3. ISOLAMENTO MONOSPÓRICO .....	45
4.4. POSTULADOS DE KOCH.....	46
4.5. PATOGENICIDADE .....	51
4.6. ESPECIFICIDADE .....	51
<b>5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA</b> .....	55
5.1. ÍNDICE DE CRESCIMENTO MICELIAL .....	55
5.2. CARACTERÍSTICAS CULTURAIS .....	56
5.3. FORMATO E TAMANHO DOS CONÍDIOS .....	57

5.4. TAMANHO E FORMATO DOS APRESSÓRIOS .....	59
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
6.1. TESTE DE PATOGENICIDADE (POSTULADOS DE KOCH).....	63
6.2. ESPECIFICIDADE .....	70
6.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	78
6.3.1 Índice de crescimento micelial .....	78
6.3.2 Características culturais.....	83
6.3.3. Comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios .....	89
6.3.4.Formato dos conídios .....	93
6.3.5. Comprimento, largura e relação comprimento/largura de apressórios.....	97
6.3.6. Formato dos apressórios.....	100
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>106</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

*Acca sellowiana* Berg. é uma espécie frutífera que pertence à família das mirtáceas. Trata-se de uma planta herbácea nativa do planalto meridional brasileiro e do Uruguai, comumente chamada de goiabeira-serrana (Brasil), guayabo-del-país (Uruguai), guayaba-goiabeira-serrana (Colômbia) ou goiabeira-serrana (outros países); contudo, assemelha-se somente ao tamanho e a forma da goiaba comum. A goiabeira-serrana está passando pelo processo de domesticação em seu centro de origem e diversidade, já existindo pomares comerciais em localidades que apresentam características condizentes com as suas exigências de elevadas altitudes e baixas temperaturas (DUCROQUET et al., 2000).

As características inerentes ao fruto da goiabeira-serrana são polpa cor de gelo, sabor doce, podendo variar de levemente ácido a ácido com aroma marcante (DUCROQUET et al., 2000). O sabor único tem sido um apelo para o mercado, pois os frutos produzidos em plantios comerciais principalmente na Nova Zelândia e Colômbia são destinados majoritariamente a exportação para países europeus e o Brasil, entre outros.

Com o avanço das pesquisas também tem aumentado a produção de frutos aqui no Brasil. Assim, agricultores da região de Ipê no Rio Grande do Sul e da região de São Joaquim já comercializam suas produções tanto em feiras agroecológicas ou orgânicas ou mesmo em supermercados. Contudo, tratando-se de uma espécie nativa e com alto potencial comercial, a produção é ainda muito baixa e pode aumentar significativamente.

Para que o plantio, cultivo e disseminação comercial da goiabeira-serrana sejam economicamente viáveis, algumas de suas características fisiológicas e sanitárias precisam ser analisadas e melhoradas (DEGENHARDT et al., 2001). Para Andrade & Ducroquet (1996), a antracnose é a principal doença da goiabeira-serrana no sul do Brasil e é causada pelo fungo *Colletotrichum* sp.. Este fungo pertence à classe dos Coelomycetes, e causa nos frutos de *Acca sellowiana* os sintomas característicos de mancha depressiva, necrose, muitas vezes esporulação rósea no centro da lesão e em estágio mais avançado causa o tombamento de plântulas e 100% de perda nos frutos (DEGENHARDT et al., 2001).

Isolados de *Colletotrichum* associados ao fruto de goiabeira-serrana têm sido identificados e descritos, sendo a classificação, o mapeamento cultural e a análise morfológica o início desse processo de conhecimento da relação entre a planta o patógeno e o ambiente. A análise morfológica juntamente com a taxonômica e molecular levam ao conhecimento das possíveis subespécies, os biótipos ou as raças que fazem parte das espécies desse gênero, encontrando-se assim o que se chama de nome do patógeno (JOHNSTON et al., 1997).

Apesar dos inúmeros esforços de pesquisadores e cientistas, nacionais e internacionais, em produzir conhecimento sobre os recursos vegetais, existem importantes lacunas a serem preenchidas nas áreas de caracterização genética e fenotípica das variadas espécies, assim, como no entendimento das diferentes relações culturais e econômicas associadas a seus sistemas produtivos. O preenchimento dessas lacunas pode colaborar para o estabelecimento de plátios à nível comercial, beneficiando tanto os produtores nas regiões rurais, como os consumidores nos centros urbanos, que passam a ter a possibilidade de acessar melhores e mais diversos alimentos. É o caso da *Acca sellowiana* e da sua problemática com as doenças que a acometem.

Nesse contexto, percebe-se a importância da realização dos postulados de Koch para a confirmação da presença de *Colletotrichum* sp. em goiabeira-serrana. Outra análise importante a ser realizada é a caracterização morfofisiológica, uma vez que o encontro de uma ou mais espécies de fungos que atacam o fruto proporcionará o suporte necessário para as análises genéticas que serão feitas posteriormente. Adicionalmente, tais estudos, possibilitarão o avanço no conhecimento científico necessário às práticas de manejo de doenças adequado para o cultivo comercial da espécie.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Diagnosticar a ocorrência de antracnose (*Colletotrichum* sp.), caracterizar morfológicamente seu agente causal em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*), procedente de distintas regiões de ocorrência natural e de cultivo no sul do Brasil.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer, em meio de cultura, isolados de *Colletotrichum* sp. *in vitro* oriundos de pomares e/ou áreas de ocorrência natural da goiabeira-serrana na região sul do Brasil;
- Caracterizar a diversidade morfológica de isolados do agente causal da antracnose;
- Analisar a patogenicidade do agente etiológico da antracnose em goiabeira-serrana, através da realização dos postulados de Koch;
- Analisar a especificidade do patógeno, através da realização de inoculações cruzadas em outras espécies frutíferas.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. *Acca sellowiana*

Dentro das múltiplas espécies promissoras presentes ou originárias da América do Sul, destaca-se a chamada goiabeira-serrana ou goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg), pertencente à família das mirtáceas e que se distingue por produzir um fruto comestível de delicado e suave sabor, com expressivo potencial organoléptico (DUCROQUET et al., 2000), nutricional e com grandes possibilidades para seu processamento e transformação (KINUPP e BARROS, 2008; CAMACHO, 2003; DUCROQUET et al., 2000). Também foram registrados usos na área da farmacêutica, como fontes de flavonóides com propriedades anticancerígenas (BONTEMPO et al., 2007; LAPCIK et al., 2005) e uso como planta ornamental em programas de paisagismo (BRAUN e PETRY, 2007; SAZIMA e SAZIMA, 2007). Apesar destas características e possibilidades os plantios comerciais ainda são escassos, o que significa que se trata de uma fruta com potencial para produção e processamento (ZURITA, 2003), especialmente naqueles países que apresentam as condições agroecológicas e geográficas condizente com o estabelecimento de plantações, como é o caso da Colômbia (FISCHER, 2003) e do Brasil (DUCROQUET et al., 2000).

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, popularmente chamada de goiabeira-serrana, goiabeira da serra, goiabeira do mato ou goiabeira-serrana. O centro de origem dessa espécie está localizado no sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Norte da Argentina (MATTOS, 1986). Segundo a classificação botânica essa frutífera é um arbusto que possui folhas persistentes e dificilmente ultrapassa a altura de 6 metros, com fuste ramificado, especialmente quando encontrada em campo aberto (DUCROQUET et al., 2000). Possui algumas exigências climáticas do ambiente em que está inserida, uma vez que esta se desenvolve, preferencialmente, em altitudes superiores a 1000m e baixas temperaturas resistindo a temperaturas de até -12,6°C e florescendo quando a probabilidade de geada diminui (DUCROQUET et al., 2000). Entra em produção a partir do quarto ano, é uma espécie hermafrodita predominantemente alógama e que mostra certa dificuldade à ocorrência de auto-

fecundação, o estigma torna-se receptivo 24 horas antes da deiscência das anteras, o que indica tendência à dicogamia por protoginia. Apresenta crescimento lento e vistosa floração, esse que com a característica discolor da sua folhagem faz com que a goiabeira-serrada apresente potencial ornamental, podendo também ser utilizada em reflorestamentos (DUCROQUET & RIBEIRO, 1991; LEGRAND & KLEIN, 1997).

Os frutos dessa espécie são classificados como bagas, possuem grande potencial organoléptico e chegam a pesar 250 g. Estes possuem tamanho e forma semelhantes à goiaba comum (*Psidium guajava*), contudo possuem polpa cor gelo, sabor doce-acidulado, aroma suave mas marcante (DUCROQUET & RIBEIRO, 1991) sendo que, a qualidade do aroma está relacionada à produção de etilbutirato, metil e etilbenzoato, além de aldeídos aromáticos. Esse fruto também é rico em iodo (3mg/100mg), o teor de vitamina C da polpa é aproximadamente 35 mg/100 mg comparável ao da laranja (DUCROQUET et al., 2000). Segundo Morton 1987, os valores de alguns minerais encontrados nos frutos por 100 g de polpa são: potássio – 166 mg; sódio – 5 mg; cálcio – 4 mg; magnésio – 8 mg; fósforo – 10 mg e ferro – 0,05 mg. (SEIDEMANN, 1994). A goiabeira-serrana já é conhecida mundialmente, tendo sido introduzida no continente Europeu por volta de 1890. Hoje a goiabeira-serrana é plantada também nos Estados Unidos (400 ha), Colômbia e nas ex-repúblicas soviéticas da região do Cáucaso. Mas, foi na Nova Zelândia que a pesquisa da espécie tomou impulso mesmo com a sua área plantada sendo relativamente modesta (350 ha) (BARNI et al., 2004). No entanto o principal país produtor é a Colômbia, que exporta o fruto para diversos outros países.

Frutos de goiabeira-serrana de populações uruguaias são as que possuem os frutos com casca mais fina. A inexistência de variedades adaptadas e competitivas comercialmente no Brasil foi o fator que motivou o desenvolvimento e processo de domesticação e melhoramento dessa espécie, no Brasil e Uruguai. Assim teve início o levantamento e coleta da diversidade existente no Estado de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná (DUCROQUET & RIBEIRO, 1991). A implantação, posteriormente, de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) vem proporcionando a sua conservação, como também o avanço no conhecimento científico e a manutenção da diversidade genética.

Outro objetivo importante que impulsiona as pesquisas com *Acca sellowiana* é a tentativa de melhoria de suas características sem perder a sua rusticidade natural principalmente quanto aos frutos. Contudo, a

análise inicial da diversidade genética existente, mostra que é grande a possibilidade de sucesso com relação às expectativas de melhoramento genético, micropropagação, adaptabilidade, controle de doenças e pragas, caracterização genética de populações, biologia reprodutiva, conservação de germoplasma e armazenamento de frutos (NODARI, 1998).

Assim percebe-se que o Brasil possui uma grande vantagem com relação aos outros países que pesquisam e cultivam a goiabeira-serrana, devido ao fácil acesso a bancos de coleta de germoplasma e toda a sua gama de biodiversidade (DUCROQUET et al., 2000). Portanto, estudar essa espécie e contribuir para sanar as dúvidas que são obstáculos ao seu amplo desenvolvimento comercial é imensamente importante. A diversificação agrícola por meio da goiabeira-serrana pode ser mais uma alternativa de fonte de renda e bem estar para os agricultores do sul do Brasil.

### 3.2. 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). O gênero encontra-se na divisão *Deuteromycota*, classificado portanto como fungo verdadeiro, e inclui cerca de 900 espécies atualmente já descritas (SUTTON, 1992).

A gama de hospedeiros é também bastante ampla, incluindo mais de uma centena de angiospermas, sendo uma das doenças de maior importância em plantas cultivadas, especialmente em hortícolas, principalmente solanáceas. Em algumas espécies houve a especialização para determinados grupos de hospedeiros, como frutíferas e gramíneas forrageiras.

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. 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). 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.

### 3.3. SINTOMATOLOGIA E INFECÇÃO

Os sintomas da doença são bastante característicos e atingem a parte aérea das plantas, com sintomas e sinais nas folhas, flores e frutos. Nas folhas apresentam-se como lesões irregulares no limbo ou nas nervuras, as quais são inicialmente pardo-escurecidas e posteriormente esbranquiçadas no centro e com pontuações escuras e salientes (LOPEZ & PEREIRA, 2010). Nos frutos as lesões mostram-se inicialmente como manchas pequenas, deprimidas, arredondadas e de coloração clara. Estas manchas aumentam de tamanho, em estágios mais severos da doença, chagando em média a 3 cm de diâmetro e se estendem para regiões mais profundas, cobertas por uma massa mucilaginosa de esporos. Quando ocorre grande número de lesões em locais próximos, estas coalescem, provocam podridão generalizada e tornam-se enegrecidas, devido ao crescimento de outros organismos saprofíticos (VIDA et al., 2006).

Os danos envolvem desde o prejuízo no crescimento da planta, até lesões nos produtos comerciais, especialmente quando o patógeno encontra-se na forma latente, manifestando-se somente após a colheita e transporte, desvalorizando os produtos e causando prejuízos para consumidores e comerciantes. Em condições favoráveis e sem tratamentos químicos, as perdas relatadas estão entre 70 a 80% em cafeeiro (PEREIRA et al., 2009), 40% em bananeira (CORDEIRO; MATOS & KIMATI, 2005) e podem chegar até 100% em solanáceas e goiabeira (KUROZAWA & PAVAN, 1997).

A forma de infecção inicial se dá de maneira semelhante para todas as espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo maiores as diferenças depois de ocorrer a penetração, quando duas principais estratégias de infecção poderão se dar. Inicialmente ocorre a adesão do conídio à cutícula e a produção do tubo germinativo, que posteriormente diferencia-se em apressório. Estruturas de penetração emergem da base deste e penetram diretamente a cutícula, porém há relatos sobre a

ocorrência de penetração indireta, através do estômato ou de ferimentos, sem a formação de apressório.

Depois de ocorrida a penetração, algumas espécies alternam uma fase biotrófica, associada a formação de grandes hifas no meio intracelular, com outra fase necrotrófica altamente destrutiva, com a produção de estreitas hifas secundárias que se ramificam ao longo do tecido do hospedeiro. Esta se constitui em uma das principais estratégias infectivas adotadas por algumas espécies do gênero *Colletotrichum* sp. Neste processo, 24 hs após a penetração, a célula do hospedeiro perde completamente a sua integridade funcional e começa a deteriorar-se.

A segunda estratégia de infecção se dá pela penetração do patógeno na cutícula, mas não entrada imediata no lúmen da célula e sim desenvolvimento abaixo da cutícula. Nos primeiros estágios de penetração, há o desenvolvimento entre as paredes das células epidérmicas e do hospedeiro, sua turgência e dissolução. Somente mais tarde, penetram nas células, espalhando-se rapidamente pelo tecido, tanto dentro quanto fora das células, matando-as e dissolvendo sua parede. Esse tipo de estratégia de infecção não é associada à produção de micélios primários e secundários morfologicamente diferentes (O'CONNEL et al.,2000).

### **3.3.1. Epidemiologia**

Na busca por um controle mais racional e eficiente da doença, o conhecimento de sua epidemiologia se faz essencial, especialmente no emprego de técnicas de manejo integrado. Como o fungo permanece na forma latente no tecido do hospedeiro, mesmo após a colheita, a observância de seu comportamento e a busca por condições desfavoráveis ao patógeno deve estender-se por todos os patamares da cadeia produtiva.

Tschoeke (2001) relata que fatores como temperatura, umidade, luz, competição com a microflora, precipitação e principalmente o período de duração do molhamento da superfície das folhas têm alta relação com a dispersão do patógeno, germinação, infecção e desenvolvimento de *Colletotrichum* em hospedeiros tropicais.

Sabe-se que temperaturas mais elevadas, em torno de 25°C, favorecem a diferença de patogenicidade dos isolados e

umenta a taxa crescimento do fungo (PESSOA et al.,2007). Já a alta umidade favorece a esporulação e germinação dos conídios. Esses, por meio de gotículas de chuva conseguem facilmente dispersar-se para plantas saudáveis, dependendo da densidade de plantio geometria da planta hospedeira. Se a precipitação for constante, aumentará o período de molhamento foliar, ou seja, prolongar-se-á o tempo em que as condições ambientais estarão mais favoráveis ao patógeno.

### **3.3.2. Colletotrichum sp. em goiabeira-serrana**

A antracnose provocada por *Colletotrichum* spp. é uma das principais doenças de pós-colheita que afetam a cultura. Os sintomas caracterizam-se inicialmente por áreas de formato mais ou menos circulares e de coloração escura, surgindo nas frutas manchas circulares de coloração marrom, que se ampliam e tornam-se deprimidas, com o desenvolvimento de uma esporulação rosada no interior da depressão, sob condições de alta temperatura e umidade (PICCININ et al., 2005). Em goiabeira-serrana já foi constatada alta incidência de plantas com seca de ramos e podridão de frutos provocada possivelmente por *Colletotrichum gloeosporioides*, inviabilizando a produção econômica dessa frutífera, pois em algumas plantas, praticamente todos os ramos estavam comprometidos (HELLWING & UENO, 2009).

Os tratamentos com indutores de resistência e a termoterapia têm a vantagem de serem livres de resíduo e não oferecem risco a saúde humana e ao meio ambiente, podendo ser mais uma ferramenta do controle integrado desta doença na cultura (PESSOA et al.,2007). Estes tratamentos se fazem muito importantes para preservação da viabilidade dos frutos e conservação de características comerciais, especialmente para goiabeira, que é muito sensível aos danos provocados pelo frio, não sendo recomendada para armazenamento em temperaturas abaixo de 5°C (HOFFMANN et al.,1994).

### **3.3.3. Diferenciação de espécies de Colletotrichum sp.**

*Colletotrichum gloeosporioides* é uma das espécies mais frequentes e agressivas para diversos hospedeiros taxonomicamente distintos (PONTE, 1996), e é muito conhecida por provocar lesões quiescentes em frutos como mamão, goiaba e maracujá. Sua

diferenciação geralmente se dá por características morfológicas de estruturas como conídios e apressório. Góes & Kimati (1997) conseguiram discriminar *Colletotrichum gloeosporioides* de *Colletotrichum acutatum*, causadores da queda prematura de frutos pelo apressório predominantemente lobulado e conídios de maiores tamanhos de *Colletotrichum gloeosporioides*.

A diferenciação também pode ser feita através de características fisiológicas, por exemplo, pela observância de diferentes níveis de resistência a fungicidas. *Colletotrichum gloeosporioides* tem sido relatado como mais sensível a benomyl, captan e propiconazole, e menos sensível a myclobutanil e tebuconazole do que a espécie *Colletotrichum acutatum* (VINNERE, 2004).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a um determinado hospedeiro propicia uma melhor compreensão da epidemiologia da doença e faz-se uma etapa fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle. Neste contexto mostram-se as técnicas de biologia molecular importantes ferramentas no estudo da taxonomia de fungos fitopatogênicos. Com o advento destes métodos, aliadas às morfológicas e fisiológicas, entre outras, a identificação e caracterização do patógeno pode se dar de maneira muito mais precisa e conclusiva.

Há ferramentas clássicas da fitopatologia e da genética que podem ser utilizadas visando a identificação do agente etiológico, bem como da diversidade genética existente entre as possíveis raças ou isolados. Assim, os postulados de Koch além de um conjunto de análises morfofisiológicas poderão resolver esta lacuna científica. Adicionalmente, os avanços recentes no desenvolvimento de marcadores moleculares como ITS (WHITE et al., 1990; TAPIA-Tussell, 2008; PILEGGE et al., 2009), ISSR (FREEMAN et al., 1998, RATANACHERDCHAI et al., 2010), RAPD (TALAMINI et al., 2006) e microssatélites (RANATHUNGE et al., 2009) para distintas espécies do gênero, podem ser utilizados para iniciar os estudos de variabilidade genética no agente etiológico causador da antracnose em goiabeira-serrana. Em particular estão disponíveis para transferência 27 pares de iniciadores microssatélites que representam locos simples e que produzem 139 alelos em *C. capsici*.

Além do uso das regiões ITS para a discriminação de espécies do gênero *Colletotrichum*, regiões como a GPDH tem sido também utilizadas neste tipo de estudo e distinção dos complexos estudados. Nesse caso o iniciador *forward* GDF (5'-GCCGTCACGACCCCTTCATTGA-3') e o iniciador *reverse* GDR (5'-GGGTGGAGTCGACTTGAGCATGT-3') anelam-se a regiões codificadoras do gene G3PD (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) promovendo a amplificação de produtos úteis para a diferenciação de espécies ou complexos de espécies do gênero *Colletotrichum* (PERES et al., 2004). O gene calmodulin, através do par de primers CL1 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC e CL2A 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC, também têm sido amplificado e utilizado na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (O'DONNELL, 2000). Essas três regiões estão entre as mais indicadas para a caracterização molecular de fungos fitopatogênicos.

### 3.3.4. Patogenicidade

Patógeno é qualquer organismo capaz de causar doença infecciosa em plantas, ou seja, fungos, bactérias, vírus, viróides, nematóides e protozoários. Patogenicidade é a capacidade que um patógeno possui, de associando-se ao hospedeiro, causar doença (AMORIM, 1995). Plantas acometidas por microrganismos não possuem, necessariamente, características, sinais e sintomas que evidenciem o agente causal da doença, sendo assim, testes são realizados para confirmar ou descartar o patógeno como agente causal da doença e, para tanto, realizam-se testes de patogenicidade (AGRIOS, 2004).

A relação doença, patógeno e planta só pode ser confirmada com a realização de uma sequência de processos que se denomina Postulados de Koch, desenvolvidos por Robert Koch (1881) sendo inicialmente estabelecido para doenças em seres humanos e adequadas para plantas no que se conhece, hoje, como teste de patogenicidade (AMORIM, 1995). Assim, a maneira mais adequada de relacionar o agente causador com o sintoma de uma doença é aplicar a metodologia proposta por Koch.

O gênero *Colletotrichum* tem sido amplamente ligado a grandes perdas em diversas culturas agrícolas, mesmo que os sintomas apresentados por esses patógenos sejam bastante característicos, suspeitas acerca da sua presença, como agente causal, bem como da sua

patogenicidade só podem ser levantadas após testes e bioensaios fitopatológicos.

O pouco conhecimento sobre etiologia, especiação, patogenicidade e outros fatores acerca do patógeno que causa antracnose em goiabeira-serrana, justifica a necessidade da realização de estudos que esclareçam quanto ao agente causal desta doença na goiabeira-serrana. A realização de testes de patogenicidade está diretamente ligado ao conhecimento de características do patógeno que visam estabelecer condições para a realização de programas de controle da doença, resistência da planta e melhoramento genético (AMORIM, 1995).

### 3.3.5. Especificidade

Muito tem se falado sobre a associação de fungos às plantas, um dos casos mais conhecidos diz respeito às micorrizas. Essa relação é resultante da união das raízes com o micélio de fungos, que tem por sua vez a função de colaborar na nutrição e desenvolvimento da planta (SOUZA et al., 2006). Nem todas as associações, contudo, são benéficas à planta ocorrendo muitas vezes perdas produtivas ou mesmo a morte do vegetal. Nesse caso a relação planta - fungo é dita fitopatogênica. A especificidade de alguns microrganismos pode ser com relação a órgãos de acometimento, ou seja, alguns patógenos são específicos de sementes, folhas, frutos, raízes, ou solo, entre outros. Em outros casos a especificidade ou generalidade pode ser referente a espécies ou cultivares de plantas (MAGALHÃES et al., 2008). Fungos que são específicos de alguma espécie de planta são denominados *Formae speciales*. Estes, bem como raças de fungos que se mostram específicos, costumam causar danos graves ao seu hospedeiro, mas ser totalmente não patogênico para outras espécies.

O conhecimento de características do patógeno bem como sua especificidade se mostra importante para o estabelecimento de práticas culturais, manejo e controle da doença (AGRIOS, 2004). Fungos que possuem uma alta gama de hospedeiros costumam apresentar maiores dificuldades de controle. Fungos do gênero *Fusarium* se mostram bastantes específicos como, por exemplo, *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense que causa a murcha da banana.

Fungos do gênero *Colletotrichum* costumam causar níveis variáveis, mas incontestáveis, de danos e perdas às espécies vegetais que acometem. O conhecimento do nível de patogenicidade, gama de hospedeiro e abrangência de ataque é bastante importante em fungos considerados bastante patogênicos, como é o caso dos microrganismos do gênero *Colletotrichum*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Frutos de goiabeira-serrana contendo lesões de *Colletotrichum* sp. foram coletados de frutos proveniente de plantas de ocorrência no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (Figura 1), totalizando 45 acessos de diversas localidades (Tabela 1). Os frutos foram, na sua maioria, coletados do chão e escolhidos de acordo com o tamanho da lesão e nível de esporulação (Figura 2A). O tamanho utilizado como ideal foram aqueles com aproximadamente 3 cm de diâmetro, os frutos coletados não seguiram metodologia específica, contudo deveriam apresentar lesão característica de antracnose e não estar em estágio muito avançado de deteriorização. Os frutos, quando necessário, foram colocados em recipientes contendo papéis umedecidos a uma temperatura de 24°C, em B.O.D, para a obtenção de câmara úmida. Esta etapa durou de 2 a 3 dias em média, dependendo da resposta das lesões. Esse mecanismo foi utilizado para que todas as lesões alcancem um nível adequado, para fins de caracterização, e uniforme de esporulação (Figura 2A). Após a incubação em câmara úmida, os frutos puderam ser manuseados e, conseqüentemente, o fungo isolado.



Figura 1 - Mapa ilustrativo dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Números indicam os locais de coletas dos 45 isolados de *Colletotrichum* utilizados neste estudo.

Tabela 1 - Identificação dos isolados, localidade, estado de procedência e em qual tipo de vegetação o fruto coletado se encontrava.

ISOLADOS	LOCALIDADE	ESTADO	TIPO DE VEGETAÇÃO
FRB1	Fraiburgo	SC	Pomar
FRB2	Fraiburgo	SC	Pomar
FRB3	Fraiburgo	SC	Pomar
FRB4	Fraiburgo	SC	Pomar
FRB5	Fraiburgo	SC	Pomar
FRB6	Fraiburgo	SC	Pomar
FRB7	Fraiburgo	SC	Pomar

LGS4	Lages	SC	Pomar
LGS5	Lages	SC	Pomar
LGS3	Lages	SC	Pomar
LGS2	Lages	SC	Pomar
LGS1	Lages	SC	Pomar
LAM	Lages	SC	Pop. Natural
SJQ8	São Joaquim	SC	Pomar
SJQ4	São Joaquim	SC	Pomar
SJQ6	São Joaquim	SC	Pomar
SJQ5	São Joaquim	SC	Pomar
SJQ7	São Joaquim	SC	Pomar
SJQ1	São Joaquim	SC	Pomar
SJQ3	São Joaquim	SC	Pomar
SJQ2	São Joaquim	SC	Pomar
CUT1	Curitibanos	SC	Pomar
CUT2	Curitibanos	SC	Pomar
URU1	Urubici	SC	Pop. Natural
URU2	Urubici	SC	Pop. Natural
UPM	Urupema	SC	Pop. Natural
PSM4	Passos Maia	SC	Pop. Natural
PSM5	Passos Maia	SC	Pop. Natural
PSM6	Passos Maia	SC	Pop. Natural
PSM3	Passos Maia	SC	Pop. Natural
PSM2	Passos Maia	SC	Pop. Natural
CMB	Curitibanos	SC	Pop. Natural
SMC	São Marcos	SC	Pop. Natural
MFR	Mafra	SC	Pop. Natural

ITU	Ituporanga	SC	Pomar
SJC	São José do Cerrito	SC	Pop. Natural
PSM1	Passos Maia	SC	Pop. Natural
RQM	Rancho Queimado	SC	Pop. Natural
ALZ	Abelardo Luz	SC	Pop. Natural
IPE1	Ipê	RS	Pop. Natural
IPE2	Ipê	RS	Pop. Natural
PNL	Painel	RS	Pop. Natural
VCR	Vacaria	RS	Pomar
SND	Sananduva	RS	Pomar
VSG	Água Doce	RS	Pomar

SC - Santa Catarina; RS - Rio Grande do Sul; Pop. - População  
 - Identificação dos locais consta na lista de siglas e abreviações.

#### 4.2. ESTABELECIMENTO DO PATÓGENO EM MEIO DE CULTURA

Em câmara de fluxo laminar foram separados até 5, dentre os frutos maduros e com lesão coletados, de cada um dos locais de coleta. Os frutos escolhidos passaram por uma fase de assepsia da parte externa da casca, evitando assim contaminação da parte interna durante o manuseio. A assepsia consistiu na pulverização do fruto com álcool 70% e sua flambagem em bico de Bunsen. Posteriormente, os frutos foram seccionados horizontalmente, com um bisturi tamanho 24, passando o corte no meio da lesão, de modo a dividi-la ao meio ou duas metades (Figura 2B). Metodologia estabelecida pelo grupo de pesquisa em fitopatologia da Epagri - São Joaquim.

O inóculo de área retangular foi retirado do fruto, da região de lesão entre a casca e a polpa, com o auxílio de bisturi e pinça autoclavada a 121°C e 1 atm por 30 min. Este foi imediatamente colocado em placa de petri contendo 10 ml de meio BDA (Batata Dextrose Agar), o meio contido nas placas foi previamente autoclavado durante 15 min após atingir a temperatura de 121°C, sob 1,0 atm de pressão.

A área, do material seccionado, mais próximo à casca foi colocado em contato com o meio de cultura. As placas foram mantidas em B.O.D à uma temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 h. Para cada fruto lesionado preparou-se uma placa, só sendo repicadas aquelas que apresentaram crescimento característico de *Colletotrichum* sp, descritos por Sutton, 1992. Após 7 dias de crescimento, regiões livres de contaminação aparente, foram repicadas para novas placas de Petri contendo os mesmos 10 ml de meio BDA, que seguiu a mesma metodologia de preparo citada anteriormente. Metodologia estabelecida pelo grupo de pesquisa em fitopatologia da Epagri - São Joaquim.

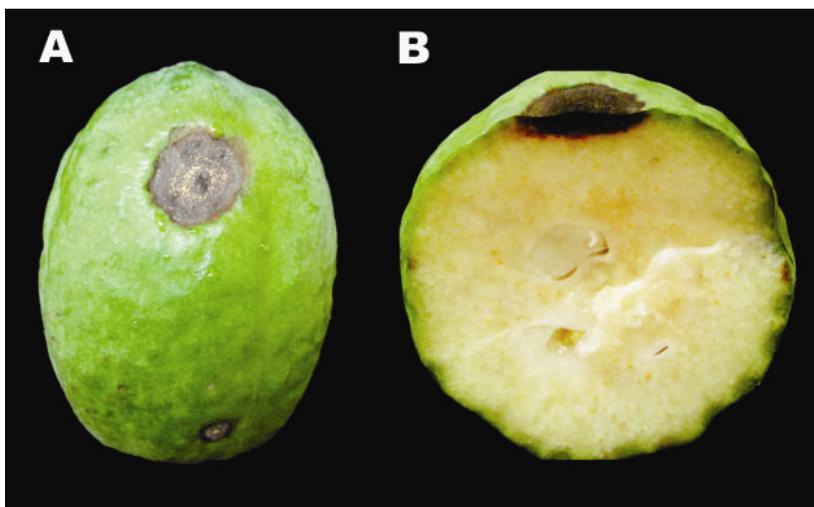


Figura 2 – A) Lesão de *Colletotrichum* sp. em goiabeira-serrana, cujo tamanho e esporulação foram utilizadas para fins de caracterização. B) Secção do fruto separando a lesão ao meio para isolamento. Foto: Morgana Elis Lopes.

#### 4.3. ISOLAMENTO MONOSPÓRICO

Após o estabelecimento das colônias, em meio de cultura, obteve-se isolados monospóricos de cada um dos 45 acessos com colônia pura. A obtenção de isolado monospórico é imprescindível para a diminuição da variabilidade dentro e entre as colônias. Em colônias monospóricas é possível saber que as estruturas são provenientes de apenas um conídio e expressam

apenas as características do mesmo. Em um microtubo de plástico de 1,5 ml foi pipetado 1,0 ml de água estéril. Posteriormente, com o auxílio de um bisturi foi seccionado uma pequena região da colônia contendo micélios e sempre que possível esporulação visível. Após a região ser retirada, esta foi introduzida no microtubo e este foi agitado em agitador vortex por 20 segundos para homogeneizar a solução e desprender as estruturas do fungo do meio de cultura. Com o auxílio de uma micropipeta 50 µl da solução foram retirados do microtubo e *pipetados* em câmara de Neubauer, sendo, em microscópio óptico, visualizada a concentração de conídios de *Colletotrichum* sp. em 1 ml de solução. Após verificada a concentração, a solução foi diluída para que no final fosse alcançada a concentração de  $1 \times 10^3$  conídios/ml (ALFENAS et al, 2007). Realizada a diluição foram pipetados 10 µl da solução em 4 placas de petri contendo meio de cultura Ágar-água (AA), sendo o volume espalhado pela placa com o auxílio de uma alça de Drigalsky previamente esterilizada. As placas de petri foram então vedadas e colocadas em B.O.D por 24 h à uma temperatura de 24°C, 12 h de luminosidade e 12 h de escuro.

Em razão de que o meio de cultura ágar - água não possui nutrientes, não é esperado o crescimento dos conídios presentes, uma vez que nesse momento é necessário que o mesmo permaneça inativo, só iniciando o crescimento micelial quando apenas um conidio for retirado. Sendo assim o período de incubação é realizado para diminuir a umidade dentro da placa de petri. Encerrado o período de incubação, em câmara de fluxo, as placas de petri foram abertas e os conídios presentes foram retirados com o auxílio de uma agulha de 12,7 x 0,3 mm e transferidos para placas de petri contendo meio de cultura BDA. Estas foram novamente incubadas, nas mesmas condições anteriores para o crescimento das colônias monospóricas. O sucesso dessa fase do processo é imprescindível para a realização de todos os testes posteriores descritos no trabalho, uma vez que em todos os testes foram utilizadas colônias monospóricas. Os processos para a realização de isolamento monospórico, foi realizado em câmara de fluxo laminar e condições controladas. Esta é a metodologia estabelecida pelo laboratório de fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina - LABfitop, que foi utilizada no presente trabalho.

#### 4.4. POSTULADOS DE KOCH

Quando se trabalha com caracterização de fungos fitopatogênicos é imprescindível a confirmação dos quatro postulados

de Koch. Esse procedimento, que será descrito posteriormente, foi efetuado com o intuito de confirmar a real presença do patógeno, bem conhecer sobre a sua atividade, forma de penetração e, possivelmente, características de sua patogenicidade. Sendo assim, para confirmar a presença, a agressividade e a espécie ou espécies de *Colletotrichum* em goiabeira-serrana, bem como a sintomatologia que esta espécie apresenta, realizaram-se as seguintes etapas, conhecidas como Postulados de Koch:

1. **Associação constante entre patógeno e hospedeiro:** As plantas do mesmo genótipo que apresentam os sintomas observados devem sempre estar associadas ao mesmo tipo de organismo e sintoma.

2. **Isolamento do patógeno:** Nessa etapa o organismo encontrado é retirado da planta hospedeira, o ideal é que seja imediatamente inoculado em meio de cultura BDA. Caso isso não seja possível, entretanto, os esporos podem ser armazenados em microtubos ou mesmo ser colocadas para crescer em placa de petri com meio BDA.

3. **Inoculação do patógeno e reprodução dos sintomas:** Nessa fase o ideal é ter uma cultura pura do organismo isolado e este será posteriormente inoculado em plantas sadias do mesmo genótipo do qual foi obtido e os sintomas incitados devem ser os mesmos observados originalmente. Caso ocorra formação de sintomas diferenciados estes precisarão de análises mais detalhadas.

4. **Reisolamento do patógeno:** O mesmo organismo deve ser isolado novamente, contudo dessa vez o esporo será proveniente das plantas submetidas à inoculação artificial. Esse reisolamento é necessário para ratificar a sintomatologia que o patógeno produz.

Com o estabelecimento do fungo em meio de cultura e com o isolamento monospórico as etapas 1 e 2 já foram estabelecidos e confirmadas, uma vez que os sintomas apresentados em todos os acessos foram característicos de antracnose, bem como colônias monospóricas já foram estabelecidas em meio de cultura BDA. Dando sequência aos

postulados de Koch foi realizada então a inoculação dos isolados em frutos de goiabeira-serrana sadios (Figura 3).



Figura 3 - Frutos de goiabeira-serrana sadios, contendo o inóculo de *Colletotrichum* sp. em concentração previamente calibrada. Foto: Morgana Elis Lopes.

Nos frutos a inoculação foi realizada de acordo com Andrade et al; (1998). Primeiramente 75 frutos sadios e já maduros de quatro clones de goiabeira-serrana (Clone 85, 509, 101, 458), provenientes de um pomar experimental em Fraiburgo -SC, passaram por um processo de assepsia, que consistiu na permanência dos mesmos por 10 min em hipoclorito 1%. Posteriormente, os frutos foram secados com papel toalha e agrupados (Figura 4).



Figura 4 - Frutos de goiabeira-serrana imersos em solução de hipoclorito 1%, durante 10 min. Foto: Morgana Elis Lopes

As soluções de esporos, para a realização das inoculações, foram preparadas a partir de colônias, monospóricas de 7 dias, do isolado identificado como FRB 6 proveniente da localidade de Fraiburgo - SC e do isolado identificado como SJQ 6, proveniente da localidade de São Joaquim. Para tanto, placas de petri foram abertas em câmara de fluxo e vertidos 10 ml de água estéril nas placas contendo a colônia crescida. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky a colônia foi raspada e homogeneizada e a concentração de conídios de cada isolado foi estabelecido em câmara de Neubauer, alcançando-se no final uma concentração de  $10^8$  conídios/ml para a realização das inoculações nos frutos sadios (ALFENAS et al., 2007).

Para a introdução do patógeno nos frutos sadios, pipetaram-se 20  $\mu$ l da suspensão de conídios em dois pontos opostos do fruto, sendo esses pontos previamente marcados. Testou-se a inoculação do patógeno em regiões dos frutos que foram previamente perfuradas (método 01 - **M1**), sendo as perfurações produzidas, com a realização de 5 aberturas através da utilização de agulha com 12 x 0,3 mm de diâmetro. Testou-se também a capacidade de penetração do patógeno em regiões dos frutos, não perfuradas (método 02 - **M2**). O controle foi realizado com água estéril nas mesmas condições, ou seja, em regiões dos frutos com e sem perfurações (método 03 - **H<sub>2</sub>O**) (Figura 5).



Figura 5 - Frutos de Goiabeira-serrana inoculados com os métodos M1 e M2 e o controle (H<sub>2</sub>O). Foto: Morgana Elis Lopes

Os frutos, de todos os tratamentos, foram acondicionados em bandejas plásticas com tampa. Estes foram colocados sobre papéis umedecidos para a obtenção de câmara úmida. As bandejas permaneceram em um ambiente com temperatura controlada (23°C) e fotoperíodo (12 h), sendo os frutos observados diariamente durante 25 dias, após a inoculação. Foram inoculados 5 frutos, para cada método, de cada acesso e para cada uma das 5 repetições. Os frutos foram inoculados em 2 regiões opostas, totalizando 25 frutos inoculados (50 lesões) para cada método de inoculação. Utilizou-se um total de 75 frutos de goiabeira-serrana em cada acesso.

Com a infecção dos frutos pelo patógeno cumpriu-se a terceira fase dos postulados de Koch, sendo a quarta fase realizada logo após o período de observação dos frutos. Cinco frutos de cada acesso que apresentaram lesão de antracnose foram colocados em câmara de fluxo, passaram pelo processo de assepsia com álcool 70% e flambagem em bico de Bunsen. Posteriormente, os mesmos foram seccionados e uma pequena região entre a casca e a polpa foi introduzida em meio de cultura BDA. O aparecimento de colônias características de *Colletotrichum* e a visualização de suas estruturas constituem a quarta

etapa e a confirmação da real presença de antracnose em frutos de goiabeira-serrana, de acordo com os postulados de Koch.

#### 4.5. PATOGENICIDADE

Os frutos utilizados para a realização dos postulados que Koch foram analisados quanto ao desenvolvimento das lesões produzidas pelas inoculações. O desenvolvimento da doença foi medido através do diâmetro das lesões bem como de acordo com o nível de esporulação aparente. Os frutos inoculados foram acompanhados diariamente, sendo que com o surgimento das primeiras lesões estas começaram a ser medidas, foram realizadas 5 mensurações em intervalos de 4 dias. As mensurações foram realizadas com régua centimetrada, sendo a lesão medida de uma extremidade a outra e em duas direções perpendiculares. Simultaneamente, realizou-se a observação do índice de ocorrência de lesões em frutos com perfurações e nos sem perfurações, bem como a velocidade e nível de esporulação. Para o conhecimento de diferentes níveis de patogenicidade dos isolados utilizados bem como dos acessos de goiabeira-serrana, a média dos diâmetros obtidos por lesão será comparado com os obtidos nos diferentes acessos e nas diferentes formas de inoculação. Com a obtenção das médias das lesões será possível calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que mostrará como cada isolado se comportou em relação aos diferentes acessos e as diferentes formas de inoculação e como os acessos de goiabeira-serrana se comportaram com a introdução do patógeno nas diferentes formas de inoculação.

#### 4.6. ESPECIFICIDADE

Os testes de especificidade foram realizados em frutos de macieira (*Malus domestica*), das variedades Fuji e Gala e frutos de goiabeira (*Psidium guajava*). Os frutos, sadios, de macieira da variedade Fuji e da variedade Gala, foram adquiridos junto a empresa Sanjo Cooperativa Agrícola SJ e os frutos sadios de goiabeira foram adquiridos na unidade do CEASA da localidade de São José - SC. Estes passaram, primeiramente, por um processo de assepsia, que consistiu na permanência dos mesmos

por 15 minutos em hipoclorito 0,5 %. Posteriormente os frutos foram secados com papel toalha e agrupados.

As soluções de esporos, para a realização das inoculações, foram preparadas a partir de colônias, monospóricas de 7 dias, dos isolados identificados como VCR proveniente da localidade de Vacaria – RS, SJC, proveniente da localidade de São José do Cerrito - SC e do isolado LGS 2, proveniente da localidade de Lages - SC. Esses isolados foram utilizados pela distância geográfica de coleta, bem como pelas diferenças morfológicas apresentadas. Para tanto, placas de petri foram abertas em câmara de fluxo laminar e 10 ml de água estéril foram vertidos sobre as colônias. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky a colônia foi raspada e homogeneizada. A concentração de conídios de cada isolado foi estabelecida em câmara de Neubauer, alcançando-se no final uma concentração de  $10^6$  conídios/ml para a realização das inoculações (ALFENAS et al., 2007).

Seguindo a mesma metodologia empregada para os postulados de Koch e patogenicidade em goiabeira-serrana, pipetaram-se 20  $\mu$ l da suspensão de conídios em 2 pontos opostos dos frutos de macieira e goiabeira, sendo esses pontos previamente marcados. Testou-se a inoculação do patógeno em frutos onde foram realizadas perfurações (método 01 - **M1**), sendo as aberturas produzidas com a realização de 5 perfurações com agulha de 12 x 0,3 mm. Testou-se também a capacidade de penetração do patógeno em frutos não perfurados (método 02 - **M2**) e o controle foi realizado com água estéril nas mesmas condições e presença ou ausência de perfurações (método 03 - **H<sub>2</sub>O**).

Os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas, com tampa, estes foram colocados sobre papéis umedecidos para a obtenção de câmara úmida. As bandejas permaneceram em um ambiente com temperatura controlada (23°C) e fotoperíodo (12 h), sendo os frutos observados diariamente durante 25 dias após a inoculação. Foram inoculados 75 frutos de macieira e 75 frutos de goiabeira, sendo utilizados 5 frutos de cada acesso em cada uma das 5 repetições.

Os frutos, de macieira e goiabeira, inoculados foram acompanhados diariamente, sendo que com o surgimento das primeiras lesões estas começaram a ser medidas. Foram realizadas 5 mensurações em intervalos de 4 dias. As mensurações foram realizadas com régua centimetrada, sendo a lesão medida de uma extremidade a outra e em duas direções perpendiculares. Juntamente com a obtenção das medidas realizou-se a observação do índice de ocorrência de lesões em frutos

com perfuração e nos não perfurados, bem como a velocidade e nível de esporulação.

Para o conhecimento de diferentes níveis de patogenicidade dos isolados utilizados, a média dos diâmetros obtidos por lesão será comparado com os obtidos nos diferentes variedades (no caso dos frutos de macieira) e nas diferentes formas de inoculação (para frutos de macieira e goiabeira). Com a obtenção das médias das lesões será possível calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que mostrará como cada isolado se comportou em relação as diferentes variedades de maçã e as diferentes formas de inoculação e como as variedades de maçã se comportaram com a introdução do patógeno nas diferentes formas de inoculação.

Após o término da coleta de dados para patogenicidade, 5 frutos de cada variedade de maçã e 5 frutos de goiaba comum, que apresentaram lesão de antracnose, foram retirados das caixas plásticas e colocados em câmara de fluxo laminar. Posteriormente os mesmos passaram pelo processo de assepsia com álcool 70% e flambagem em bico de Bunsen. Foram seccionados e uma pequena região entre a casca e a polpa foi introduzida em meio de cultura BDA. Esse processo final foi realizado com o intuito de observar se as lesões formadas nos frutos de macieira e goiabeira apresentavam características e estruturas do gênero *Colletotrichum*.



## 5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

### 5.1. ÍNDICE DE CRESCIMENTO MICELIAL

Seguindo a metodologia de Boneti et al. (1999), um disco de micélio de 7 mm, de cada um dos 45 isolados monospóricos, foram repicados para 4 placas, contendo meio de cultura BDA, sendo colocado um disco em cada uma das 4 placas. As 4 placas de petri, que se caracterizam como repetições de cada um dos isolados, foram mantidos em B.O.D com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 h. A partir do segundo dia de crescimento foi dado início à obtenção diária do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, para isso foi utilizada uma régua centimetrada. As medições foram encerradas quando um isolado, dentro da repetição, tomou toda a placa. Com os dados obtidos foi determinado, para cada isolado, o índice de crescimento micelial em centímetros por dia (Figura 6).

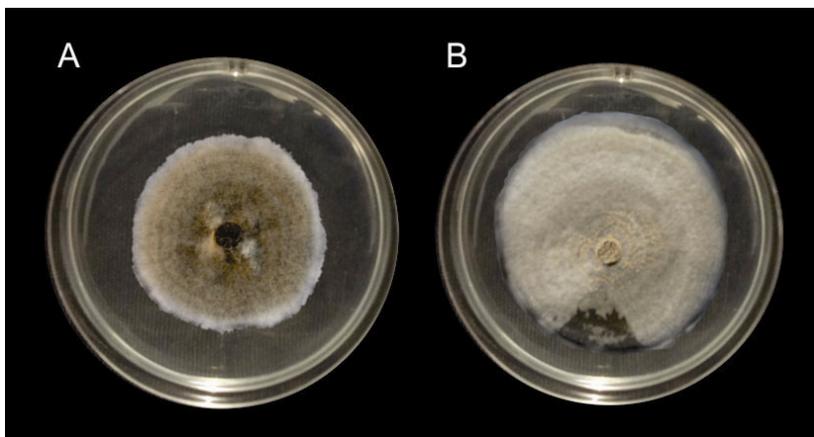


Figura 6 - Imagens mostrando a diferença no diâmetro de crescimento entre dois isolados com 6 dias de incubação. Foto: Morgana Elis Lopes.

Após a obtenção do diâmetro médio das colônias em suas repetições, obteve-se o valor de crescimento micelial médio para cada um dos 45 isolados. Estes dados foram analisados estatisticamente, através do teste de separação de médias Scott

Knott, para verificar diferenças entre os isolados quanto ao seu índice de crescimento micelial.

## 5.2. CARACTERÍSTICAS CULTURAIS

Os 45 isolados, de *Colletotrichum* sp., ao final do período de caracterização quanto ao índice de crescimento micelial, foram analisados segundo suas características culturais, tais como: Topografia, cor do micélio aéreo, cor do reverso da colônia (fundo da placa de petri), presença/ausência de setores e cor de massa conidial (quando existente). A cor foi analisada na parte superior do crescimento micelial e, também, no reverso da colônia seguindo-se alguns padrões estabelecidos por Sutton (1992) para coloração de colônias de *Colletotrichum*, em placa de Petri. Nesse mesmo momento foi analisada a topografia das 45 colônias (Tabela 2).

Tabela 2 - Padrões para análise de topografia e coloração das colônias. Padrões utilizados pelo grupo de pesquisa do gênero *Colletotrichum* da Universidade de São Paulo.

TOPOGRAFIA				COLORAÇÃO	
Crescimento	Altura	Densidade	Aparência	Do micélio	Fundo de placa
<b>Aéreo</b>	Baixo	Ralo	Florculosa	Branca	Branca
<b>Submerso</b>	Intermediário	Medio	Cotonosa	Creme	Creme
	Alto	Denso		Verde oliva	Verde oliva
				Salmão	Salmão
				Preto	Preto
				Marrom	Marrom

Juntamente com as análises de coloração e topografia, as colônias foram separadas de acordo com a formação ou não de setores. Quando os setores se mostraram presentes foram contados, não sendo, contudo, caracterizada alguma diferença na topografia ou coloração da

colônia, nessa região. A área considerada setor foi aquela que dentro da colônia apresentava características diferenciadas ao restante da colônia.

Verificou-se, posteriormente, a presença de massa conidial. Esse fator foi analisado quanto a presença ou ausência de massa conidial, bem como se a mesma se concentrava mais no centro da colônia ou somente do centro. Algumas colônias costumam apresentar maior esporulação no centro da colônia, este fato se deve a esporulação proveniente do disco de micélio que foi introduzido no novo meio de cultura.

### 5.3. FORMATO E TAMANHO DOS CONÍDIOS

Placas de petri, contendo colônias monospóricas de 7 dias e estabelecidas em meio de cultura BDA, foram abertas em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de lupa e alça de platina acoplada em um cabo de Kolle o material conidial superficial foi suavemente raspado e colocado em lâmina não permanente (26 mm X 76 mm X 1.0 mm), juntamente a uma gota do corante azul de Aman. Com os esporos já na lâmina foi colocada sobre eles uma lamínula de 0,13 mm de espessura e assim o formato dos conídios foi analisado em microscópio óptico (Olympus® CH2), sob objetiva de 40X, sendo obtidas imagens pelo sistema vídeo câmera e estas então analisadas (Figura 7). Para cada placa foram preparadas 5 lâminas, sendo analisados 20 conídios de cada lâmina, totalizando 100 conídios analisados por isolado. Estes foram então classificados em: cilíndricos e fusiformes.

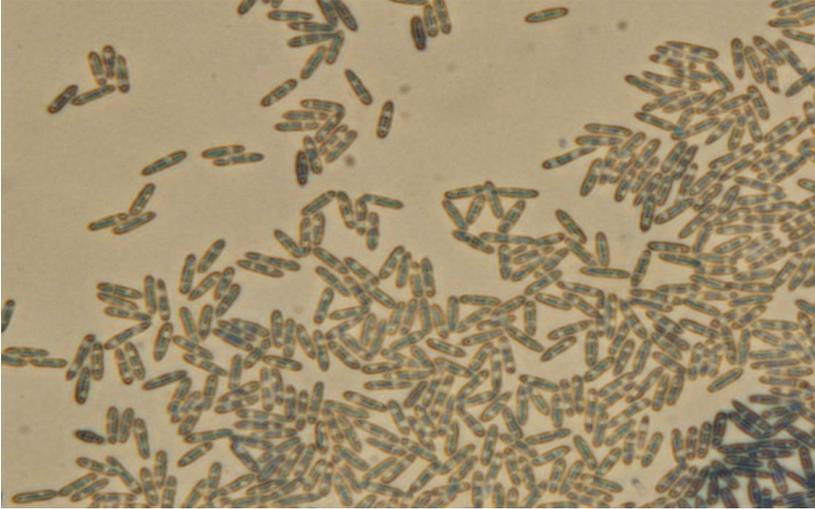


Figura 7 – Conídios de *Colletotrichum* sp. Isolados de frutos de goiabeira-serrana. Imagem captada pelo sistema vídeo câmera (Olympus® CH2), em um aumento de 40X. Foto: Morgana Elis Lopes.

As lâminas que foram preparadas para analisar o formato dos conídios, foram também utilizadas para medi-los quanto ao seu comprimento e largura. Os conídios foram medidos utilizando-se as imagens captadas pelo sistema vídeo câmera acoplado ao microscópio óptico. Para a realização das medias foi utilizado o programa ScopePhoto (Figura 8). A leitura foi feita em micrometros ( $\mu\text{m}$ ) e a escolha dos conídios a serem medidos na lâmina foi feita totalmente ao acaso.

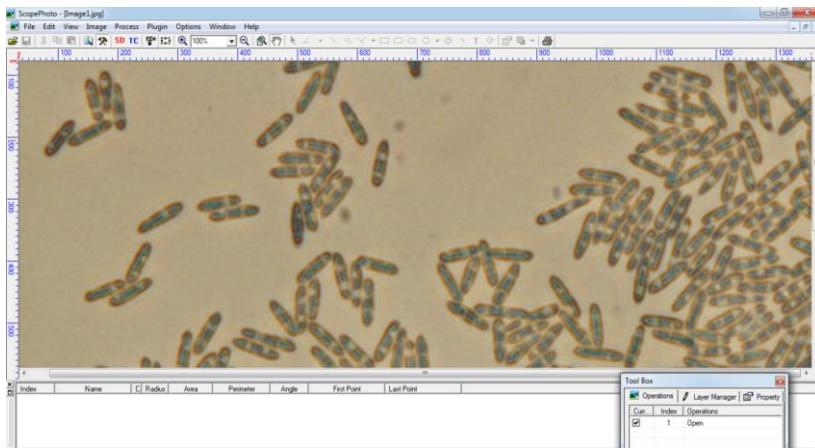


Figura 8 - Imagem importada e utilizada para a realização das análises de comprimento e largura de conídios pelo programa ScopePhoto.

As medidas de comprimento e largura dos 20 conídios de cada uma das 5 lâmina preparadas e fotografadas foram utilizadas para calcular a média da lâmina. Assim para cada repetição foram obtidos cinco valores para tamanho (comprimento e largura) de conídios. A metodologia utilizada para analisar as medidas de comprimento e largura dos conídios foi descrita por Sutton (1992). Posteriormente, os dados foram analisados estatisticamente, através do teste de separação de médias Scott Knott, e observações acerca de possíveis diferenças entre os isolados, nessas características, puderam ser averiguadas.

#### 5.4. TAMANHO E FORMATO DOS APRESSÓRIOS

Para a obtenção de apressórios, colônias monospóricas de 7 dias dos 45 isolados de *Colletotrichum* sp. foram utilizadas. Cada placa de petri foi aberta em câmara de fluxo e 10 ml de água estéril foram vestidos nas mesmas. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky a suspensão (micélio e água) foi homogeneizada e, posteriormente, filtrado com o auxílio de compressa de gase. A concentração de conídios foi estabelecida com a utilização de câmara de Neubauer, uma vez realizado esse processo a suspensão conidial foi, quando necessário, diluída até

se obter uma concentração de  $1 \times 10^3$  conídios/ml (ALFENAS et al., 2007).

Placas de petri contendo papel filtro, lâmina de vidro e sobre esta uma tira de papel celofane transparente contendo 10 cm de comprimento e 5 cm de largura, foram autoclavadas e utilizadas para a obtenção dos apressórios. Após a preparação das placas de petri e da suspensão conidial na concentração adequada, pipetou-se, em câmara de fluxo 2 gotas de 20  $\mu$ l cada sobre o papel celofane. Posteriormente, o papel filtro foi umedecido com água estéril, a placa de petri foi vedada e acondicionada em B.O.D com temperatura controlada (23°C) e fotoperíodo de 12 h. Foram preparadas 5 placas por isolado. Após 20 h em B.O.D, as placas foram abertas e uma gota de azul de Aman e lâminula foram colocados sobre as gotas da suspensão conidial pipetadas sobre o papel celofane. Os apressórios foram visualizados em microscópio óptico (Olympus® CH2), em aumento de 40X e imagens foram obtidas pelo sistema vídeo câmera (Olympus®), acoplado ao microscópio (Figura 9).

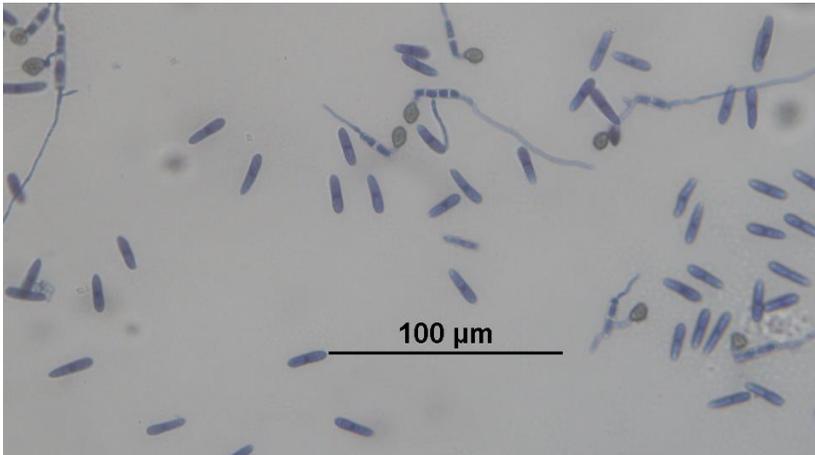


Figura 9 – Apressórios de *Colletotrichum* sp isolados de frutos de goiabeira-serrana. Imagem captada pelo sistema vídeo câmera (Olympus® CH2), em um aumento de 40X. Foto: Morgana Elis Lopes.

Os apressórios formados nesse período foram analisados quanto ao seu comprimento e largura, sendo o comprimento considerado a distância entre o septo, região onde termina o tubo germinativo e começa a formação do apressório, e a outra extremidade mais distante do mesmo. A largura foi medida em linha reta e perpendicular a do

comprimento. Estes foram medidos em  $\mu\text{m}$  com o auxílio do programa ScopePhoto (Figura 10).

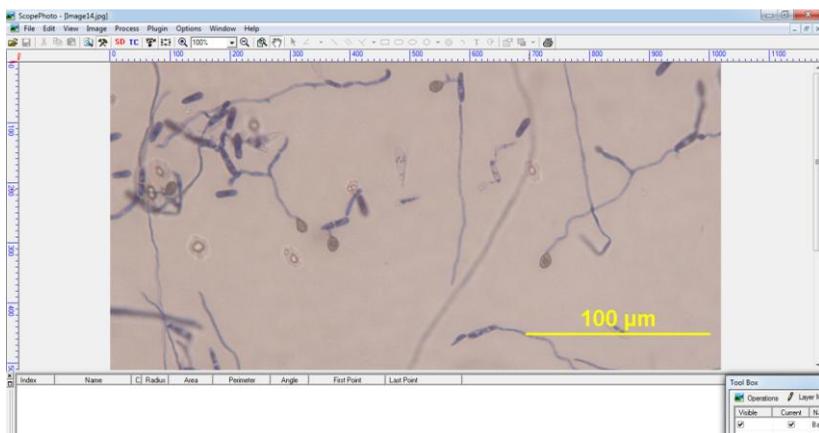


Figura 10 - Imagem importada e utilizada para a realização das análises de comprimento e largura dos apressórios pelo Programa ScopePhoto.

A metodologia utilizada para analisar as medidas de comprimento e largura dos apressórios, obtidos dos isolados de *Colletotrichum*, foi segundo Sutton (1992). Posteriormente à obtenção dos dados calculou-se o valor médio, de comprimento e largura, para cada um dos 45 isolados. Estes foram analisados estatisticamente, através de teste de separação de médias Scott Knott, e observações acerca de possíveis diferenças entre os isolados, nessas características, puderam ser estimadas.

As imagens utilizadas para obtenção das medidas de comprimento e largura dos apressórios, foram utilizadas para analisá-los, também, segundo o seu formato. Quanto ao fator formato, os mesmos foram classificados em: globosos, clavados e lobulados



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. TESTE DE PATOGENICIDADE (POSTULADOS DE KOCH)

No que se refere à realização das etapas dos postulados de Koch, os mesmos foram estabelecidos e apresentaram os resultados esperados, sendo confirmada a presença de *Colletotrichum* sp. em goiabeira-serrana. Todas as quatro etapas foram realizadas seguindo-se os processos estabelecidos:

1) Frutos dos acessos de goiabeira-serrana identificados como: clone 85, clone 101, clone 458 e clone 509, provenientes do município de Fraiburgo - SC que apresentavam sinais e sintomas característicos de antracnose, foram coletados e isolados em meio de cultura. Os mesmos apresentavam manchas deprimidas, de coloração marrom escura e formação de massa conidial sobre a lesão (Figura 11). Esse procedimento de identificação das características do patógeno no fruto, contempla a realização da primeira etapa dos postulados e da início a todos os testes necessários para a confirmação da presença do patógeno.



Figura 11 - Lesão de antracnose encontrada nos frutos utilizados para a realização dos postulados de Koch. Foto: Morgana Elis Lopes.

2) O cumprimento da segunda etapa se deu com o estabelecimento do patógeno em meio de cultura. O mesmo apresentou crescimento e estruturas características do gênero *Colletotrichum*, em meio de cultura BDA o que, mais uma vez, comprova que o patógeno isolado é o qual supunha-se inicialmente. Em todas as fases dos postulados de Koch, tem-se como intenção a observação de estruturas e padrões de desenvolvimento do microrganismo isolado, como por exemplo conídios, micélios e crescimento da colônia em discos. A observação inicial da sintomatologia é responsável pelas primeiras suposições acerca do tipo de estrutura que está causando as lesões observadas, mas com o intuito de inferir com precisão sobre o patógeno é que se realizam todas as etapas dos postulados de Koch, mesmo que estruturas características tenham sido observadas desde o início.

3) Os frutos dos acessos clone 85, clone 101, clone 458 e clone 509, foram parcial ou totalmente acometidos pelo patógeno (isolados FRB 6 e SJQ 6), apresentando os sinais e a sintomatologia característica de antracnose (Figura 12). Esses clones foram utilizados devido a disponibilidade de frutos em quantidade e já maduros. O patógeno foi capaz de penetrar o fruto através dos dois métodos utilizados M1 com a presença de perfurações nos frutos e M2 sem a presença de perfurações. A capacidade do patógeno de penetrar no fruto sadio, formar estruturas germinativas e reprodutivas mostra que o mesmo, além de ter apresentado características de um microrganismo específico, permaneceu patogênico após o isolamento em meio de cultura. Os frutos utilizados como controle, que foram inoculado com água e das duas formas anteriores, mantiveram-se sadios.



Figura 12 - Frutos completamente acometidos após inoculação com os métodos M1 e M2 e frutos saudáveis do tratamento controle, feito com água (H<sub>2</sub>O). Foto: Morgana Elis Lopes

4) Após o acometimento dos frutos, na etapa 3, os mesmos foram novamente isolados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Esse processo reproduziu mais uma vez as características do gênero *Colletotrichum*, finalizando o ciclo dos postulados de Koch e confirmando a presença de antracnose nos frutos de todos os acessos de goiabeira-serrana coletados. Sendo assim é possível, com os resultados obtidos, confirmar a ocorrência de antracnose em frutos de goiabeira-serrana na localidade onde foram feitas as coletas, Fraiburgo - SC. A realização desse processo é imprescindível para o início dos testes de caracterização dos patógenos, uma vez que o mesmo assegura que o patógeno que está sendo utilizado condiz com o esperado e que o mesmo está viável e ainda patogênico.

A penetração do patógeno nos frutos de goiabeira-serranas, se deu em regiões onde foram feitas perfurações e em regiões sem a presença de perfurações, mostrando com isso não haver necessidade da existência de ferimentos nos frutos para que o fungo se estabeleça. Ao final de 20 dias de observação os frutos, com perfurações, inoculados possuíam lesões maiores e apresentavam grande esporulação e formação de intensa massa conidial, quando comparado com os frutos inoculados (sem perfuração) (Figura 13). Estes também apresentavam esporulação, contudo a formação de massa conidial foi menos intensa, quando não inexistente. As observações acerca da esporulação e presença de massa conidial é apenas visual, ou seja, não foram mensuradas nem analisadas estatisticamente. ■



Figura 13 - Fruto inoculado sem a existência das perfurações (a esquerda) e fruto inoculado na presença de perfurações (direita). Foto: Morgana Elis Lopes.

Nenhum fruto que foi inoculado com água estéril (controle) apresentou lesão, esporulação e massa conidial. Sendo assim, pode-se afirmar que as lesões presentes nos frutos inoculados com esporos de *Colletotrichum* sp, foram realmente provenientes do processo de bioensaio. Já foi constatado que os frutos de goiabeira-serrana

apresentam grande diversidade em tamanho de fruto, espessura de casca entre outros fatores (DUCROQUET, 2000). Nesse bioensaio foi possível perceber que a velocidade de crescimento do patógeno foi tanto maior quanto menor o fruto e mais fina a sua casca, o mesmo ocorrendo para o inverso.

Para análise e diferenciação do desenvolvimento do patógeno, nas duas diferentes formas de inoculação (com e sem perfurações), para os quatro diferentes acessos e para os dois isolados (FRB 6 e SJQ 6) utilizados, foi calculada a AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) através da equação:

$$AACPD = \sum \left[ \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times t_{i+1} - t_i \right]$$

Onde,  $y_i$  é o diâmetro de uma lesão no tempo  $t_i$ , em dias, e  $y_{i+1}$  é o diâmetro no tempo  $t_{i+1}$  (DE CAPDEVILLE et al., 2002).

Após o cálculo da AACPD, para os fatores progresso da doença com e sem perfurações, progresso da doença nos quatro acessos de goiabeira-serrana e para a resposta dos dois diferentes isolados (FRB 6 e SJQ 6) utilizados, as médias encontradas foram submetidas a Análise de variância (Tabelas 3).

Tabela 3 - Resumo da análise da variância, para os fatores progresso da doença em frutos de goiabeira-serrana com e sem perfurações, progresso da doença nos quatro acessos de goiabeira-serrana, e diferença de patogenicidade dos dois isolados (FRB 6 e SJQ 6).

AACPD	GL	QM	F
Isolados A	1	850,86	38,08 **
Lesão B	1	10.448,39	467,64 *
Acessos C	3	24,18	1,08
Interação AXB	1	13,26	0,59
Interação AXC	3	51,10	2,28
Interação BXC	3	304,51	13,62 **
Interação AXBXC	3	34,73	1,55
Erro	64	22,34	

Total	79
CV(%)	14,96 %

(\*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(\*\*) - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Ambos os isolados testados (FRB 6 e SJQ 6) foram capazes de infectar e produzir sintomas, de antracnose, nos frutos de goiabeira-serrana. Sendo que o isolado FRB 6 se mostrou mais patogênico que o isolado SJQ 6, uma vez que aquele causou um maior progresso da doença em um determinado tempo, ou seja, as lesões causadas pelo isolado FRB 6 se desenvolveram em uma velocidade maior e apresentaram esporulação em um maior número de frutos que o isolado SJQ 6. As lesões causadas pelos dois isolados apresentaram as mesmas características sintomatológicas e estruturas esperadas de antracnose. Não houve interação significativa dos isolados com relação a frutos que foram ou não lesionados, bem como com os quatro acessos de goiabeira-serrana inoculados.

Os sintomas (manchas depressivas) apresentaram crescimento maior nos frutos perfurados em todos os quatro acessos de goiabeira-serrana. A sintomatologia iniciou-se com a formação de manchas encharcadas, seguida pelo aparecimento de manchas depressivas que acabaram por tomar grande parte ou mesmo todo o fruto. Sobre as manchas depressivas ocorreu a formação de massa conidial na cor laranja. Mesmo que em ambos os casos (com e sem perfurações) o patógeno tenha conseguido penetrar e infectar o fruto, percebe-se que o progresso da doença foi mais rápido onde foram feitas perfurações. Isso se deve, claramente, ao fato de que a presença de lesões facilita a penetração, formação de apressório e posterior colonização dos tecidos do fruto por parte do patógeno. Possivelmente, nos frutos não perfurados a lesão alcançaria as mesmas características dos frutos perfurados, porém em uma velocidade menor. Sendo assim é possível afirmar que a doença ocorre com ou sem presença de perfurações nos frutos de goiabeira-serrana, no entanto com uma velocidade e agressividade maior em frutos que apresentam algum tipo de ferimento. A ocorrência de esporulação e presença de massa conidial foi maior, também, nos frutos com presença de ferimentos (perfurações). As observações acerca da esporulação e presença de massa conidial foram visuais, portanto, não estão acompanhadas de análises estatísticas.

Quanto aos resultados ligado a variável dos acessos não houve diferença significativa entre os mesmos. Nenhum dos quatro acessos de goiabeira-serrana se mostrou resistente à doença ou mesmo apresentou

alguma resistência muito expressiva, quando esse fator é analisado isoladamente. Os acessos apresentaram diferença, em alguns casos, quando observados juntamente com a variável presença ou ausência de perfurações. Sendo assim, calculou-se a interação entre os mesmos mostrando que a interação para as variáveis lesão (com e sem perfurações) e acessos, também foi significativa ao nível de 5% (Figura 14).

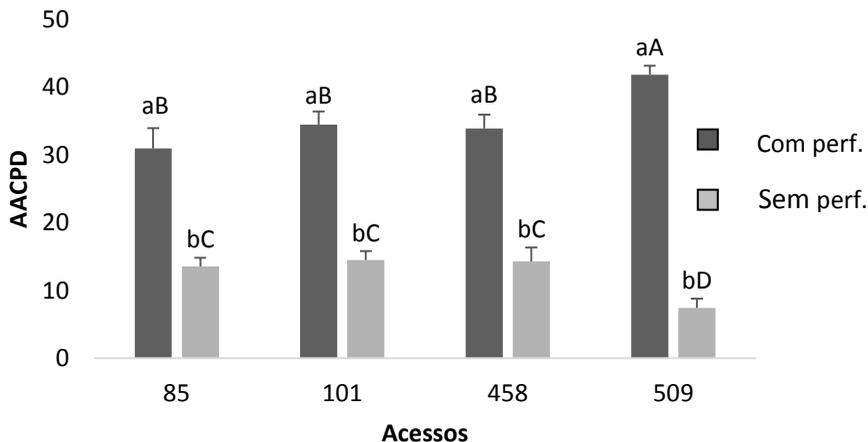


Figura 14 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes acessos de goiabeira-serrana. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de perfurações, no mesmo acesso, e maiúscula referente a resposta dos quatro acessos à presença ou ausência de perfurações nos frutos.

O clone 509 foi o acesso que apresentou a maior AACPD sendo considerado o mais suscetível à doença nos frutos em que foram feitas perfurações e o mais resistente nos frutos sem perfurações, diferindo-se em ambos os casos dos outros clones de goiabeira-serrana. Todos os acessos, como já citado anteriormente, mostraram-se mais acometidos pela doença nos frutos que foram perfurados e o inverso para os não perfurados, contudo o acesso 509 apresentou níveis ainda maiores de suscetibilidade e resistência em comparação com os outros acessos, nas duas situações.

Os clones 85, 101 e 458 não diferiram entre si na resposta dos acessos ao desenvolvimento da doença em frutos perfurados e não perfurados. Sabe-se que para esses três acessos o desenvolvimento da doença foi, também, mais severo nos frutos perfurados e menos severo nos não perfurados, contudo a AACPD para a interação desses fatores não os diferiu entre si, mas os diferiu do acesso clone 509 em ambas as situações.

De forma geral, nenhum dos acessos apresentou resistência ao patógeno, uma vez que todos foram infectados e reproduziram os sintomas de antracnose. Níveis diferentes de patogenicidade e de resposta da planta ao ataque de um patógeno está intimamente ligada a parâmetros que visam estabelecer programas de controle e reconhecimento de variedades com maior capacidade de auto-induzir a resistência ao patógeno.

## 6.2. ESPECIFICIDADE

O progresso da doença bem como a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum*, provenientes de goiabeira-serrana, foram testados em frutos de Goiabeira (*Psidium guajava*) e Macieira (*Malus domestica*). Os isolados VCR, SJC e LGS 2 se mostraram patogênicos, sendo capaz de infectar e reproduzir os sintomas de antracnose nos frutos de maçã e goiaba. As lesões se mostraram inicialmente manchas encharcadas e posteriormente evoluíram para manchas depressivas, contendo ou não massa conidial sobre as lesões.

Os frutos de goiabeira (*Psidium guajava*) foram infectados pelo patógeno nas duas formas de inoculação (com e sem perfuração dos frutos), verificou-se contudo, que os frutos em que foram feitas lesões o desenvolvimento da doença se deu de forma mais rápida e agressiva. Os frutos não perfurados demoraram o dobro do tempo (8 dias) para começarem a apresentar lesões, quando isso ocorreu, uma vez que em vários frutos não verificou-se formação de lesões de antracnose. Os frutos inoculados com água estéril (controle) não apresentam crescimento da doença. Para análise e diferenciação do desenvolvimento do patógeno, nas duas diferentes formas de inoculação com e sem perfuração dos frutos, foi calculada a AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) através da equação:

$$\text{AACPD} = \sum \left[ \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times t_{i+1} - t_i \right]$$

Onde ,  $y_i$  é o diâmetro de uma lesão no tempo  $t_i$ , em dias, e  $y_{i+1}$  é o diâmetro no tempo  $t_{i+1}$  (DE CAPDEVILLE et al., 2002).

Após o cálculo da AACPD, para os fatores progresso da doença com e sem perfurações, progresso da doença dos três diferentes isolados (VCR, SJC e LGS 2) utilizados, as médias encontradas foram submetidas a Análise de variância (Tabela 4).

Tabela 4- Resumo da análise da variância, para os fatores progresso da doença em frutos de goiabeira (*Psidium guajava*) com e sem perfuração e progresso da doença nos três isolados de *Colletotrichum*.

AACPD	GL	QM	F
Isolados A	2	4253,392	9,9791 **
Lesão B	1	10239,62	360,1828 **
Interação AXB	2	9223,607	18,0395 **
Erro	24	4,89098	
Total	29		
CV(%)	23,22		

(\*\*) - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

A patogenicidade dos três isolados testados se mostrou diferente no decorrer do desenvolvimento da doença. Os frutos que apresentavam áreas perfuradas foram mais acometidos pelo patógeno que os frutos sem perfurações, contudo os frutos perfurados inoculados com o isolado VCR apresentaram lesões ainda maiores, não verificou-se, contudo, diferença significativa quando comprado aos frutos perfurados inoculados com os isolados SJC e LGS 2 (Figura 15), mostrando que, para esses dois casos, a diferença não está ligada ao isolado mais sim a presença de perfurações. Os frutos perfurados inoculados com os isolados SJC e LGS 2 não diferiram estatisticamente entre si.

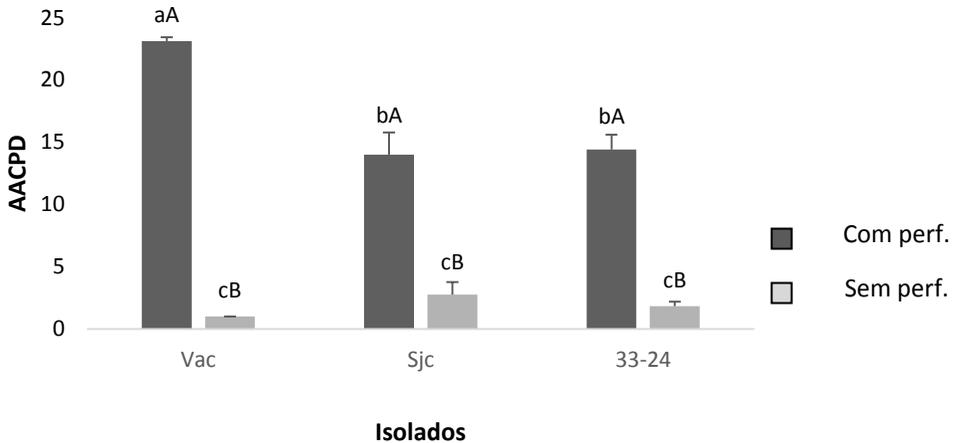


Figura 15 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores métodos de inoculação (presença ou ausência de perfurações) e diferentes isolados. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de perfurações, no mesmo acesso, e maiúscula referente a resposta dos três acessos à presença ou ausência de perfurações nos frutos de goiabeira (*Psidium guajava*).

Os frutos que não possuíam perfurações, inoculados com os 3 isolados não apresentaram diferença significativa entre si na interação, mas são estatisticamente diferentes dos frutos que foram perfurados em todas as variáveis analisadas. Na inoculação de frutos de macieira (*Malus domestica*) foi, também, calculada a AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) através da equação citada anteriormente. Após o cálculo da AACPD, para os fatores progresso da doença com e sem perfurações, progresso da doença dos três diferentes isolados (VCR, SJC e LGS 2) e progresso da doença nas duas diferentes variedades de maçã utilizadas (gala e fuji), realizou-se a Análise de variância com as médias obtidas para esses fatores (Tabela 5).

Tabela 5 - Resumo da análise da variância, para os fatores progresso da doença em frutos de macieira (*Malus domestica*) com e sem lesão, progresso da doença nas variedades de maçã fuji e gala, e diferença de patogenicidade dos 3 isolados (VCR, LGS 2 e SJC).

<b>AACPD</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Frutos A	1	156,321	3,8660 ns
Isolados B	2	579,0505	14,3206 **
Lesão C	1	22360,73	553,0069 **
AXB	2	515,7213	12,7544 **
AXC	1	872,7456	21,5840 **
BXC	2	529,663	13,0992 **
AXBXC	2	336,9194	8,3324 **
Erro	48	40,43481	
Total	59		
CV(%)	24,31		

(\*\*) - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Os frutos em que foram feitas perfurações, tanto da variedade gala quanto da variedade fuji, apresentaram desenvolvimento das lesões de antracnose muito mais severo que os frutos não perfurados (Figura 16). Sendo assim, foi possível verificar diferença significativa entre os frutos com e sem perfuração nas duas variedades, sendo encontrada a AACPD muito maior em frutos com perfurações (Figura 17). Os frutos apresentaram resultados semelhantes quando analisados como variável isolada, sendo que nenhum se mostrou totalmente resistente ao patógeno.



Figura 16 - Fruto de macieira da variedade fuji inoculado com a existência das perfurações (a esquerda) e fruto de macieira da variedade gala inoculado com a presença de perfurações (a direita), no mesmo intervalo de tempo. Foto: Morgana Elis Lopes.

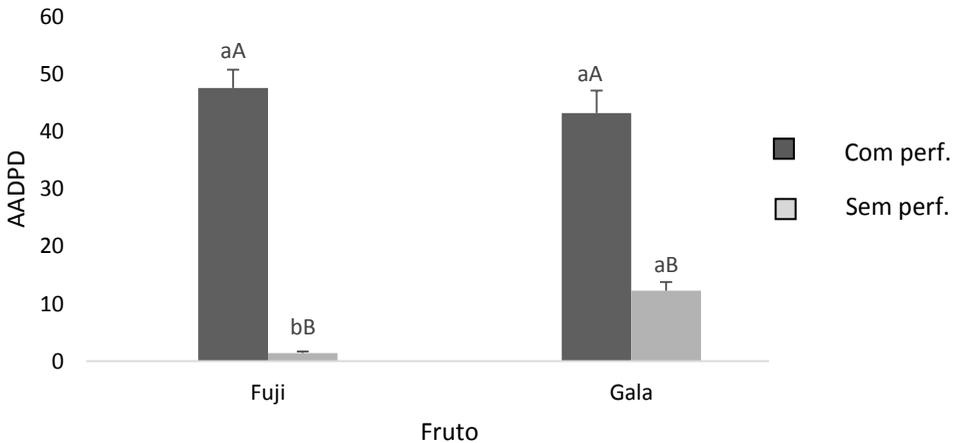


Figura 17 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores presença ou ausência de lesão e variedades de maçã. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de lesão e maiúscula referente a resposta das duas variedades à presença ou ausência de lesão.

Em se tratando dos 3 isolados utilizados, percebeu-se que os mesmos, também, apresentaram maior AACPD nos frutos onde

foram feitas perfurações (Figura 18), sendo que diretamente ligado ao fator presença de perfuração o isolados SJQ 2 se mostrou o mais patogênico, enquanto o isolado VCR o menos patogênico para as mesmas condições (Figura 19).

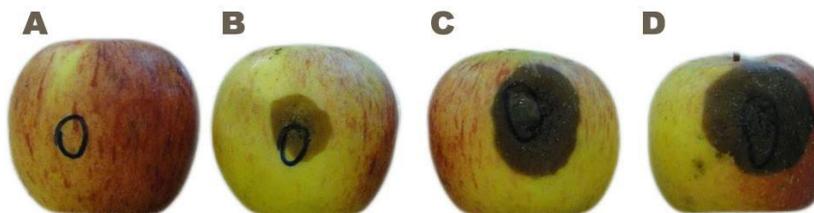


Figura 18 - Reação de frutos de macieira inoculados com *Colletotrichum* sp após duas semanas de incubação. A e B - inoculados sem a existência de perfurações. C e D - inoculados com a presença de perfurações. Foto: Morgana Elis Lopes.

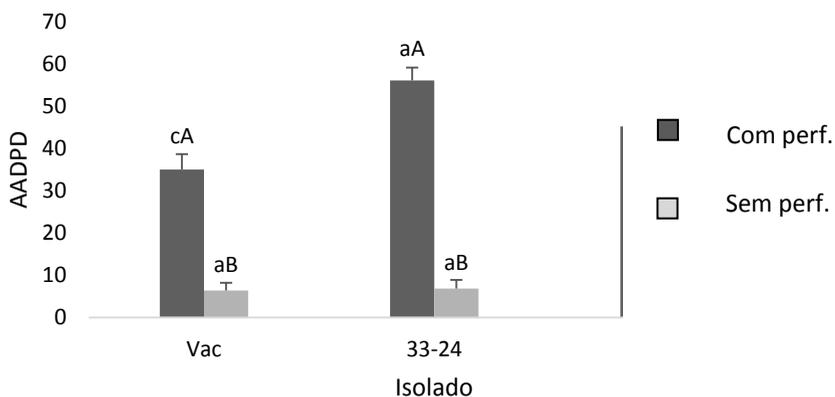


Figura 19 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores presença ou ausência de lesão e isolados de *Colletotrichum*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator presença ou ausência de lesão e maiúscula referente a resposta dos três isolados à presença ou ausência de lesão.

Os resultados acerca do isolado LGS 2 se mostrou mais ligado ao fator presença de perfuração, já o isolado VCR não esteve tão ligado a esse fator nessas mesmas condições. A

resposta dos isolados dos frutos não perfurados, não foi estatisticamente significativa em todos os fatores.

Todos os isolados foram capazes de acometer os frutos de maçã (variedades Fuji e Gala). Estatisticamente, apenas o isolado SJC apresentou diferença significativa ligado a sua patogenicidade nas duas variedades de maçã. A AACPD se mostrou maior na variedade Gala quando esta foi inoculada com o isolado SJC. A AACPD das variedades de maçã inoculados com os isolados VCR e LGS 2, não apresentaram diferença significativa (Figura 20).

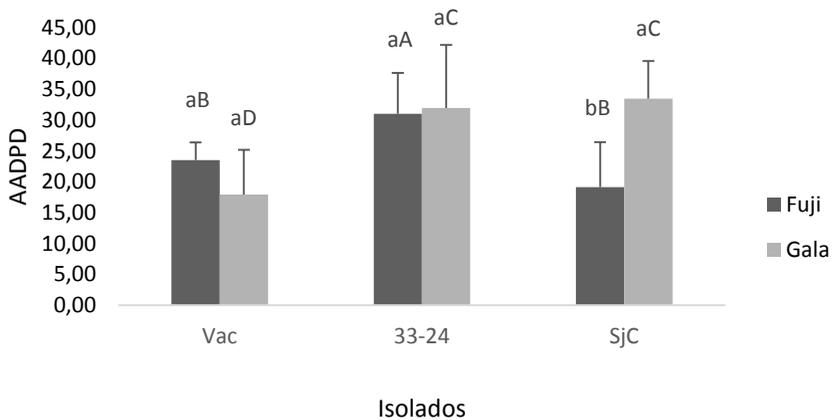


Figura 20 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores variedades Fuji e Gala, presença ou ausência de lesão e isolados de *Colletotrichum*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator variedades de maçã para a mesma condição de inoculação e maiúscula referente a resposta de cada variedade de macieira aos três isolados e aos métodos de inoculação.

A suscetibilidade das variedades de maçã variou bastante de acordo com presença e ausência de lesão e também de acordo com o isolado (Figura 21).

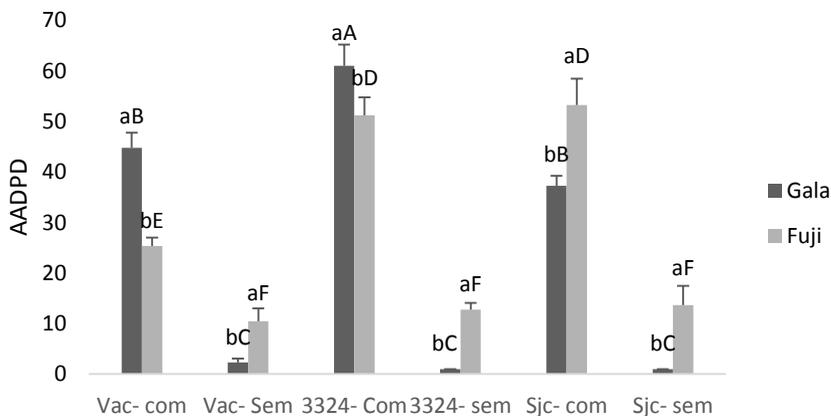


Figura 21 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a interação entre os fatores variedades Fuji e Gala, presença ou ausência de lesão e isolados de *Colletotrichum*. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para o fator variedades de maçã para a mesma condição de inoculação e maiúscula referente a resposta de cada variedade de macieira aos três isolados e aos métodos de inoculação.

(\*) - Com a presença de perfuração nos frutos;

(\*\*) - Sem a presença de perfuração nos frutos.

A resposta das variedades de maçã foi estatisticamente diferente em todos os casos. A variedade gala teve menor AACPD em todos os casos de frutos sem perfuração e em um caso de frutos com perfurações. Na interação, entre todos os fatores, apenas o isolado SJC mostrou diferença de patogenicidade, em frutos com perfuração, entre as duas variedades de maçã. Nesse caso o isolado SJC foi mais patogênico para a variedade Fuji.

De forma geral foi possível verificar que, em todos os casos, frutos que apresentavam perfuração foram mais acometidos que frutos sem a presença de perfurações. Segundo Souza (2011) a patogenicidade de um fungo está ligado a sua capacidade de se fixar na superfície da estrutura a ser infectada, de formar apressórios, como no caso no gênero *Colletotrichum*, bem como de colonizar os tecidos e se reproduzir. Não é possível, contudo, afirmar o motivo pelo qual a atividade do patógeno, no presente trabalho, foi mais intensa em frutos perfurados mas é

possível supor que essa resposta esteja ligada à maior facilidade que o patógeno encontrou de penetrar no fruto com a presença de ferimentos.

Em grande parte dos resultados foi possível verificar que os isolados que se mostraram mais patogênico nos frutos perfurados foram, entretanto, os menos patogênicos nos frutos não perfurados. Não é possível inferir acerca das atividades ligadas a esses resultados. Análises fisiológicas e anatômicas podem ser utilizadas como fonte de informações para os dados encontrados.

Em se tratando, diretamente, da especificidade dos isolados de *Colletotrichum* de goiabeira-serrana, pode-se afirmar que o patógeno encontrado em frutos de goiabeira-serrana foi capaz de infectar frutos de goiaba (*Psidium guajava*) e Maçã (*Malus domestica*), nesse contexto verifica-se, também, que o fungo causador de antracnose em frutos de goiabeira-serrana não é específico da mesma. Todos os frutos de maçã e goiaba foram acometidos pelo fungo, em níveis diferentes de severidade mas sempre ocorreu formação de lesão característica da doença.

Devido ao fato do patógeno ser capaz de infectar frutos de outras espécies é possível concluir que o mesmo não se caracteriza como formae speciales. A probabilidade do fungo isolado de frutos de goiabeira-serrana ser capaz de infectar uma gama ainda maior de espécies frutífera é bastante grande, o que o caracteriza como patógeno de ampla gama de hospedeiros.

A ampla gama de hospedeiros de um patógeno o caracteriza como um problema de sanidade de plantas ainda maior, uma vez que isso acarreta em necessidade de manejo e programa de controle de doenças. De acordo com Muniz *et al.* (1998) a grande variabilidade do gênero *Colletotrichum*, sugere a existência de grupos especializados, ou seja, espécies desse gênero que estão associadas à um único hospedeiro. Em testes de inoculação, contudo, percebeu-se que a capacidade de infecção de isolados de *Colletotrichum* é mais abrangente do que se supunha inicialmente.

### 6.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

#### 6.3.1 Índice de crescimento micelial

As médias dos índices de crescimento micelial dos 45 isolados de *Colletotrichum* sp. em Goiabeira-serrana, em suas 4 repetições, foram estatisticamente analisadas. Os valores de diâmetro das colônias foram submetidos a ANOVA (Tabela 6) e, posteriormente, as médias foram

submetidas ao teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% (Tabela 7).

Tabela 6 - Resumo da análise da variância para índice de crescimento micelial de 45 isolados, de *Colletotrichum* sp. repicados em meio BDA.

Fonte de variação	GL	QM	F	P
Isolados	45	1,15	4,63	0,00
Erro exp.	180	0,25		
Total	225			
CV	8,23%			

GL= graus de liberdade, CV(%)= Coeficiente de variação.

Ao término das medições das colônias (até que uma das 45 colônias de cada repetição alcançasse toda a placa), foi possível verificar diferenças, estatisticamente significativas, entre a velocidade de crescimento de alguns isolados (Figura 22). A média do diâmetro das colônias variou de 5,1 mm/dia a 7,4 mm/dia, sendo que os isolados da localidade de Fraiburgo (FRB 1, FRB 2, FRB 3, FRB 4, FRB 5, FRB 6, FRB 7) e os isolado SJQ 5, URU 2, PSM 1, ALZ e VSG, apresentaram o menor índice de crescimento micelial (ICM). Tais colônias, ao final do processo de avaliação, preenchiam um espaço consideravelmente menor que o ocupado pelas colônias com maior ICM. O isolado VCR, apresentou o maior índice de crescimento micelial, juntamente com os isolados CMB, LAM e LGS 3.

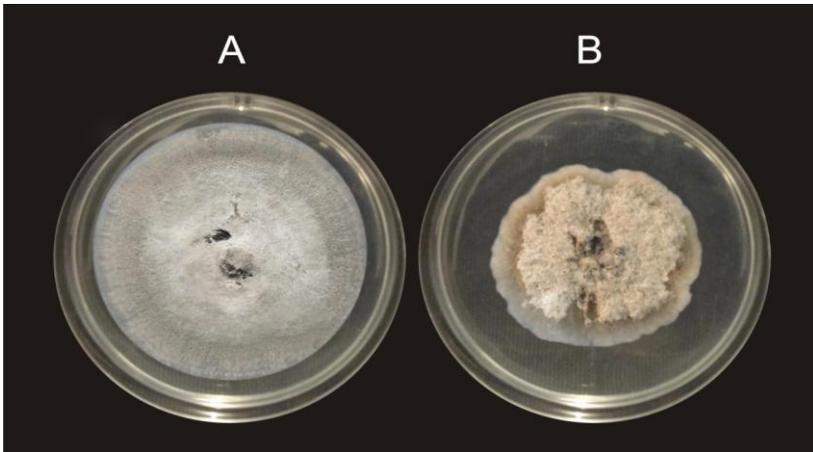


Figura 22 – Colônia micelial de dois isolados com o mesmo tempo de incubação. (A) - VCR e (B) URU 1. Foto: Morgana Elis Lopes.

Tabela 7 - Índice de crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. isolados de goiabeira-serrana e inoculados em meio BDA.

ISOLADOS	LOCALIDADE	ICM
FRB1	Fraiburgo	5,7 b
FRB2	Fraiburgo	5,6 b
FRB3	Fraiburgo	5,7 b
FRB4	Fraiburgo	5,5 a
FRB5	Fraiburgo	5,1 a
FRB6	Fraiburgo	5,8 b
FRB7	Fraiburgo	5,6 a
LGS4	Lages	6,4 c
LGS5	Lages	6,3 c
LGS3	Lages	6,7 d
LGS2	Lages	6,4 c
LGS1	Lages	6,5 c
LAM	Lages/Lambedor	6,7 d

SJQ8	São Joaquim	6,3 c
SJQ4	São Joaquim	6,5 c
SJQ6	São Joaquim	6,2 c
SJQ5	São Joaquim	5,4 a
SJQ7	São Joaquim	6,5 c
SJQ1	São Joaquim	6,0 b
SJQ3	São Joaquim	6,5 c
SJQ2	São Joaquim	6,2 c
CUT1	Curitibanos	5,8 b
CUT2	Curitibanos	6,0 c
URU1	Urubici	6,0 c
URU2	Urubici	5,2 a
UPM	Urupema	6,3 c
PSM4	Passos Maia	6,2 c
PSM5	Passos Maia	6,0 b
PSM6	Passos Maia	6,0 b
PSM3	Passos Maia	5,8 b
PSM2	Passos Maia	6,0 b
CMB	Cambara do Sul	6,7 d
SMC	São Marcos	6,2 c
MFR	Mafra	6,8 d
ITU	Ituporanga	6,5 c
SJC	São José do Cerrito	6,1 c
PSM1	Passos Maia	5,4 a
ALZ	Abelardo Luz	5,3 a
SND	Ipê/Sananduva	6,0 b
IPE1	Ipê	5,7 b

IPE2	Ipê	5,9 b
VSG	Ipê/Vila Segredo	5,3 a
PNL	Painel	5,8 b
RQM	Rancho Queimado	6,2 c
VCR	Vacaria	7,4 e

Os valores médios de crescimento micelial para *C. gloeosporioides* variam de 7 mm/dia a 11,4 mm/dia e para *C. acutatum* de 2,0 mm/dia a 4,5 mm/dia (SUTTON, 1992). O isolado VCR apresentou índice médio de crescimento micelial igual a 7,4 mm/dia, esse valor o classifica como *C. gloeosporioides*, segundo Sutton (1992). Os outros 44 isolados apresentaram valores médios de crescimento micelial inseridos na zona intermediária existente entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Sendo assim, os isolados presentes na zona intermediária não podem ser classificados e inserido em uma das duas espécies (*C. gloeosporioides* e *C. acutatum*), sabe-se contudo que os mesmos pertencem à uma das duas.

A variação entre o maior e o menos ICM foi relativamente pequena, contudo tanto os valores extremos quanto os intermediários levaram os isolados a serem inseridos em mais de um grupo do gênero *Colletotrichum*, exceto o isolado VCR. Peres et al., (2004) e Andrade et al., (2007) afirmaram que, por exemplo, isolados de *C. acutatum* costumam crescer mais lentamente quando comparado com o crescimento de *C. gloeosporioides*, sendo esses parâmetros amplamente utilizados na caracterização de fungos desse gênero. Estes mesmos autores afirmaram que a taxa de crescimento pode ser considerada uma das únicas características realmente estáveis para se fazer a caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* sp.

Destá forma o fato de 44 dos 45 isolados apresentarem índices médios de crescimento micelial inserido em uma região intermediária de duas espécies de *Colletotrichum*, faz com que os mesmos não possam ser agrupados e classificado a nível de espécie com maior exatidão. Devido ao fato da zona intermediária encontrada estar entre valores estabelecidos para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* e não indicar alguma outra espécie do gênero é possível afirmar que em se tratando do fator: Índice de crescimento micelial os isolados analisados, no presente trabalho, então inseridos nos padrões estabelecidos por Sutton (1992) como pertencentes as espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

### 6.3.2 Características culturais

Os 45 isolados, de *Colletotrichum* sp. ao final do período de caracterização, quanto ao índice de crescimento micelial, foram analisados segundo suas características culturais como: Topografia, cor do micélio aéreo, cor do reverso da colônia (fundo da placa de petri), presença/ausência de setores e cor de massa conidial (quando existente). Foram analisados os padrões em todas as 4 repetições de cada isolado (Tabela 8).

Tabela 8 - Padrões de topografia, cor do micélio aéreo, cor do reverso da colônia, presença/ausência de setores e cor de massa conidial, encontrados nos 45 isolados analisados

<b>Isolados</b>	<b>Topografia da colônia</b>	<b>Cor do micélio</b>	<b>Cor fundo de placa</b>	<b>Setor</b>	<b>Massa conidial</b>
FRB1	A, AI, D, F	Br	preto e salmão	Au	Au
FRB2	A, I, D, F	Br	creme escuro	Au	Au
FRB3	A, AI, D, F	Br	verde oliva e salmão	3	Au
FRB4	A, AI, D, C	Br	branco a creme	Au	Au
FRB5	A, B, D, C	Br	Creme	1	Au
FRB6	A, B, D, C	Br	verde e creme	Au	S
FRB7	A, I, M	Br	verde oliva, salmão	Au	Au
LGS4	A, I, M, F	BaC	salmão com pontuações pretas	Au	L
LGS5	A, I, M, F	Br	Salmão	Au	L
LGS3	A, AI, D, F	Br	salmão e preto	Au	AbC, L
LGS2	A, AI, M, F	Br	verde oliva e salmão	1	Au
LGS1	A, AI, D, F	Br	salmão e preto	Au	AbC, L
LAM	A, D, AI, C	BaC	salmão com	Au	S

pontuações pretas					
SJQ8	A, Al, M, F	Br	branco a salmão	Au	Au
SJQ4	A, Al, D, F	Br	branco a salmão	3	Au
SJQ6	A, M, D, F	Br	Creme	Au	Au
SJQ5	A, Al, D, C	Br	branco a creme	Au	Au
SJQ7	A, Al, D, C	Br	branco e creme	Au	Au
SJQ1	A, I, M, F	Br	branco a creme	Au	Au
SJQ3	A, Al, D, F	Br	creme e salmão	1	Au
SJQ2	A, Al, D, F	Br	verde oliva	Au	Au
CUT1	A, Al, D, F	Br	branco a creme	Au	Au
CUT2	A, Al, D, F	Br	branco a creme	Au	Au
URU1	A, Al, D, C	Br	creme com pontuações pretas	Au	Au
URU2	A, I, M, F	Br	verde oliva e salmão	Au	L
UPM	A, I	Br	salmão e marrom	3	AbC, L
PSM4	A, Al, D, F	Br	salmão com pontuações pretas	Au	Au
PSM5	A, Al, M, F	Br	creme e salmão	1	Au
PSM6	A, B, D, C	Br	branco a creme	Au	Au
PSM3	A, I, M	Br	verde oliva a salmão	3	Au
PSM2	A, Al, D, F	Br	branco a creme	Au	Au
CMB	A, I	Br	verde oliva	Au	Au
SMC	A, B, C	Br	Creme	Au	Au
MFR	A, B, D, C	Br	verde oliva	Au	Au
ITU	A, Al, D, F	Br	salmão com pontuações pretas	Au	Au

SJC	A, I, M	Br	verde oliva	Au	Au
PSM1	A, I, D, C	Br	creme	Au	Au
RQM	A, Al, M	Br	salmão e preto	Au	Au
ALZ	A, Al, D F	Br	verde oliva e salmão	1	L
IPE1	A, Al, D, F	Br	branco a creme	Au	Au
IPE2	A, Al, D, F	Br	branco a creme	2	Au
PNL	A, B, D, C	Br	Branco	Au	Au
VCR	A, B, D, C	Br	branco	Au	Au
SND	A, Al, D, F	Br	branco a verde	Au	Au
VSG	A, I, M, F	Br	verde e salmão	Au	Au

Topografia do micélio : **A** - Aéreo , **Al** - alto, **B** - Baixo , **I** - Intermediário, **D** - denso, **M** - Médio, **C**-Cotonoso , **F**- floculoso;

Coloração do micélio: **Br** - Branco e **BaC** - Branco à cinza;

Setor: **Au** - Ausente; os números indicaram quantos setores foram formados na colônia;

Massa Conídial : **Au** - ausente, **L** - laranja , **S** - salmão, **AbC** - Abundante no centro e **Ab** -abundante.

Todos as 45 colônias apresentaram formação de micélio aéreo, dessas um total de 25 apresentaram micélio aéreo alto, 13 isolados apresentaram micélio aéreo intermediário e 7 apresentaram micélio aéreo baixo (Figura 23). Os isolados com micélio aéreo baixo apresentaram um crescimento denso desse micélio, ou seja, o crescimento micelial mesmo baixo era uniforme em toda a colônia. e de aparência cotonosa. Os 13 isolados que apresentaram micélio aéreo intermediário e os 25 que apresentaram micélio aéreo alto variaram o crescimento de seus micélios em denso e médio, ou seja, os micélio tomava uniformemente toda a colônia ou cresceu apenas em regiões esparsas, respectivamente. Estes variaram também em cotonoso e floculoso quanto ao aspecto do micélio desenvolvido.

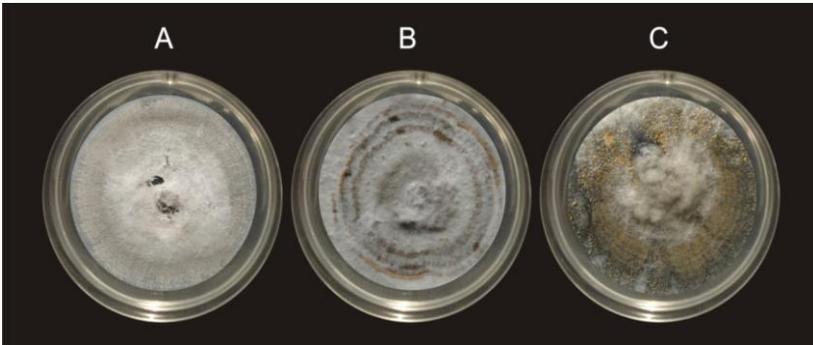


Figura 23 - Padrões de micélio aéreo: (A) Alto, (B) Intermediário e (C) Baixo, encontrados respectivamente nos isolados LGS 2, FRB 2 e FRB 6. Foto: Morgana Elis Lopes.

Verificou-se que a maioria dos isolados não apresentou formação de setores; isso se deve, provavelmente, ao fato das colônias analisadas serem monospóricas nas quais ocorre menor variabilidade. A análise de setores bem como as outras variáveis culturais foram feitas através de análise visual. Os setores quando presentes foram apenas contados, não sendo caracterizado uma vez que por muitas vezes a região setorial apresentava crescimento micelial e coloração diferenciada (Figura 24). Sendo considerado setor a menor região que se destacou por características bastante diferentes da encontrada na maior região da colônia. Não ocorreu nenhum padrão entre as colônias que apresentaram formação de setores.

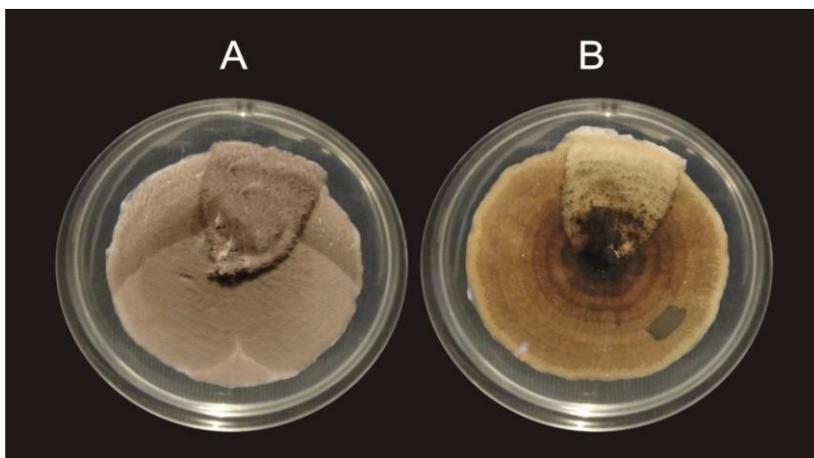


Figura 24 - Setor formado no isolado SJQ 3: (A) - Setor na parte superior da placa de petri e (B) - Setor no reverso da placa de petri. Foto: Morgana Elis Lopes.

Os isolados, na sua grande maioria, não apresentaram concentração de massa conidial, pois as colônias foram analisadas ao final de 8 dias (período em que pelo menos uma colônia da repetição havia tomado toda a placa) (SMITH, 1990), após a inoculação, sendo esse um período considerado ainda curto para o aparecimento de grandes concentrações conidiais. Os isolados que apresentaram essas esporulações o fizeram na coloração laranja (Figura 25) ou salmão, alguns em toda a placa e outros apenas no centro da colônia. *Colletotrichum acutatum* costuma esporular mais que outras espécies (VINNERE, 2004) contudo, com base nesta característica é possível levantar a hipótese de que isolados dessa espécie estão presente entre os analisados. A formação de massa conidial está diretamente ligada com a capacidade de esporulação do patógeno mas não, necessariamente, com a sua patogenicidade. Sendo assim, o fato de algumas espécies de *Colletotrichum* esporularem mais que outras, em condições semelhantes, possibilita levantar hipóteses quanto as espécies em questão.

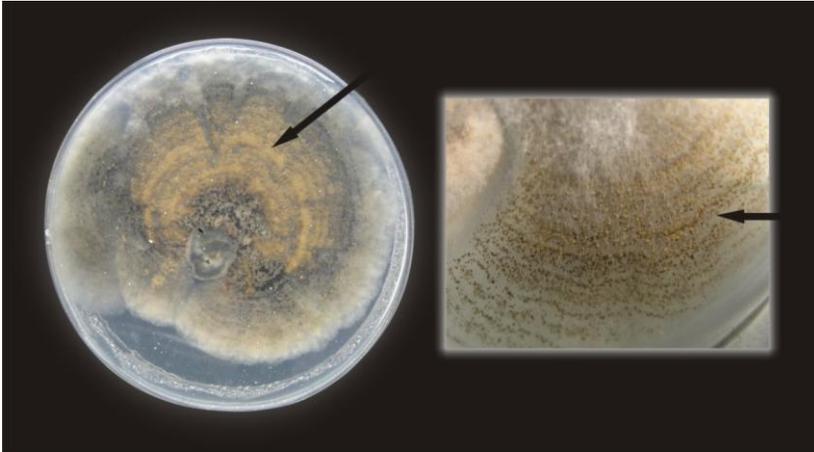


Figura 25 - Massa conidial (na cor laranja) visível no reverso e na parte superior da colônia, no isolado URU 2. Foto: Morgana Elis Lopes.

Todos os isolados apresentaram cor de micélio aéreo branco, exceto os isolados LGS 4 e LAM que apresentaram coloração branco acinzentada. A cor das colônias, no seu reverso, teve uma ampla variação não seguindo algum padrão que possa agrupar os isolados por similaridade. A quantidade relativamente grande de padrões de topografia e colorações encontrados nas colônias, se deve ao fato do gênero *Colletotrichum* apresentar, como visto em alguns trabalhos semelhantes, grande diversidade para estas características. A identificação de topografia e colorações, apresentadas pela colônia, também, se mostram importantes como parte de um conjunto de dados morfológicos que auxiliarão na identificação do patógeno a nível de espécie.

As análises culturais dos 45 isolados de *Colletotrichum* sp. proporcionaram um maior e melhor conhecimento da aparência visual das colônias, esse fator se mostra importante uma vez que é possível visualizar algumas características referente ao desenvolvimento do patógeno. Não foi possível, entretanto, a formação de padrões agrupamento por similaridade de características culturais, sendo assim esses dados se mostram como fonte de conhecimento sobre a conformação da colônia e possivelmente fonte de embasamento para caracterização do patógeno quando compilado com outros resultados obtidos.

Os padrões encontrado para os 45 isolados nas variáveis de ICM e características culturais, mostram-se compatíveis com padrões,

estabelecidos pela literatura para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. A confirmação da hipótese da existência dessas duas espécies, para os 45 isolados no presente trabalho, poderá ser feita posteriormente através de análises de caracterização molecular.

### 6.3.3. Comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios

As medidas de comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) dos conídios, foi realizada obtendo-se a média de 20 conídios em cada uma das 5 lâminas preparadas (totalizando 100 conídios avaliados), que constituíram 5 avaliações para cada um dos 45 isolados de *Colletotrichum* sp.. Assim para cada isolado foram obtidos cinco valores referente ao C, L e C/L de conídios. Posteriormente os valores foram submetidos à Análise de Variância (Tabela 9) e as médias foram submetidas ao teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% (Tabela 10).

Tabela 9 - Resumo da análise da variância para as variáveis comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios dos 45 isolados de *Colletotrichum* sp. em goiabeira-serrana.

Fonte de variação	GL	QMC	QML	QMCL
Isolados	44	7,8*	0,92*	0,43*
Erro exp.	180	0,43	0,13	0,025
<b>Total</b>	224			
<b>CV(%)</b>		3,84	7,66	4,41

GL= graus de liberdade, CV(%)= Coeficiente de variação.

C - comprimento, L - largura e CL - relação comprimento largura

Tabela 10 - Teste de separação de médias para comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) dos conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. em goiabeira-serrana.

<b>ISOLADOS</b>	<b>LOCALIDADE</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>C/L</b>
FRB1	Fraiburgo	16,4 c	4,4 b	3,6 e
FRB2	Fraiburgo	16,0 c	4,4 b	3,6 e
FRB3	Fraiburgo	17,6 e	5,0 c	3,6 e
FRB4	Fraiburgo	16,8 d	4,4 b	3,7 e
FRB5	Fraiburgo	17,0 d	4,2 a	3,9 f
FRB6	Fraiburgo	17,8 e	5,0 c	3,4 d
FRB7	Fraiburgo	15,4 c	4,8 c	3,4 d
LGS4	Lages	18,0 e	5,0 c	3,6 e
LGS5	Lages	15,0 b	4,2 a	3,4 d
LGS3	Lages	17,6 e	4,6 b	3,8 f
LGS2	Lages	18,2 f	5,0 c	3,7 e
LGS1	Lages	17,4 e	4,4 b	3,9 f
LAMB	Lages/Lambedor	17,2 d	4,4 b	3,8 f
SJQ8	São Joaquim	17,5 e	5,0 c	3,5 d
SJQ4	São Joaquim	17,6 e	5,0 c	3,4 d
SJQ6	São Joaquim	19,4 g	5,0 c	3,7 e
SJQ5	São Joaquim	14,2 a	5,0 c	3,1 b
SJQ7	São Joaquim	18,8 f	5,6 c	3,4 d
SJQ1	São Joaquim	16,0 c	4,4 b	3,5 d
SJQ3	São Joaquim	17,6 e	5,2 c	3,3 c
SJQ2	São Joaquim	16,4 c	4,4 b	3,6 e
CUT1	Curitibanos	16,6 c	5,2 c	3,3 c
CUT2	Curitibanos	16,8 d	5,0 c	3,3 c
URU1	Urubici	17,0 d	4,0 a	3,8 f

URU2	Urubici	18,0 e	5,2 c	3,4 d
UPM	Urupema	16,4 c	4,0 a	4,0 g
PSM4	Passos Maia	17,6 e	5,0 c	3,8 e
PSM5	Passos Maia	17,2 d	4,8 c	3,7 e
PSM6	Passos Maia	17,2 d	5,0 c	3,4 d
PSM3	Passos Maia	17,8 e	5,0 c	3,6 e
PSM2	Passos Maia	18,4 f	5,4 c	3,4 d
CMB	Cambara do Sul	18,6 f	5,0 c	3,9 f
SMC	São Marcos	14,2 a	5,6 c	2,5 a
MFR	Mafra	17,6 e	5,0 c	3,7 e
ITU	Ituporanga	17,8 e	4,6 b	3,9 f
SJC	São José do Cerrito	17,8 e	5,0 c	3,4 d
PSM1	Passos Maia	18,4 f	5,0 c	3,7 e
RQM	Rancho Queimado	19,2 g	5,2 c	3,6 e
ALZ	Abelardo Luz	17,6 e	5,0 c	3,7 e
IPE1	Ipê	17,4 e	4,0 a	3,9 f
IPE2	Ipê	17,8 e	4,6 b	3,7 f
PNL	Painel	16,0 c	5,0 c	3,3 c
VCR	Vacaria	13,8 a	4,0 a	3,2 c
SND	Ipê/Sananduva	17,8 e	4,6 b	3,9 f
VSG	Ipê/Vila Segredo	18,2 f	4,0 a	4,2 g

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não são estatisticamente diferentes.

Os isolados URP, LGS5, FRB1, FRB2, FRB7, SJQ1, SJQ2, SJQ5, SMC, PNL e VCR, apresentaram comprimento

médio de conídios inferior aos outros isolados. Os conídios de SJQ5, VCR e SMC diferem-se estatisticamente dos outros isolados por serem ainda menores que os demais, contudo, os mesmos podem ser inseridos em um mesmo grupo segundo Sutton (1992). Os conídios do grupo tiveram o comprimento médio, variando de 13,7 $\mu\text{m}$  a 16,4 $\mu\text{m}$ , o que os enquadraria na faixa de tamanho proposta por Sutton (1992) para *Colletotrichum acutatum*. Os outros isolados apresentaram crescimento, em comprimento, mais elevado, sendo que os valores variaram de 16,6  $\mu\text{m}$  a 18,8  $\mu\text{m}$ . Segundo Sutton (1992) os conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* variam de 17,0 $\mu\text{m}$  a 24,0 $\mu\text{m}$ , assim os isolados que neste trabalho tiveram crescimento maior, os quais podem ser enquadrados em *C. gloeosporioides*. Mesmo apresentando diferenças estatísticas entre si, os isolados que apresentaram valores na referida faixa podem ser inseridos em um mesmo grupo a nível de espécie desse patógeno.

O isolado CUR 1, apresentou média que se insere na zona intermediária de classificação para as duas espécies. Sendo assim o mesmo não pode ser inserido, de forma inequívoca, em nenhum dos dois grupos anteriormente citados. A média dos valores para largura dos conídios variaram de 4,01  $\mu\text{m}$  a 5,62  $\mu\text{m}$ . Para Sutton (1992) conídios de *C. gloeosporioides* apresentam valores de largura variando de 3,5 $\mu\text{m}$  a 6,0 $\mu\text{m}$ , enquanto que *C. acutatum* apresenta largura de conídios variando de 2,5 $\mu\text{m}$  a 4,0 $\mu\text{m}$ . Mesmo que os isolados apresentem diferenças estatisticamente significativas entre si é possível visualizar que, segundo Sutton (1992), todos os 45 isolados, em termos de largura, seriam inseridos no grupo classificado como *C. gloeosporioides*.

Como se observa, há uma faixa de sobreposição entre as dimensões de largura propostas para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, o que pode gerar dúvidas no momento de classificar os isolados nessas duas espécies. No presente trabalho isso foi constatado para o isolado UPM da localidade de Urupema, sendo assim o mesmo não poderia ser inserido em nenhum dos grupos de classificação a nível de espécie. De forma semelhante ao que ocorreu nesse trabalho, Tozze (2007) observou que isolados de *Colletotrichum* sp., oriundos de pimentão (*Capsicum annum*), apresentaram alta variabilidade e houve sobreposição nas dimensões dos conídios descritos para as espécies. Contudo, mesmo que não seja possível diferenciar de forma não ambígua esses conídios em *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, as dimensões obtidas no presente trabalho estão dentro das descritas para essas duas espécies.

Andrade et al. (2007), caracterizando *Colletotrichum* do mamoeiro, também constataram que a classificação de espécies por

dimensão de conídios foi dificultada pela sobreposição dos valores descritos por Sutton (1992), pois a maioria dos isolados do mamão apresentou dimensões dentro da faixa de sobreposição descrita, o que ocorreu também no presente trabalho.

As médias de relação C/L dos conídios variaram de 2,5  $\mu\text{m}$  a 4,1  $\mu\text{m}$ , sendo o isolado SMC o que apresentou menor relação C/L. Exceto esse isolado, todos os outros, que variaram de 3,06  $\mu\text{m}$  a 4,1  $\mu\text{m}$ , enquadram-se no grupo *C. gloeosporioides* (SUTTON, 1992). Sendo assim, no que diz respeito a análise de conídios, pode-se dizer que grande parte dos isolados possuem padrões que, segundo a literatura, os classificam como *C. gloeosporioides*. Vários isolados, quando analisados separadamente, no parâmetro C e L enquadram-se na faixa de sobreposição dos valores e não apresentaram diferença significativa entre si. Esse tipo de resultado faz com que os mesmos possam ser inseridos de forma equivocada em uma ou outra espécie de *Colletotrichum*. No entanto, sabe-se que estes estão na faixa de tamanho proposta para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Outras variáveis poderão auxiliar no enquadramento dos isolados nas respectivas espécies, como por exemplo, análises genômicas.

#### **6.3.4.Formato dos conídios**

As imagens utilizadas para as análises de comprimento e largura dos conídios, foram utilizadas para a análise dos mesmos quanto ao seu formato. Conforme os resultados obtidos pode-se verificar que, os conídios mostraram-se hialinos e sem ocorrência de desidratação. Cada um dos 100 conídios medidos foram também classificados quanto ao seu formato, onde foram encontrados esporos de formato cilíndrico ou fusiforme. Segundo Sutton (1992), conídios de *C. gloeosporioides* possuem formato cilíndrico com as duas extremidades mais arredondadas (Figura 26 - A), já os conídios de *C. acutatum* apresentam formato fusiforme com as ou uma das extremidades mais afuniladas (Figura 26 - B).

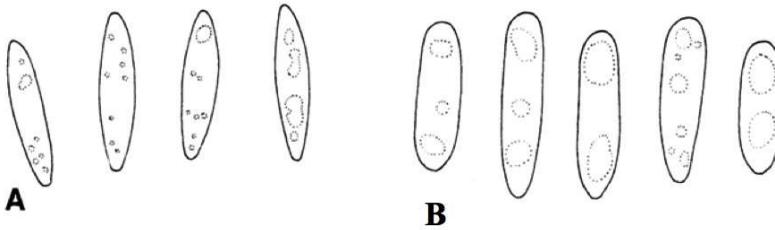


Figura 26 - Formatos de conídios propostos por Sutton (1998). **(A)** conídios fusiformes e com extremidades afiladas e **(B)** conídios cilíndricos com extremidade arredondada. Fonte: Sutton (1998)

Esses dois padrões de formato foram os encontrados no presente trabalho, a ocorrência de isolados com morfologia intermediária citada por Vinnere (2004) indica que mesmo que exista uma predominância de algum dos dois padrões de formato, sabe-se que podem ocorrer uma grande variação no formato dos conídios no decorrer do desenvolvimento da colônia (Figura 27).

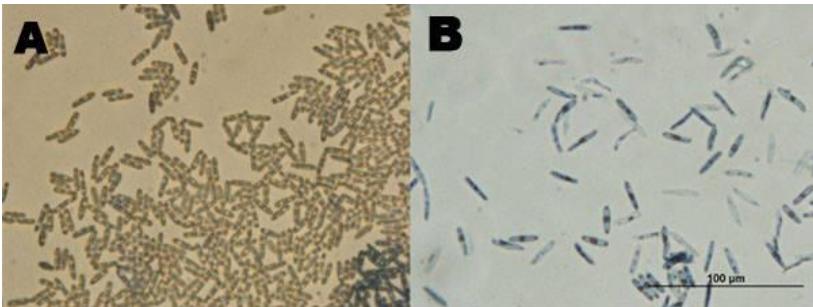


Figura 27 - **(A)** Presença conídios cilíndricos do isolado SJQ 1 e **(B)** Presença de conídios cilíndricos e fusiformes do isolado PSM 3.

Os isolados de *Colletotrichum* sp. de goiabeira-serrana apresentaram a formação dos dois tipos de conídios em todos os 45 isolados, variando apenas na porcentagem de ocorrência dos mesmos. Os conídios cilíndricos foram encontrados em todos os isolados e em maior quantidade, variando de 52% a 93% dos conídios analisados. Os conídios fusiformes ocorreram em menor número por isolado variando de 7% a 48% dos conídios analisados (Tabela 11). A variação no formato dos conídios, como citado anteriormente, pode variar de acordo

com alguns fatores no padrão de desenvolvimento da colônia como umidade e temperatura. Assim possíveis afilamentos em conídios cilíndricos, devido a esses fatores, podem levar à uma classificação equivocada. Mesmo que o formato dos conídios se assemelhe ao descrito por Sutton (1992) para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, a ocorrência de estruturas com formato intermediário faz com que esse parâmetro, isoladamente, tenha baixo nível de confiabilidade na caracterização de fungos. A utilização de análises genéticas, juntamente com os dados fornecidos pela caracterização morfológica podem ser utilizados para resolver as dúvidas e, assim, aumentar a confiabilidade da caracterização do patógeno (VINNERE, 2004).

Tabela 11 - Índice (%) de ocorrência de cada formato de apressório encontrado nos 45 isolados.

<b>ISOLADO</b>	<b>CILÍNDRICO</b>	<b>FUSIFORME</b>
FRB1	76	24
FRB2	84	16
FRB3	72	28
FRB4	91	9
FRB5	69	31
FRB6	70	30
FRB7	88	12
LGS4	60	40
LGS5	90	10
LGS3	68	32
LGS2	83	17
LGS1	82	18
LAM	93	7
SJQ8	77	23
SJQ4	73	27
SJQ6	81	19
SJQ5	85	15

SJQ7	79	21
SJQ1	90	10
SJQ3	88	12
SJQ2	76	24
CUT1	58	42
CUT2	62	38
URU1	52	48
URU2	64	36
UPM	53	47
PSM4	76	24
PSM5	80	20
PSM6	78	22
PSM3	69	31
PSM2	57	43
CMB	90	10
SMC	75	25
MFR	79	21
ITU	84	16
SJC	60	40
PSM1	55	45
RQM	87	13
ALZ	69	31
IPE1	93	7
IPE2	82	18
PNL	76	24
VCR	85	15
SND	93	7
VSG	80	20

### 6.3.5. Comprimento, largura e relação comprimento/largura de apressórios.

As medidas de comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) dos apressórios, foi realizada obtendo-se a média de 20 apressórios em cada uma das 5 lâminas preparadas a partir das 5 repetições, ou seja, a média de 100 apressórios para cada um dos 45 isolados de *Colletotrichum* sp. Assim para cada isolado foram obtidos 5 valores relacionados ao C, L e C/L de apressórios. Posteriormente os valores foram submetidos à análise de variância (Tabela 12) e as médias foram submetidas ao teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% (Tabela 13).

Tabela 12 - Resumo da análise da variância para comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) de apressório dos isolados de *Colletotrichum* sp. de goiabeira-serrana.

Fonte de variação	GL	QMC	QMI	QMC/ L
<b>Isolados</b>	44	7,37	2,7	0,03
<b>Erro exp.</b>	180	0,6	0,3	0,003
<b>Total</b>	224			
<b>CV(%)</b>		0,09	0,08	4,34

GL= graus de liberdade, CV(%)= Coeficiente de variação.

Tabela 13- Teste de separação de médias para comprimento (C), largura (L) e relação comprimento/largura (C/L) dos apressórios de isolados de *Colletotrichum* sp. em goiabeira-serrana.

ISOLADOS	LOCALIDADE	COMPRIMENTO	LARGURA	RELAÇÃO
FRB1	Fraiburgo	8,2 b	16,4 c	1,2 b
FRB2	Fraiburgo	8,8 c	16,0 c	1,3 c
FRB3	Fraiburgo	8,6 c	17,6 e	1,2 b
FRB4	Fraiburgo	10,8 e	16,8 d	1,5 e

FRB5	Fraiburgo	9,2 c	17,0 d	1,2 b
FRB6	Fraiburgo	9,8 d	17,8 e	1,3 c
FRB7	Fraiburgo	10,0 d	15,4 c	1,3 c
LGS4	Lages	8,6 c	18,0 e	1,2 b
LGS5	Lages	8,0 b	15,0 b	1,2 b
LGS3	Lages	8,4 b	17,6 e	1,3 b
LGS2	Lages	7,6 a	18,2 f	1,2 a
LGS1	Lages	9,0 c	17,4 e	1,3 c
LAM	Lages/Lambedor	9,6 d	17,2 d	1,3 b
SJQ8	São Joaquim	8,5 b	17,5 e	1,3 b
SJQ4	São Joaquim	8,4 b	17,6 e	1,2 a
SJQ6	São Joaquim	10,8 e	19,4 g	1,3 c
SJQ5	São Joaquim	8,0 b	14,2 a	1,3 c
SJQ7	São Joaquim	8,0 b	18,8 f	1,3 c
SJQ1	São Joaquim	7,8 b	16,0 c	1,2 b
SJQ3	São Joaquim	9,0 c	17,6 e	1,2 b
SJQ2	São Joaquim	9,6 d	16,4 c	1,3 c
CUT1	Curitibanos	7,2 a	16,6 c	1,3 c
CUT2	Curitibanos	7,2 a	16,8 d	1,4 d
URU1	Urubici	9,0 c	17,0 d	1,3 c
URU2	Urubici	9,2 c	18,0 e	1,3 c
UPM	Urupema	10,4 e	16,4 c	1,4 d
PSM4	Passos Maia	8,8 c	17,6 e	1,3 c
PSM5	Passos Maia	8,8 c	17,2 d	1,3 c
PSM6	Passos Maia	7,0 a	17,2 d	1,1 a
PSM3	Passos Maia	8,4 b	17,8 e	1,3 b
PSM2	Passos Maia	7,2 a	18,4 f	1,2 a
CMB	Cambara do Sul	7,2 a	18,6 f	1,2 a
SMC	São Marcos	7,8 b	14,2 a	1,1 a
MFR	Mafra	8,0 b	17,6 e	1,2 a
ITU	Ituporanga	10,0 d	17,8 e	1,3 c
SJC	São José do Cerrito	9,6 d	17,8 e	1,2 b

PSM1	Passos Maia	9,0 c	18,4 f	1,2 b
	Rancho			
RQM	Queimado	9,6 d	19,2 g	1,2 b
ALZ	Abelardo Luz	9,8 d	17,6 e	1,3 c
IPE1	Ipê	8,8 c	17,4 e	1,2 b
IPE2	Ipê	9,0 c	17,8 e	1,3 b
PNL	Painel	10,8 e	16,0 c	1,4 c
VCR	Vacaria	8,6 c	13,8 a	1,3 a
SND	Ipê/Sananduva	8,4 b	17,8 e	1,3 b
VSG	Ipê/Vila Segredo	7,6 a	18,2 f	1,2 a

---

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não são estatisticamente diferentes

Conforme os resultados obtidos, pode-se verificar que as dimensões dos isolados analisados variaram de 7,0  $\mu\text{m}$  a 18,6  $\mu\text{m}$  para comprimento, de 4,0  $\mu\text{m}$  a 7,9  $\mu\text{m}$  para largura e de 1,13  $\mu\text{m}$  a 1,48  $\mu\text{m}$  para relação C/L de seus apressórios. Segundo Sutton (1992) os valores para comprimento e largura de apressórios se mostra bastante abrangente, sendo assim a zona de sobreposição entre os valores de cada espécie é bastante ampla. Os isolados UMP, LGS2, LGS3, LGS5, FRB1, FRB4, FRB5, SJQ1, SJQ3, SJQ6, SJQ7, PNL, SND, VSG, PMS2, PMS3, PMS5, PMS6, CMB, SMC e MFR, não apresentaram valores inseridos no intervalo de sobreposição para as médias de comprimento e largura. Os apressórios desses isolados variaram, em relação ao comprimento, de 7,0  $\mu\text{m}$  a 18,6  $\mu\text{m}$  e de 6,15  $\mu\text{m}$  a 7,9  $\mu\text{m}$  para as médias de largura. Segundo Sutton (1992), essa amplitude de variação faz com que esses 21 isolados possam ser classificados, segundo esses parâmetros, como *C. gloeosporioides*. Os outros isolados apresentaram pelo menos uma das variáveis inserida na zona de sobreposição isso faz com que os mesmos não possam ser agrupados e classificados categoricamente, quanto a essas características. Para Vinnere (2004), os apressórios já foram bastante utilizado na caracterização do gênero *Colletotrichum*. Contudo, devido a amplitude da zona de sobreposição, os valores das características

morfológicas dos apressórios, atualmente, são consideradas de baixa capacidade de classificação para esse patógeno.

### 6.3.6. Formato dos apressórios

As imagens usadas para a realização das análises referente ao comprimento dos apressórios foram, também, utilizadas para a classificação dos mesmos quanto ao seu formato sendo utilizados os mesmos 100 apressórios medidos. Segundo Sutton (1992), os apressórios de *C. gloeosporioides* são levemente maiores que os de *C. acutatum* e estes podem variar entre clavados, globosos e irregulares (Figura 28). Todos os isolados apresentaram apressórios globosos e clavados variando apenas em qual ocorreu com maior frequência. Os isolados LGS3, SJQ3, RNL e VCR apresentaram somente apressórios globosos e clavados.

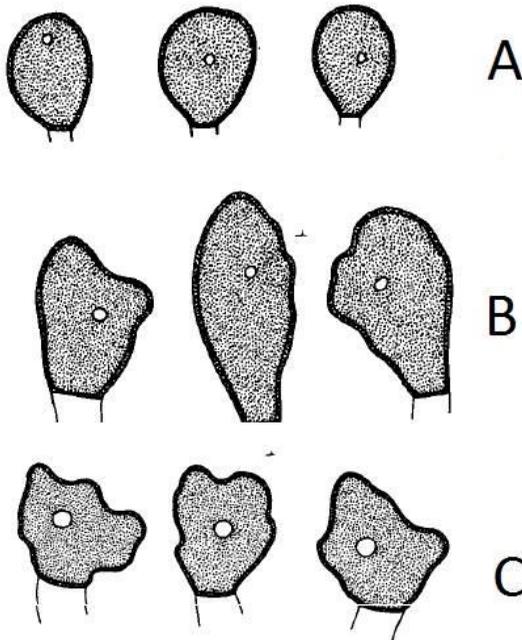


Figura 28 - Formato dos apressórios propostos por Sutton (1998). (A) Apressório clavado, (B) Apressório globoso e (C) apressório irregular. Fonte: Sutton (1998).

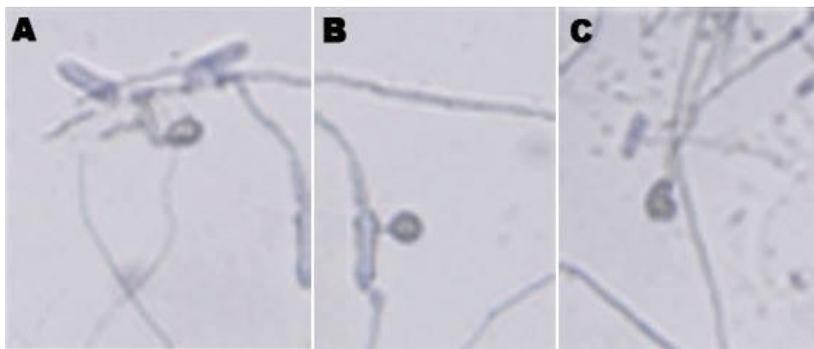


Figura 29 - Formato dos apressórios (A) Apressório clavado, (B) Apressório globoso e (C) apressório irregular, presentes no isolado FRB7. Foto Morgana Lopes

Os apressórios globosos ocorreram em todos os isolados, variando de 2% a 82%. Os apressórios com formato clavado também foram encontrados em todos os isolados ocorrendo de 18% a 74%. Já os apressórios classificados como irregulares ocorreram em 41 dos 45 isolados, variando sua ocorrência de 2% a 78% (Tabela 14), não sendo encontrado nos isolados LGS 5, SJQ 3, PNL e VCR. Não foi possível estabelecer um padrão de ocorrência para a variável formato de apressórios. Segundo Sutton (1992) *C. gloesporioides* apresenta apressórios mais irregulares quando comparado com *C. acutatum*, contudo é esperado a ocorrência de apressórios globosos e clavados em ambos os casos. Mesmo com uma maior regularidade estrutural dos apressórios de *C. acutatum*, segundo a literatura, esse fator, sozinho, não se mostra com capacidade suficiente para agrupamento e diferenciação de isolados de *Colletotrichum* sp.. Vinnere (2004) cita que a análise do formato de apressórios já foi frequentemente utilizado no estudo taxonômico de *Colletotrichum* sp. Percebe-se, entretanto, que devido ao fato da grande semelhança entre os apressórios encontrados, esse critério não se mostra suficiente para classificar os isolados, quando visualizado isoladamente. Esses dados necessitam ser compilados com fatores mais estáveis como índice de crescimento micelial e análises genéticas.

Tabela 14 - Índice (%) de ocorrência de cada formato de apressório encontrado nos 45 isolados de *Colletotrichum* sp. de goiabeira-serrana.

<b>ISOLADO</b>	<b>GLOBOSO(%)</b>	<b>CLAVADO(%)</b>	<b>LOBULADO(%)</b>
FRB1	45,00	47,00	8,00
FRB2	24,00	68,00	8,00
FRB3	36,00	54,00	10,00
FRB4	16,00	62,00	22,00
FRB5	38,00	22,00	40,00
FRB6	28,00	64,00	8,00
FRB7	28,00	51,00	21,00
LGS4	20,00	60,00	20,00
LGS5	55,00	45,00	0,00
LGS3	40,00	56,00	4,00
LGS2	69,00	23,00	8,00
LGS1	16,00	44,00	40,00
LAM	10,00	36,00	54,00
SJQ8	46,00	48,00	6,00
SJQ4	38,00	54,00	8,00
SJQ6	12,00	70,00	18,00
SJQ5	29,00	67,00	4,00
SJQ7	22,00	70,00	8,00
SJQ1	49,00	45,00	6,00
SJQ3	70,00	30,00	0,00
SJQ2	28,00	43,00	29,00
CUT1	24,00	74,00	2,00
CUT2	32,00	58,00	10,00
URU1	32,00	54,00	14,00

URU2	62,00	32,00	6,00
UPM	38,00	23,00	39,00
PSM4	24,00	52,00	24,00
PSM5	34,00	50,00	16,00
PSM6	66,00	32,00	2,00
PSM3	48,00	50,00	2,00
PSM2	62,00	34,00	4,00
CMB	53,00	20,00	27,00
SMC	47,00	49,00	4,00
MFR	46,00	48,00	6,00
ITU	58,00	38,00	4,00
SJC	2,00	20,00	78,00
PSM1	34,00	50,00	16,00
RQM	58,00	40,00	2,00
ALZ	26,00	44,00	30,00
IPE1	25,00	65,00	10,00
IPE2	28,00	56,00	16,00
PNL	80,00	20,00	0,00
VCR	82,00	18,00	0,00
SND	44,00	52,00	4,00
VSG	49,00	35,00	16,00

---

## 7. CONCLUSÃO

Com a realização dos postulados de Koch foi possível confirmar a presença de antracnose nos frutos de goiabeira-serrana coletados. Esse procedimento possibilitou, também, verificar que o patógeno é capaz de infectar o fruto independente da forma de inoculação. As características morfológicas possibilitaram confirmar mais uma vez o desenvolvimento característico de colônias do gênero *Colletotrichum*. As análises morfológicas permitiram restringir o número de espécies possíveis para os 45 isolados em apenas duas, uma vez que o intervalo de dimensões encontrados para índice de crescimento micelial, comprimento e largura de conídios e apressórios se enquadra nos valores estipulados para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*. Essa afirmação é possível mesmo com a existência de uma grande faixa de sobreposição para os valores destes parâmetros

Os dados culturais como coloração, topografia micelial, presença de setores e massa conidial corroboram com a confirmação das características do gênero e com a inserção dos 45 isolados nas duas espécies citadas anteriormente. A pouca formação de setores e massa conidial confirma a pouca variabilidade genética encontrada nos isolados e reafirma a necessidade da realização de isolados monospóricos para as análises de caracterização de fungos.

A realização de testes de patogenicidade mostrou que isolados possuem diferentes níveis de agressividade e que alguns acessos de goiabeira-serrana mostraram-se mais suscetíveis que outras, tendo como parâmetro os 4 acessos utilizados nesse trabalho. A capacidade dos isolados de infectar frutos de macieira e goiabeira serrana mostrou que os isolados não podem ser ditos *Formae speciales*. A possibilidade de o patógeno ter uma vasta gama de hospedeiros o classifica como de grande perigo fitossanitário.

Os resultados obtidos com a caracterização, testes de patogenicidade e especificidade no presente trabalho contribuirão estudos futuros visando a obtenção de variedades resistentes de goiabeira-serrana ou mesmo de programas de controle da doença.



## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a conclusão dos processos de caracterização dos isolados de *Colletotrichum* em goiabeira-serrana, é possível enumerar alguns pontos como perspectivas futuras. A elucidação de algumas questões e a obtenção de informações adicionais sobre a atividade do patógeno e o comportamento da planta acometida se mostrará bastante importante, bem como:

1 - Análises genômicas de sequências que permitam a identificação de espécies;

2 - Estudos de possíveis genes de resistência, sua localização e como podem ser utilizados em programa de melhoramento genético;

3 - Análise da diversidade do patógeno através de marcadores microssatélites;

4- Análise de possíveis rotas metabólicas que levem à indução de resistência da planta ao patógeno;

5 - Testes de controle alternativo da antracnose em goiabeira-serrana;

6 - Obtenção de variedades de goiabeira-serrana resistentes à antracnose.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia v.1**. São Paulo. Editora Ceres. 1995. pp.647-671.
- ANDRADE, E. R. ; DUCROQUET, J. P.H. J. . **Efeito de fungicidas no controle de Colletotrichum gloeosporioides da goiabeira serrana**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1996, CURITIBA. Resumos do 14. Congresso Brasileiro de Fruticultura. Londrina, PR: SBF/ IAPAR, 1996. p. 218-218.
- ANDRADE, E. R. ; DUCROQUET, J. P.H. J. . **Comparação de diferentes métodos de inoculação de Colletotrichum gloeosporioides Penz. em goiabeira serrana**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v. 23, n.4, p. 486-488, 1998.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; **Métodos em fitopatologia**. Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2007.
- BONETI, J. I. ; KATSURAYAMA, Y. ; DUCROQUET, J. P.H. J. . **Variabilidade de isolados de Colletotrichum gloeosporioides associados com a antracnose da goiabeira serrana em Santa Catarina**. Fitopatologia Brasileira, v. 25, p. 360-360, 2000.
- BONTEMPO, P.; MITA, L; MICELI, M.; DOTO, A.; *et al.*; **Feijoa sellowiana, derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 39, p. 1902–1914, 2007.
- FISCHER, G; **Ecofisiologia, Crecimiento y Desarrollo de la Feijoa**. In Fischer, G., D Miranda, G, Cayón, e M, Mazorra (eds). **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (Acca sellowiana Berg)**. Universidad nacional de Colombia, (2003) Produmedios, Bogotá.
- GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**. Piracicaba, v.23, n.1, p.4-10, 1997

HOFFMANN, J. C. *et al.*. **Influência da temperatura e do polietileno no armazenamento de frutos de goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.)**. Scientia agricola. Piracicaba, vol.51, no.3 Sept./Dec. 1994.

KINUPP, V. F.; BARROS, I.B.I; **Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v 28 (4), p: 846-857, 2008.

KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. **Doenças das solanáceas**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. vol.2., cap.62, p.665-675.

LAPCIK, O; KLEJDUS, B; KOKOSKA, L; *et al.*; **Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae)**. Biochemical Systematics and Ecology, v. 33, p 983 e 992, 2005.

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M. **Mirtáceas**. In: REITZ, P.R. Flora ilustrada catarinense- Herbário “Barbosa Rodrigues”, p. 623-629.1997.

LOPEZ, A. M. Q; PEREIRA, D S. T. Interação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e ecótipos de pinha. **Bragantia**. Campinas, vol.69, no.1, 2010.

MENEZES, M. **Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum***. Fitopatologia brasileira, 27 (suplemento): S23, 2002.

Muniz, M. de F. S.; Lemos, E. E. P.; Assumpção, M. F. M. da; Menezes, M. Fungos patogênicos detectados em pinheira (*Annona squamosa*) e graviroleira (*A. muricata*) no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica** 1998 Vol. 24 No. 3/4 pp. 263-265

NODARI, R O **Sub-projeto: Melhoramento genético da goiaba serrana**. UFSC/Centro de ciências Agrárias, 1998.

PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. de, ALVES, E. & FERREIRA, J. B. **Estudos histoplásticos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro**. Bragantia. Campinas, vol.68, no.1 , 2009.

PESSOA, W. R. L. S. **Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana.** Summa phytopathologica. Botucatu, vol.33, no.2 Apr./June 2007.

PICCININ, E.; PASCOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. **Doenças da goiabeira.** In: KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.401-406.

PONTE, J.J. Clínica de doenças de plantas. **Edições UFC.** Fortaleza: EUFC, 1996.

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.

SMITH, B.J; Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant disease**, 74: 69 - 76, 1990.

SOUZA, M.C; AL GAZI, A.D.F; FIORILO, C.M.T; PITELII, R.A. Teste de especificidade de hospedeiro ao isolados fungico *Colletotrichum sp* (FCAV#515); **UNESP-Jaboticabal**, 2011.

TOZZE JÚNIOR, H.J. Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil. 2007. 81. p. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

TSCHOEKE, P. H. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Centro de Ciências Agrárias. **Antracnose do maracujá amarelo: estudo da reprodução do agente causal e a problemática do controle na visão do produtor.** Florianópolis, 2001. [95] f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

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