

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**

**Especificidade patogênica e compatibilidade vegetativa entre isolados de
Colletotrichum acutatum dos citros e de outros hospedeiros**

Juliana Ramiro

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

Juliana Ramiro
Engenheiro Agrônomo

**Especificidade patogênica e compatibilidade vegetativa entre isolados de
Colletotrichum acutatum dos citros e de outros hospedeiros**

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Ramiro, Juliana

Especificidade patogênica e compatibilidade vegetativa entre isolados de *Colletotrichum acutatum* dos citros e de outros hospedeiros / Juliana Ramiro. - - Piracicaba, 2010.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Fitopatógenos 2. Fungos fitopatogênicos 3. Inoculação 4. Mutação 5. Podridão (Doença d
planta) I. Título

CDD 634.3
R173e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha Mãe Idalina, meu Pai José e
meu Irmão Julio César, por me incentivarem
a lutar pelos meus sonhos e objetivos,
com todo amor,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me presentear com a vida e nela poder realizar todos os meus sonhos.

À minha Família pelo amor incondicional, apoio e compreensão.

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior pela oportunidade, orientação, paciência, amizade e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) pela oportunidade e condições oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudos concedidas.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola pelos ensinamentos e colaboração.

Ao funcionário do FUNDECITRUS Denis Marin e às alunas de iniciação científica Paula e Nara pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos colegas Geraldo, Hugo, Raquel e Wagner pelo fornecimento dos isolados utilizados nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Micologia: Ananias, Carlos, Carolina, Gustavo, Hugo, Isabela, Maria Eugênia, Roberto, Sylvia e Wagner pela amizade, ensinamentos, apoio e pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos colegas dos Laboratórios de Virologia, Procariotos Fitopatogênicos, Fisiologia do Parasitismo e Epidemiologia pelos auxílios nos trabalhos e pela boa convivência.

À minha querida amiga Greicy Andrea Sarria Villa pelos conselhos, ensinamentos, parceria nos trabalhos de disciplinas, paciência e pelos agradáveis momentos de descontração.

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

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão bibliográfica	19
2.1.1 Podridão Floral dos Citros	19
2.1.2 O patógeno: <i>Colletotrichum acutatum</i>	20
2.1.3 Especificidade patogênica	21
2.1.4 Compatibilidade vegetativa	22
2.2 Material e métodos	24
2.2.1 Obtenção e identificação dos isolados	24
2.2.2 Especificidade patogênica	26
2.2.2.1 Isolados utilizados nas inoculações	26
2.2.2.2 Produção do inóculo e inoculação	26
2.2.2.3 Avaliações	27
2.2.2.4 Delineamento experimental e análise estatística	28
2.2.3 Compatibilidade vegetativa	28
2.2.3.1 Isolados utilizados para obtenção dos mutantes	28
2.2.3.2 Obtenção e isolamento dos mutantes	28
2.2.3.3 Caracterização fenotípica dos mutantes	29
2.2.3.4 Testes de complementação e compatibilidade vegetativa	30
2.2.3.5 Teste de estabilidade do heterocário	30
2.2.3.6 Caracterização patogênica do heterocário	31
2.3 Resultados e discussão	31
2.3.1 Especificidade patogênica	31
2.3.2 Compatibilidade vegetativa	35
2.3.2.1 Obtenção, isolamento e caracterização dos mutantes <i>nit</i>	35
2.3.2.2 Teste de complementação e compatibilidade vegetativa	38

2.3.2.3 Teste de estabilidade do heterocário	40
2.3.2.4 Caracterização patogênica do heterocário.....	41
3 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	53

RESUMO

Especificidade patogênica e compatibilidade vegetativa entre isolados de *Colletotrichum acutatum* dos citros e de outros hospedeiros

Colletotrichum acutatum é o agente causal da Podridão Floral dos Citros (PFC), doença que em determinadas condições ambientais constitui-se em fator limitante à produção citrícola em várias regiões produtoras do mundo. Além da PFC, esse fungo causa antracnose em outros hospedeiros, sendo um dos patógenos que mais acarreta danos em frutíferas tropicais, subtropicais e temperadas no mundo. O trabalho teve como objetivos estudar a especificidade patogênica e compatibilidade vegetativa entre isolados de *C. acutatum* dos citros e de outros hospedeiros como: goiaba, pimentão, morango e pêssego. Para os estudos de especificidade patogênica, foram realizadas inoculações cruzadas entre isolados de citros e dos outros hospedeiros visando verificar se os diferentes isolados são capazes de causar sintomas de PFC em flores de citros e antracnose em frutos. Foram também obtidos, a partir dos mesmos isolados, mutantes deficientes na absorção de nitrogênio (mutantes *nit*). Esses foram caracterizados fenotipicamente e pareados a fim de verificar por meio de estudos de compatibilidade vegetativa a capacidade de recombinação entre si, gerando heterocários com patogenicidade alterada. Para verificar a ocorrência de possíveis alterações na patogenicidade dos heterocários formados, foi feita a inoculação dos heterocários e dos isolados parentais nos seus respectivos hospedeiros de origem. Nos ensaios de inoculação cruzada, houve grande variação quanto à patogenicidade dos isolados inoculados. Isolados provenientes de citros e de goiaba causaram lesões em flores de citros, isso demonstra a ausência de especificidade entre isolados dos dois hospedeiros. Porém, isolados provenientes de pimentão, pêssego e morango não foram capazes de causar sintomas em flores de citros o que indica a existência de especificidade desses isolados. Os isolados provenientes dos citros e de outros hospedeiros foram capazes de causar antracnose em goiaba, morango e pêssego, mas apenas os isolados de pimentão causaram antracnose em pimentão. Alguns isolados de citros foram capazes de recombinar entre si e com isolados de goiaba, pimentão e morango. Dos heterocários formados, dois foram caracterizados quanto a sua patogenicidade, Het 3 e Het 5. Como resultado, o heterocáριο proveniente do isolado de citros com goiaba (Het 5) comportou-se de forma semelhante à um de seus parentais. O heterocáριο proveniente de citros com pimentão (Het 3), mostrou-se mais agressivo do que seus parentais quando inoculados em pimentão. Com esses estudos pode-se concluir que existe especificidade patogênica entre isolados de *C. acutatum* de diferentes hospedeiros, entretanto, isolados de diferentes hospedeiros podem recombinar entre si e gerar heterocários com características patogênicas alteradas.

Palavras-chave: *Colletotrichum acutatum*; Inoculação cruzada; Mutantes *nit*; Heterocáριο

ABSTRACT

Pathogenic specificity and vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum acutatum* from citrus and other hosts

Colletotrichum acutatum is the causal agent of postbloom fruit drop (PFD). This disease is a limiting factor for citrus production under specific environmental conditions in several regions of the world. In addition to the PFD, this fungus causes anthracnose on other hosts. It is one of the pathogens that cause more damage in tropical, subtropical and temperate fruit around the world. This work aimed to study the pathogenic specificity and vegetative compatibility among isolates of *C. acutatum* from citrus and other hosts: guava, pepper, strawberry and peach. For studies of pathogenic specificity, cross inoculations were performed among isolates from citrus and other hosts in order to verify whether different strains are capable of causing symptoms of PFD in citrus flowers and fruit anthracnose. Furthermore, it was obtained from the same isolates, nitrate-nonutilizing mutants (nit mutants). They were phenotypically characterized and paired to verify, by means of vegetative compatibility studies, the ability of recombination between them, generating heterokaryons with altered pathogenicity. In order to verify the occurrence of possible changes in the pathogenicity of the heterokaryons formed, parental isolates and heterokaryons were inoculated in their respective original hosts. In cross-inoculation tests, there was a great variation in the isolates pathogenicity. Isolates from citrus and guava caused lesions on citrus blossoms; this demonstrates the absence of pathogenic specificity between isolates of the two hosts. However, isolates from pepper, peach and strawberry were unable to induce symptoms on citrus flowers showing the existence of specificity of these isolates. The strains from citrus and other hosts were able to cause anthracnose on guava, strawberry and peach, but only isolates of pepper caused anthracnose on pepper. Some isolates from citrus were able to recombine among themselves and with isolates from guava, peppers and strawberries. From the heterokaryons obtained, two of them had their pathogenicity characterized: Het 3 and Het 5. As a result, the heterokaryon derived from citrus and guava (Het 5) behaved similarly to one of their parental isolates. The heterokaryon derived from citrus and pepper (Het 3) was more aggressive than their parental isolates when inoculated in pepper. With these results we can conclude that there is specificity between pathogenic strains of *C. acutatum* from different hosts. However, isolates from different hosts can recombine with each other and generate heterokaryons with altered pathogenic characteristics.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; Cross-inoculation; Nit mutants, Heterokaryon

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A bioquímica da conversão de nitrato a íons amônio. A enzima nitrato redutase reduz nitrato a nitrito, mas também pode reduzir clorato a clorito, o qual é tóxico para a célula. Caso ocorra alguma alteração no gene da nitrato redutase, a célula não será capaz de utilizar nitrato e em contrapartida será resistente ao clorato (FÁVARO, 2004).....23
- Figura 2 - Disposição dos mutantes no pareamento. Na linha central foram utilizados os isolados provenientes de citros e, nas laterais, isolados de outros hospedeiros.....38
- Figura 3 - Anastomoses de hifas em meio com nitrato e ausência de glutamato (A), anastomoses de hifas em meio com nitrato e presença de glutamato (B).....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação do isolado, hospedeiro, órgão de isolamento e local de origem de isolados de <i>Colletotrichum acutatum</i>	25
Tabela 2 -	Identificação de mutantes <i>nit</i> de <i>C. acutatum</i> através de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio.....	30
Tabela 3 -	Incidência de Podridão Floral dos Citros em flores de citros inoculadas com isolados de <i>Colletotrichum acutatum</i> provenientes de diferentes hospedeiros.....	32
Tabela 4 -	Parâmetros monocíclicos das antracnoses de goiaba, pimentão, morango e pêssego quando inoculados com isolados de <i>Colletotrichum acutatum</i> provenientes de diferentes hospedeiros. Área média da lesão (mm ²), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos x 10 ⁵)/mm ² da lesão].....	33
Tabela 5 -	Frequência e fenótipo de mutantes de <i>Colletotrichum acutatum</i> deficientes na absorção de nitrato.....	37
Tabela 6 -	Pares de isolados que apresentaram anastomoses entre as hifas.....	40
Tabela 7 -	Teste de estabilidade do heterocário por meio de repicagens sucessivas.....	41

- Tabela 8 - Incidência de Podridão Floral dos Citros em flores de citros inoculadas com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros.....42
- Tabela 9 - Parâmetros monocíclicos da antracnose da goiaba quando inoculada com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros. Área média da lesão (mm^2), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos $\times 10^5$)/ mm^2 da lesão].....42
- Tabela 10 - Incidência de Podridão Floral dos Citros em flores de citros inoculadas com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros.....43
- Tabela 11 - Parâmetros monocíclicos da antracnose do pimentão quando inoculado com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros. Área média da lesão (mm^2), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos $\times 10^5$)/ mm^2 da lesão].....43

1 INTRODUÇÃO

O Brasil mantém-se como o maior produtor mundial de citros e principal exportador de suco de laranja concentrado e congelado (FNP, 2010). O sistema agroindustrial citrícola gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos (NEVES; JANK, 2006). Neste cenário, destaca-se o Estado de São Paulo, respondendo por 80% da produção nacional da fruta e por 98% das exportações de suco. A área cultivada com laranja em São Paulo corresponde a 600 mil hectares e a produção a 14,4 milhões de toneladas, com valor na ordem de US\$ 1,83 bilhão (FNP, 2010).

Entre os vários problemas que ameaçam a citricultura está a Podridão Floral dos Citros (PFC), causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. Essa doença, em determinadas condições ambientais, constitui-se em fator limitante à produção citrícola em várias regiões produtoras do mundo (FAGAN, 1979; TIMMER; BROWN, 2000; OROZCO-SANTOS; GONZÁLES-GARZA, 1986).

Os sintomas da PFC aparecem como lesões necróticas de tonalidade marrom ou alaranjada nas pétalas, tornando-se posteriormente de coloração salmão devido à esporulação do fungo. Em condições favoráveis, essas lesões desenvolvem-se rapidamente, podendo, também, afetar botões florais fechados, embora as flores abertas sejam mais suscetíveis. Como resultado da infecção nas flores, os frutos recém-formados caem, deixando os cálices aderidos à planta, estruturas conhecidas como “estrelinhas”. Os cálices podem permanecer aderidos à planta por até 18 meses (TIMMER et al., 1994; TIMMER; BROWN, 2000).

Além da PFC, *C. acutatum* causa antracnose em muitos hospedeiros, sendo considerado um dos patógenos que mais causa danos em frutíferas tropicais, subtropicais e temperadas no mundo (WHARTON; URIBEONDO, 2004).

Alguns estudos mostram a ocorrência de grande variabilidade entre isolados de *Colletotrichum* spp. (BROOKER et al., 1991; FÁVARO et al., 2007). Peres et al. (2002) analisaram a variabilidade patogênica, características morfológicas, culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum* spp. Esses estudos demonstraram que isolados de diferentes hospedeiros apresentam diversidade de espécies, variações na agressividade, diferenças quanto à velocidade de crescimento e coloração da colônia, tamanho e formato de conídios.

Segundo Freeman et al. (1998), estudos de compatibilidade vegetativa propõem uma abordagem alternativa para determinar a relação genética em populações anamórficas de espécies de *Colletotrichum*. A troca de material genético que ocorre na anastomose de hifas sugere que isolados compatíveis vegetativamente são mais semelhantes entre si, constituindo uma população genética distinta.

Apesar da importância do patógeno e da PFC, não existem estudos sobre a especificidade de *C. acutatum* aos citros, isto é, não se sabe se isolados provenientes de outras frutíferas podem causar sintomas de PFC. Estudos dessa natureza podem revelar se outras culturas atuam como fonte de inóculo para a PFC, o que pode auxiliar no controle da doença. Além disso, não há informações se os isolados que causam PFC e isolados de outros hospedeiros apresentam compatibilidade vegetativa, o que poderia originar variantes com patogenicidade alterada. Conhecer a especificidade do patógeno, assim como a patogenicidade dos recombinantes pode contribuir no melhoramento genético para o controle dessa doença e no manejo cultural, evitando-se plantio de plantas hospedeiras do patógeno próximo dos citros.

Este trabalho teve como objetivos: (i) verificar se isolados de *C. acutatum* obtidos de diferentes hospedeiros têm capacidade de causar sintomas de PFC em citros; (ii) verificar, por meio de estudos de compatibilidade vegetativa, se isolados de *C. acutatum* dos citros são capazes de recombinar entre si e com isolados de outros hospedeiros; (iii) verificar se os possíveis recombinantes de *C. acutatum* obtidos, são capazes de causar sintomas nos respectivos hospedeiros de origem.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Podridão Floral dos Citros

A primeira descrição do agente causal da PFC foi feita por Fagan (1979) em Belize, porém, sintomas característicos da doença têm sido observados desde meados de 1950 nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas.

A doença ocorre em praticamente todas as áreas de produção de citros das Américas, existindo relatos na Argentina, Belize, Costa Rica, República Dominicana, Jamaica, México, Panamá, Estados Unidos e Brasil. Nestes países, a doença vem causando severos prejuízos, principalmente quando as chuvas coincidem com o período de florada (DENHAM, 1979; FAGAN, 1979; McMILLAN; TIMMER, 1989; OROZCO-SANTOS; GONZÁLES-GARZA, 1986).

No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez por Porto et al. (1979), no Rio Grande do Sul. Atualmente, ocorre em praticamente todos os estados produtores e causa prejuízos variáveis (GOES; KIMATI, 1997). Em condições favoráveis a doença, os danos na produção podem chegar até 100% nos pomares mais seriamente afetados (TIMMER, 1993). Os danos variam em função da quantidade e distribuição de chuvas durante o período de florescimento das plantas. No Brasil, a PFC causa sérios danos em anos em que chuvas contínuas ocorrem durante o período de florescimento das plantas. No Estado de São Paulo, perdas significativas foram verificadas na safra de 1977/78, principalmente na região de Limeira, Araraquara e Cândido Rodrigues (FEICHTENBERGER, 1991). Novas perdas foram registradas nas safras de 1990/91, 1992/93 e 1993/94, onde a doença afetou severamente as principais regiões produtoras paulistas. Na região de Itapetininga, na safra de 1996/97, a doença causou redução na produção de até 80% (FEICHTENBERGER, 1994; PRATES et al., 1995).

Os limões e a lima ácida ‘Tahiti’ são muito suscetíveis, seguidos pelas laranjas doces, no entanto, a doença ocorre em praticamente todas as variedades de citros de interesse comercial. Estudos de patogenicidade com flores de laranja-doce, limão ‘Galego’, ‘lima da Pérsia’ e tangelo ‘Orlando’ demonstraram haver pequena variação na suscetibilidade de pétalas dessas variedades

ao *C. acutatum* (AGOSTINI et al., 1992; GOES; KIMATI, 1997; BROWN et al., 1996; PERES et al., 2008).

O agente causal da PFC, inicialmente, foi descrito como *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979). Pouco tempo depois, relatou-se a existência de raças patogênicas e não patogênicas, que diferiam também quanto às características morfológicas e culturais (ROSSETI et al., 1981). Agostini et al. (1992) classificaram estas variantes do fungo como 3 linhagens: FGG (*fast-growing gray*), SGO (*slow-growing orange*) e KLA (*key lime anthracnose*). Por meio de testes de patogenicidade, somente as linhagens SGO e KLA reproduziram sintomas em *Citrus sinensis* variedade ‘Valência’ e *C. limettioides* ‘Lima da Pérsia’. Posteriormente, por meio de estudos moleculares, as linhagens patogênicas SGO e KLA foram reclassificadas como *C. acutatum* e a linhagem não patogênica FGG como *C. gloeosporioides* (BROWN et al., 1996).

2.1.2 O patógeno: *Colletotrichum acutatum*

Colletotrichum acutatum J.H Simonds é um patógeno comum de ampla gama de plantas cultivadas e não cultivadas. O fungo tem uma distribuição cosmopolita e causa grandes perdas em culturas a cada ano. Entre os hospedeiros se incluem plantas dicotiledôneas como morango, maçã, citros e frutas de caroço (PERES et al., 2005).

Segundo a 10ª edição do Dictionary of Fungi (KIRK et al., 2008), *C. acutatum* é um Ascomiceto da família *Glomerellaceae*. Colônias de *C. acutatum* são usualmente brancas no início e posteriormente tornam-se rosa a alaranjado devido às massas de conídios. A produção primária de conídios é em acérvulos. Contudo, *C. acutatum* pode formar conídios em conidióforos que emergem diretamente das hifas, além de conídios secundários, a partir da germinação de conídios primários. Os conídios são usualmente elipsóides e fusiformes, pelo menos em uma das extremidades. Apressórios pigmentados são produzidos com a germinação do conídio e variam de forma e tamanho (PERES et al., 2005).

C. acutatum atua em citros como necrotrófico durante o período de florescimento, no entanto, por muitos anos, o fungo pode sobreviver biotroficamente na forma de apressórios, como infecções quiescentes em tecidos vegetais. Uma vez que um novo crescimento começa, conídios procedentes de acérvulos podem iniciar uma nova epidemia (AGOSTINI; TIMMER, 1994; PERES et al., 2005; ZULFIQAR et al., 1996).

2.1.3 Especificidade patogênica

Colletotrichum acutatum tem sido relatado em vários frutos subtropicais e temperados, incluindo maçã (BERNSTEIN et al., 1995; SHI et al., 1996), uvas (KUMMANG et al., 1996), kiwi (USHYAMA et al., 1996), pêssego (BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG; HARTING, 1997) e noz-pecã (BERNSTEIN et al., 1995).

Embora a maioria das significantes perdas econômicas ocorra quando os frutos são afetados em pós colheita (FREEMAN et al., 1998), muitos frutos são infectados por espécies de *Colletotrichum* quando ainda estão no campo.

Tipicamente os conídios germinam na superfície do fruto e produzem apressórios que causam infecções quiescentes, as quais se desenvolvem apenas depois que o fruto começa amadurecer (PERES et al., 2002).

Segundo Peres et al. (2002), se, em condições tropicais, muitos hospedeiros como manga, mamão, banana, abacate, goiaba, citros e morango forem cultivados próximos, a possibilidade para disseminação de um hospedeiro para outro é elevada.

Estudos recentes apontam o plantio intercalado de goiabeira com citros como forma de manejo do psilídeo *Diaphorina citri*, vetor da *Candidatus Liberibacter* que causa a doença “Huanglongbing” (HLB), também conhecida como “Greening” (CHAU et al., 2007). Nesses estudos realizados no sudeste asiático, os autores revelam que pomares de citros intercalados com goiabeiras (*Psidium guajava* L.) foram menos atacados por *D. citri*. Os autores evidenciaram que plantas jovens de citros permaneceram livres de HLB por mais tempo, quando comparados aos pomares contendo apenas citros. Além disso, onde havia apenas citros, constatou-se que 30% a mais das plantas estavam infectadas pela doença em apenas quatro meses após o plantio em comparação às plantas intercaladas com goiabeiras (CHAU et al., 2008; HALL et al., 2007; BEATTIE et al., 2007). Noronha Junior (2010), na busca de novos compostos para o manejo do psilídeo *D. citri*, demonstrou o efeito repelente dos voláteis das plantas de goiaba aos adultos desse inseto vetor. Porém, essa forma de manejo de HLB, pode influenciar no manejo da PFC. Existe a possibilidade de plantas de goiaba servirem de fonte de inóculo de *C. acutatum* favorecendo a epidemia da doença PFC, uma vez que esse patógeno também é agente causal de antracnose em goiaba (PERES et al., 2002).

Testes de patogenicidade por meio inoculações cruzadas em diversos hospedeiros foram usados como forma de caracterização patogênica entre isolados (DENOYES; BAUDRY, 1995; MUNIZ et al., 1998; FURTADO et al., 1999; PERES et al., 2002), visando demonstrar a especificidade ou a gama de hospedeiros dos isolados ou espécies distintas.

2.1.4 Compatibilidade vegetativa

A compatibilidade vegetativa é uma característica multigênica que tem sido utilizada para avaliar a estrutura populacional de fungos fitopatogênicos (CORRELL et al., 1987; NITZAN et al., 2002). Essa capacidade pode ser avaliada utilizando isolados fúngicos de uma mesma espécie, o que permite a formação de heterocários viáveis pela fusão de hifas entre si. Isto ocorre se os mesmos forem compatíveis vegetativamente (NAUTA; HOEKSTRA, 1996). Neste caso, isolados compatíveis entre si são classificados como pertencentes ao mesmo Grupo de Compatibilidade Vegetativa (GCV) e são, em geral, geneticamente similares. Quanto maior o número de GCV, maior a variabilidade (LESLIE, 1993; BROOKER et al., 1991).

A compatibilidade vegetativa é tida como marcador neutro e a identificação de GCV's pode ser feita visualmente de forma direta ou indireta. De forma indireta, a compatibilidade vegetativa é presumida pela formação de barreira, zona sem crescimento de hifas, entre as colônias de isolados cultivados em conjunto. A observação direta da compatibilidade vegetativa é feita pelo estabelecimento de um heterocáριο prototrófico em condição de cultivo em que nenhum dos dois componentes auxotróficos se desenvolva (LESLIE, 1993). Preferem-se marcadores auxotróficos, quando possível, porque se pode distinguir visualmente o heterocáριο de seus componentes auxotróficos (JACOBSON; GORDON, 1988; LESLIE, 1993). Entre os vários marcadores auxotróficos existentes, a não utilização de nitrato (NO_3) como fonte de nitrogênio (mutantes *nit*) pode ser utilizada para caracterizar GCV em fungos fitopatogênicos (BROOKER et al., 1991; CORRELL et al., 1987; KOROLEV et al., 2000).

Essa técnica baseia-se no fato de que o crescimento de muitos fungos é restrito em meio de cultura contendo clorato de potássio (KClO_3). Isso ocorre porque enzimas produzidas para absorver nitrogênio reduzem o KClO_3 a clorito de potássio (KClO_2), o qual é altamente tóxico, (CORRELL et al., 1987). Meios com KClO_3 exercem seleção nos organismos, pois permitem que se desenvolvam apenas setores insensíveis ou resistentes a KClO_3 . Em geral, esses setores são

resistentes ao KClO_3 porque não o reduzem a KClO_2 , em vista da perda de atividade da nitrato redutase (LIU; SUNDHEIN, 1996). Segundo Vaillancourt e Hanau (1994), grande parte dos mutantes resistentes ao clorato também são deficientes na utilização de NO_3 , o que é revelado pelo crescimento esparso e com pouco micélio aéreo em meio contendo NO_3 como única fonte de nitrogênio. Assim os mutantes resistentes a KClO_3 também são deficientes em absorver NO_3 (Figura 1).

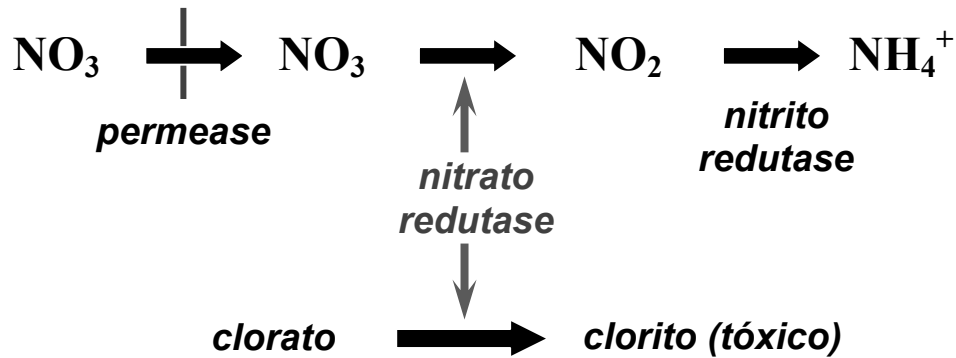


Figura 1 – A bioquímica da conversão de nitrato a íons amônio. A enzima nitrato redutase reduz nitrato a nitrito, mas também pode reduzir clorato a clorito, o qual é tóxico para a célula. Caso ocorra alguma alteração no gene da nitrato redutase, a célula não será capaz de utilizar nitrato e em contrapartida será resistente ao clorato (FÁVARO, 2004)

As mutações que levam à perda da atividade da nitrato redutase podem ocorrer em locos diferentes. Mutantes *nit*, com mutações em locos distintos, quando pareados em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio, podem formar um heterocáριο no ponto de contato, com crescimento prototrófico, se forem compatíveis vegetativamente, isto é, se pertencerem ao mesmo GCV. A vantagem deste método é que a confirmação da compatibilidade vegetativa é feita de forma direta, pela expressão de crescimento prototrófico. Este só ocorre se houver formação de hifa heterocariótica viável entre os indivíduos auxotróficos (CORRELL et al., 1987).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção e identificação dos isolados

Foram utilizados isolados de *C. acutatum* provenientes de citros (PFC) e de outros hospedeiros: goiaba, pimentão, morango e pêsego. Todos os isolados foram identificados por meio de PCR espécie-específica (TOZZE JÚNIOR, 2007).

Os isolados utilizados para os experimentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação do isolado, hospedeiro, órgão de isolamento e local de origem de isolados de *Colletotrichum acutatum*

Isolado	Hospedeiro	Órgão de isolamento	Local de origem
Guacho	Cítricos	Flor	Santa Cruz do Rio Pardo-SP
SPD 01	Cítricos	Flor	São Pedro-SP
SPD 02	Cítricos	Flor	São Pedro-SP
BTU 01	Cítricos	Flor	Botucatu-SP
MG 095 a	Cítricos	Flor	Mogi-Guaçu-SP
PE 079 a	Cítricos	Flor	Pedranópolis-SP
SC 120 a	Cítricos	Flor	Santa Cruz do Rio Pardo-SP
BA 001 a	Cítricos	Flor	Barretos-SP
TQ 045 a	Cítricos	Flor	Taquarituba-SP
GP 025 a	Cítricos	Flor	Gavião Peixoto-SP
CAMP 01	Goiaba	Fruto	Campinas-SP
CAMP 02	Goiaba	Fruto	Campinas-SP
CAF 3	Goiaba	Fruto	Campinas-SP
MIR 3	Goiaba	Fruto	Mirandópolis - SP
Col 53	Pimentão	Fruto	Guaraciaba do Norte-CE
Col 19	Pimentão	Fruto	Elias Fausto-SP
Col 12	Pimentão	Fruto	Bragança Paulista-SP
Col 35	Pimentão	Fruto	Paty de Alferes-RJ
Oso-05	Morango	Fruto	Curitiba-PR
Oso-04	Morango	Fruto	Pouso Alegre-MG
Camarosa 8	Morango	Fruto	Senador Amaral-MG
Oso-03	Morango	Fruto	Valinhos-SP
MR-1	Morango	Fruto	Botucatu-SP
MR-7	Morango	Fruto	Botucatu-SP
OsoG 1	Morango	Fruto	Itatinga-SP
OsoG 2	Morango	Fruto	Itatinga-SP
PESS-01	Pêssego	Fruto	Paranapanema-SP
PESS-02	Pêssego	Fruto	Paranapanema-SP
PESS-07	Pêssego	Fruto	Paranapanema-SP

2.2.2 Especificidade patogênica

2.2.2.1 Isolados utilizados nas inoculações

Os isolados utilizados nas inoculações foram: Guacho, BA 001 a, CAMP 02, CAF 3, MR-1, Oso-03, Col 53, Col 19, PESS-01 e PESS-07. Sendo dois de cada hospedeiro (Tabela 1).

2.2.2.2 Produção do inóculo e inoculação

Para a produção do inóculo, os isolados foram mantidos em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), a 25 ± 1 °C, sob luz contínua. Após sete dias de cultivo, as colônias foram lavadas com água destilada e esterilizada e as suspensão obtidas foram calibradas para 10^5 esporos/mL com o auxílio de um hemacitômetro.

Em citros as inoculações foram feitas em flores de mudas de laranjeira variedade “Valência” (*Citrus sinensis* L. Osb.), contidas em vasos na casa de vegetação. A inoculação foi feita por meio da pulverização da suspensão de inóculo sobre os cachos até o ponto de escorrimento. Cada cacho foi inoculado com um isolado e coberto com saco plástico durante 24 horas e as plantas permaneceram na casa de vegetação à temperatura ambiente durante todo o período de condução do experimento.

Em outros hospedeiros, os seguintes frutos destacados foram obtidos: goiabas variedade “Kumagai” (*Psidium guajava* L.), pimentões verdes variedade “Magali” (*Capsicum annuum* L.), morangos variedade “Oso Grande” (*Fragaria vesca* L.) e pêssegos variedade “Biuti” (*Prunus persica* L.). Esses foram submetidos à desinfestação com hipoclorito de sódio a 0,05% por 5 minutos, posteriormente lavados em água corrente para a retirada do produto, secos a temperatura ambiente e acondicionados em bandejas plásticas.

As inoculações dos frutos foram realizadas mediante a deposição de gotas (30µL) da suspensão de esporos descrita anteriormente sobre a superfície dos frutos. Em goiaba e pimentão a deposição da gota foi feita em duas regiões distintas de cada fruto, uma próxima à região peduncular e outra próxima à região estilar, denominadas de região proximal e distal. Em pêssego e morango, a deposição da gota foi feita na região central de cada fruto. Em seguida, foram

realizados ferimentos com agulha entomológica esterilizada sobre cada local de deposição da gota.

Os frutos inoculados foram acondicionados em bandejas contendo algodão umedecido, as quais foram fechadas com plásticos transparentes e incubadas a 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas foi feita a retirada da câmara úmida por meio da remoção dos plásticos e dos algodões umedecidos. Os frutos permaneceram sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo durante todo o período de condução do experimento.

Os mesmos procedimentos foram utilizados para as testemunhas, mas utilizando apenas água destilada esterilizada nas inoculações.

2.2.2.3 Avaliações

As avaliações dos frutos inoculados foram realizadas diariamente por meio da observação visual ou com auxílio de uma lupa com aumento de 25x para se determinar o período de incubação (PI) e o período de latência (PL), os quais se referem o período entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas e o período entre a inoculação e esporulação, respectivamente.

Foram também avaliadas a área da lesão e a esporulação de cada fruto inoculado. Em goiaba, as avaliações da área de lesão e esporulação foram realizadas 13 dias após a inoculação (DAI) e em pimentão, morango e pêssego as avaliações foram realizadas 9, 6 e 8 DAI, respectivamente.

A área da lesão foi determinada medindo-se os diâmetros perpendiculares da lesão com o auxílio de régua milimetrada. Com a média dos valores obtidos, calculou-se área da lesão.

A esporulação foi determinada pela quantidade de esporos produzidos por milímetro quadrado da lesão. Essa determinação foi realizada por meio da lavagem de cada lesão com 15mL de água destilada esterilizada. Posteriormente foi feita a contagem de esporos das suspensões com o auxílio de um hemacitômetro. O número de esporos obtidos com a contagem (esporos /mL) das suspensões foi multiplicado por 15 e dividido pelo resultado obtido da área da lesão, determinando-se assim a quantidade de esporos produzidos por milímetro quadrado da lesão.

Para citros, todas as flores foram contadas após a retirada da câmara úmida (1DAI). Cinco dias após a inoculação foi contado o número total de flores e o número de flores com lesão. Para cada cacho inoculado com o mesmo isolado, a soma do número de flores com sintomas e a soma do número total de flores foram utilizadas para calcular a porcentagem de flores lesionadas.

2.2.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Para as inoculações em flores de citros o experimento foi realizado duas vezes. A parcela experimental foi composta por um cacho inoculado, não havendo repetições dentro de cada experimento. A análise estatística foi feita por meio da comparação de duas proporções, utilizando-se o intervalo de confiança de 95%.

Para as inoculações dos frutos, os experimentos foram realizados uma vez para cada tipo de fruto, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento. Em goiaba e pimentão, a parcela experimental foi composta por uma região inoculada de cada fruto (proximal e distal). Em morango e pêssgo, a parcela experimental foi composta por um fruto inoculado.

Nas análises estatísticas dos frutos foram utilizadas as médias dos valores obtidos na avaliação das lesões dos frutos. Os resultados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.3 Compatibilidade vegetativa

2.2.3.1 Isolados utilizados para obtenção dos mutantes

Os isolados utilizados para a obtenção dos mutantes foram todos os descritos na Tabela 1.

2.2.3.2 Obtenção e isolamento dos mutantes

Os mutantes foram obtidos segundo metodologia descrita por Cai e Schneider (2005). Cada um dos isolados da Tabela1 foi plaqueado em quatro placas contendo o meio BDA

acrescido de 3% de clorato de potássio. Após 20 dias de incubação, os setores resistentes ao clorato, caracterizados por crescimento mais vigoroso (mutantes) começaram a aparecer. À medida que surgiam, os mesmos foram repicados para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura, adicionado de clorato de potássio.

2.2.3.3 Caracterização fenotípica dos mutantes

Após a obtenção, os mutantes foram classificados em diferentes categorias, em função da utilização ou não de algumas fontes de nitrogênio. Segundo Vaillancourt e Hanau (1994), grande parte dos mutantes resistentes ao clorato também são deficientes na utilização de nitrato (mutantes *nit*), o que é revelado pelo crescimento esparso e com pouco micélio aéreo em meio contendo NO_3 como única fonte de nitrogênio. Para a realização dos testes de complementaridade entre estes mutantes, é necessário que se conheça exatamente a categoria fenotípica de cada mutante *nit* obtido. Isso foi feito mediante o plaqueamento dos mutantes no meio basal com a seguinte constituição, por litro de água destilada: KH_2PO_4 (1,5g), KCl (0,5g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), FeSO_4 (0,01g), ZnSO_4 (0,01g), glicose (10g) e ágar (15g) acrescido de diferentes fontes de nitrogênio, como segue: NaNO_3 (70 mM), NaNO_2 (10 mM), NH_4Cl (10mM), glutamato de sódio (10 mM) e hipoxantina (0,7 mM). A simples observação do crescimento ou não dos mutantes nestes meios foi suficiente para caracterizá-los fenotipicamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Identificação de mutantes *nit* de *Colletotrichum acutatum* por meio de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio

Mutaçã ^a	Terminologia genética para o mutante	Crescimento em diferentes fontes de nitrogênio ^b			
		Nitrato	Nitrito	Hipoxantina	Glutamato
Nenhuma	<i>selvagem</i>	+	+	+	+
Locus estrutural nitrato redutase	<i>nit1</i>	-	+	+	+
Locus regulador principal	<i>nit2</i>	-	-	-	+
Locus regulador via específico	<i>nit3</i>	-	-	+	+
Loci codificam cofator contendo molibdênio	NitM	-	+	-	+

^a Terminologia genética baseada em caracterização de mutantes de *Colletotrichum spp.*

(BROOKER et al., 1991; FÁVARO et al., 2007)

^b Crescimento em meio basal com uma de várias fontes de nitrogênio:

(+) = crescimento vigoroso; (-) = crescimento pobre com pouco micélio aéreo

2.2.3.4 Testes de complementação e compatibilidade vegetativa

A complementação e a compatibilidade vegetativa foram testadas plaqueando-se pares de diferentes mutantes *nit* (ex: *nit 1* X Nit M), sempre um proveniente de citros com outros de outros hospedeiros, a uma distância de aproximadamente 1-2 cm um do outro sobre meio basal com nitrato como fonte de nitrogênio. As placas foram incubadas a 25°C sob luz contínua durante 7 a 15 dias e periodicamente analisadas quanto à formação de zona heterocariótica no local onde as colônias se intersectaram. Os pares de mutantes que não formaram crescimento denso na região de intersecção foram considerados como pertencentes a diferentes GCVs. Quando foi observada a zona heterocariótica, caracterizada por crescimento denso e vigoroso na região de encontro das duas colônias, concluiu-se que ambos os mutantes são complementares e pertencem ao mesmo GCV.

2.2.3.5 Teste de estabilidade do heterocário

O teste de estabilidade do heterocário foi realizado por meio de repicagens sucessivas em meio basal contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Cada heterocário obtido no ítem 2.2.3.4 foi repicado 10 vezes sucessivas nesse meio. O crescimento denso até a última repicagem

indicou estabilidade do heterocário. Crescimento escasso, por outro lado, indicou que houve dissociação entre os isolados que deram origem ao heterocário, revelando sua instabilidade.

2.2.3.6 Caracterização patogênica do heterocário

A metodologia utilizada para realizar essa caracterização foi a mesma descrita no item 2.2.2.2. Porém as inoculações foram realizadas utilizando-se os heterocários formados e os isolados que deram origem a esses heterocários. O objetivo da caracterização foi verificar a capacidade dos mesmos causarem sintomas nos seus respectivos hospedeiros de origem e também verificar a existência de possível alteração em sua patogenicidade. As avaliações e análise estatística foram as mesmas descritas nos itens 2.2.2.3 e 2.2.2.4, respectivamente.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Especificidade patogênica

Os resultados referentes às inoculações de flores citros e dos frutos goiaba, pimentão, morango e pêsego, encontram-se agrupados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Incidência de Podridão Floral dos Citros em flores de citros inoculadas com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros

Isolado	Hospedeiro de origem do isolado	1ª Inoculação			2ª Inoculação		
		Flores inoculadas (nº)	Flores com sintomas (nº)	Flores com sintomas (%)	Flores inoculadas (nº)	Flores com sintomas (nº)	Flores com sintomas (%)
Guacho	Citros	27	25	92,59 a	25	21	84,00 b
BA 001 a	Citros	14	13	92,86 a	24	24	100,00 a
CAMP 02	Goiaba	26	12	46,15 bc	19	0	0,00 c
CAF 3	Goiaba	10	7	70,00 ab	17	12	70,59 b
MR-1	Morango	7	1	14,29 cd	26	0	0,00 c
Oso-03	Morango	40	0	0,00 d	22	0	0,00 c
Col 53	Pimentão	39	1	2,56 cd	26	0	0,00 c
Col 19	Pimentão	18	0	0,00 d	20	0	0,00 c
PESS-01	Pêssego	25	0	0,00 d	9	0	0,00 c
PESS-07	Pêssego	13	0	0,00 d	27	1	3,70 c
Testemunha	-	18	0	0,00 d	4	0	0,00 c

Nota – Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança (ANEXOS A e B)

Tabela 4 – Parâmetros monocíclicos das antracnoses de goiaba, pimentão, morango e pêssego quando inoculados com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros. Área média da lesão (mm²), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos x 10⁵)/mm² da lesão]

Isolado	Hospedeiro de origem do isolado	Goiaba				Pimentão				Morango				Pêssego			
		Área da lesão (mm ²)	PI	PL	Esporulação (10 ⁵)	Área da lesão (mm ²)	PI	PL	Esporulação (10 ⁵)	Área da lesão (mm ²)	PI	PL	Esporulação (10 ⁵)	Área da lesão (mm ²)	PI	PL	Esporulação (10 ⁵)
Guacho	Citros	321,97 ab	6	7	0,78 b	0,00 c	-	-	0,00 c	122,03 de	4	5	1,47 ab	539,12 ab	3	4	0,51 abcd
BA 001 a	Citros	354,86 b	5	7	0,88 b	0,00 c	-	-	0,00 c	167,33 cd	4	5	1,53 ab	454,46 ab	3	4	0,29 bcd
CAMP 02	Goiaba	387,46 a	5	7	0,81 b	0,00 c	-	-	0,00 c	343,48 a	3	4	2,12 ab	405,87 ab	3	4	0,91 ab
CAF 3	Goiaba	251,38 ab	6	7	1,03 b	0,00 c	-	-	0,00 c	145,56 de	3	4	0,95 b	355,16 b	3	4	0,25 cd
MR-1	Morango	167,39 b	6	7	1,81 a	0,00 c	-	-	0,00 c	265,55 ab	2	3	2,02 ab	391,19 ab	3	4	1,00 a
Oso-03	Morango	256,25 ab	6	7	1,23 b	0,00 c	-	-	0,00 c	339,46 a	2	3	1,29 ab	454,07 ab	3	4	0,59 abcd
Col 53	Pimentão	0,00 c	-	-	0,00 c	145,19 b	3	5	0,11 b	9,64 f	5	-	0,00 c	379,98 ab	4	5	0,28 bcd
Col 19	Pimentão	0,00 c	-	-	0,00 c	393,38 a	3	5	0,74 a	110,26 e	4	5	1,40 b	361,69 ab	4	5	0,33 bcd
PESS-01	Pêssego	380,04 a	6	7	0,94 b	0,00 c	-	-	0,00 c	164,25 cd	4	5	1,87 ab	588,60 a	2	3	0,81 abc
PESS-07	Pêssego	337,95 a	7	8	0,91 b	0,00 c	-	-	0,00 c	219,14 bc	4	5	2,37 a	512,84 ab	2	3	1,10 a
Testemunha	-	0,0 c	-	-	0,00 c	0,00 c	-	-	0,00 c	0,00 f	-	-	0,00 c	0,00 c	-	-	0,00 d
CV (%)		32,05			8,79	30,81			3,19	13,18			16,29	20,28			13,86

Nota- Os valores expressos representam dados não transformados, enquanto a análise estatística foi realizada com dados transformados para $\sqrt{(x+1)}$. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Analisando os dados da Tabela 3 pode-se observar que na primeira inoculação a proporção de flores de citros doentes foi maior em cachos inoculados com os isolados Guacho e BA 001 a de citros. Porém, os isolado CAF 3 e CAMP 02 de goiaba foram capazes de causar sintomas em proporções maiores que os isolados de morango, pimentão e pêsego. O CAF 3 não apresentou diferença estatística em relação aos isolados de citros na quantidade de sintomas em flores de citros, indicando o seu potencial de infecção para esse hospedeiro. A segunda inoculação comprova a capacidade dos isolados Guacho e BA 001 a de citros causarem lesões em maior proporção quando comparados aos isolados dos outros hospedeiros. Embora o isolado CAMP 02 de goiaba não tenha causado lesão nas flores na segunda inoculação, o isolado CAF 3 se comportou de forma semelhante à primeira inoculação, não se diferenciando estatisticamente do isolado Guacho de citros.

Os isolados de morango, pimentão e pêsego não apresentaram diferença estatística quando comparados à testemunha na produção de sintomas em flores de citros em nenhuma das inoculações. Se observarmos por esse aspecto, a possibilidade dessas culturas servirem de fonte de inóculo para citros torna-se praticamente nula.

Isolados provenientes de citros, goiaba, morango e pêsego causaram lesões e, inclusive, esporularam sobre goiaba (Tabela 4) sem grandes variações quanto à agressividade, indicando que todos esses hospedeiros podem atuar como fonte de inóculo para a antracnose desse fruto. Entretanto, os isolados de pimentão não foram capazes de causar lesões em goiaba, isso demonstra a ocorrência de especificidade patogênica nos isolados desse hospedeiro.

Os isolados Col 19 e Col 53 de pimentão causaram lesões e esporularam em pimentão, porém, houve diferença estatística quanto ao tamanho de lesão e esporulação entre os dois isolados. O isolado Col 19 é mais agressivo do que o isolado Col 53 (Tabela 4). Porém, somente eles foram capazes de causar sintomas nesses frutos. Os demais isolados, provenientes dos outros hospedeiros, não foram capazes de causar lesões em pimentão, indicando mais uma vez a ocorrência de especificidade patogênica nas inoculações.

Para as inoculações realizadas em morangos, embora todos os isolados tenham causado doença, os isolados MR-1 e Oso-03 de morango e CAMP 02 de goiaba apresentaram maior área de lesão, demonstrando sua maior agressividade sobre morango. Além da maior agressividade, MR-1 e Oso-03 apresentaram menor PI e PL nesses frutos em relação aos demais. Fato

semelhante foi observado por Peres et al. (2002), que mostraram que isolados de *Colletotrichum* spp. foram mais agressivos a seus respectivos hospedeiros de origem.

Os isolados dos diferentes hospedeiros inoculados em pêssego não apresentaram diferença estatística quanto à área de lesão e esporulação, mostrando alta agressividade por parte de todos os isolados inoculados. No entanto, assim como ocorreu em morango, os períodos de incubação e de latência dos isolados de pêssego foram menores nesse hospedeiro quando comparados aos isolados dos outros hospedeiros. Isso indica uma tendência das lesões surgirem primeiro quando os frutos são inoculados com seus respectivos hospedeiros de origem.

Com exceção da inoculação de pimentão, os isolados de citros e de goiaba foram capazes de infectar todos os demais hospedeiros inoculados, apresentando agressividade relativamente elevada, sugerindo que os isolados desses grupos têm capacidade de infectar frutos de vários hospedeiros.

A ausência da especificidade patogênica entre isolados provenientes de citros e de goiaba infere a possibilidade desses hospedeiros atuarem como fonte de inóculo para PFC e antracnose respectivamente. Em função dessa constatação, deve-se analisar cuidadosamente a recomendação de plantio intercalado de goiabeiras com plantas cítricas para o controle do psíldeo transmissor de bactérias causadoras do “Huanglongbing” em citros (BEATTIE et al., 2007; HALL et al., 2007). É possível que infecção cruzada ocorra entre citros e goiaba, portanto essas culturas não devem ser plantadas próximas uma da outra. Observa-se que o conhecimento do potencial para inoculação cruzada desses isolados é importante para a epidemiologia da doença e seu controle.

As flores e os frutos inoculados apenas com água destilada esterilizada, utilizados como testemunha, não apresentaram sintomas em nenhum dos tratamentos.

2.3.2 Compatibilidade vegetativa

2.3.2.1 Obtenção, isolamento e caracterização dos mutantes *nit*

Obtiveram-se 187 setores resistentes ao clorato, os quais foram submetidos à caracterização fenotípica. Dos 187 setores, 164 não foram capazes de crescer em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, sendo considerados mutantes *nit*. Os outros 23 setores resistentes foram considerados como selvagens e não foram utilizados nos estudos subsequentes.

O número de mutantes *nit* obtidos de cada isolado bem como a frequência de sua caracterização fenotípica encontra-se agrupados na Tabela 5.

Tabela 5- Frequência e fenótipo de mutantes de *Colletotrichum acutatum* deficientes na absorção de nitrato

Isolados	Total de mutantes <i>nit</i> (n°)	Frequência de mutantes em cada classe fenotípica (%)			
		<i>nit1</i>	<i>nit2</i>	<i>nit3</i>	NitM
Guacho	16	75	-	6,3	18,7
SPD 01	8	62,5	-	37,5	-
SPD 02	4	100	-	-	-
BTU 01	13	100	-	-	-
MG 095 a	5	60	-	20	20
PE 079 a	4	75	-	25	-
SC 120 a	2	50	50	-	-
BA 001 a	8	87,5	-	-	12,5
TQ 045 a	4	100	-	-	-
GP 025 a	2	100	-	-	-
CAMP 01	10	80	-	20	-
CAMP 02	4	-	-	100	-
CAF 3	12	66,7	-	8,3	25
MIR 3	2	-	50	50	-
Col 53	12	66,7	-	33,3	-
Col 19	6	83,3	-	16,7	-
Col 12	8	37,5	12,5	50	-
Col 35	5	-	40	60	-
Oso-05	3	33,3	-	66,7	-
Oso-04	2	-	-	100	-
Camarosa 8	1	-	-	100	-
Oso-03	0	-	-	-	-
MR-1	5	-	-	60	40
MR-7	4	75	-	25	-
OsoG 1	8	87,5	-	12,5	-
OsoG 2	1	-	-	100	-
PESS-01	6	-	50	50	-
PESS-02	2	-	100	-	-
PESS-07	7	-	14,3	85,7	-

De acordo com a Tabela 5, pode-se observar que de todos os mutantes *nit* caracterizados fenotipicamente, a frequência de mutantes *nit1* de *C. acutatum* foi relativamente maior do que *nit2*, *nit3* ou NitM. Essa predominância de *nit1* em relação às demais classes fenotípicas para a maioria dos isolados também foi observada em *C. sublineolum* (FÁVARO, 2004) e em *Fusarium moniliforme* (KLITTICH; LESLIE, 1988).

2.3.2.2 Teste de complementação e compatibilidade vegetativa

Para o pareamento, os mutantes foram escolhidos com base no hospedeiro e na sua classificação fenotípica. Os pareamentos foram feitos por meio de várias combinações possíveis sempre plaqueando um isolado mutante de citros na região central da placa e isolados mutantes de outros hospedeiros nas laterais (Figura 2). No momento do pareamento foi intercalado propositamente *nit 3*, *nit 1*, *nit2* e NitM de diferentes hospedeiros para que a deficiência de um fosse complementada pelo outro e assim pudesse se formar a anastomose, caso pertencessem ao mesmo GCV.

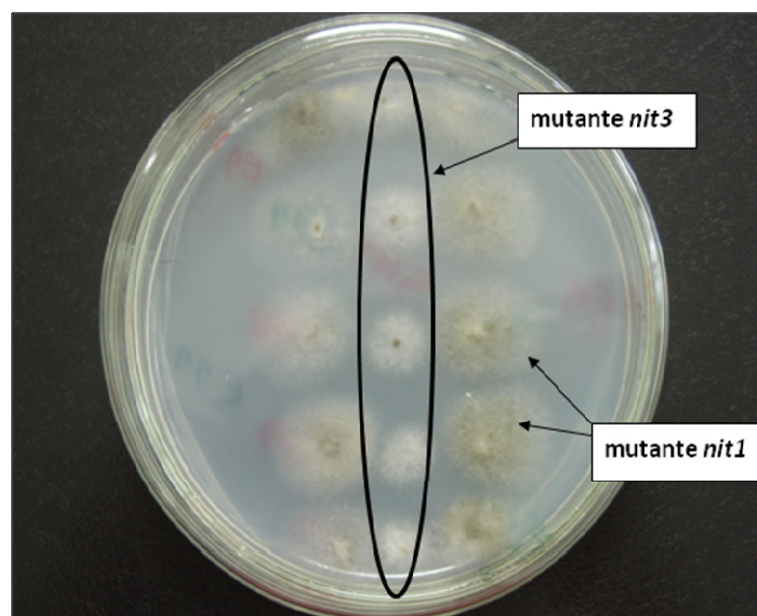


Figura 2 – Disposição dos mutantes no pareamento. Na linha central foram utilizados os isolados provenientes de citros e, nas laterais, isolados de outros hospedeiros

Como se pode observar na Figura 2 os mutantes classificados como *nit1* estão representados nas fileiras laterais também estavam pareados com outro mutante *nit1* devido à disposição na placa. As primeiras anastomoses foram observadas depois de seis dias do início do pareamento.

Nesses testes de pareamento foi testado também presença e ausência de glutamato no meio de cultura. Os testes de pareamento com presença de glutamato tiveram o objetivo de promover maior velocidade no crescimento das colônias de mutantes, para que as hifas pudessem se intersectar mais rapidamente. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 3.

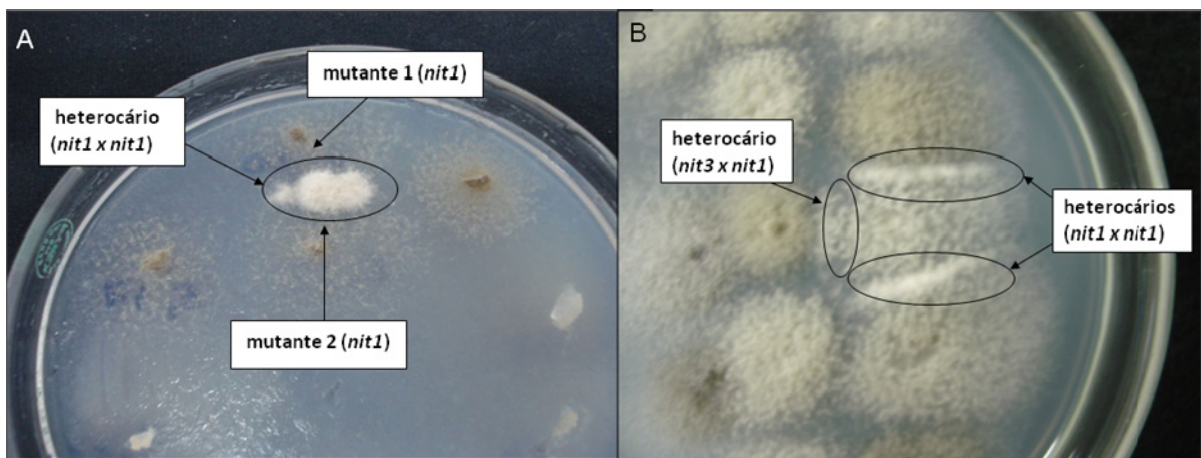


Figura 3 – Anastomoses de hifas em meio com nitrato e ausência de glutamato (A), anastomoses de hifas em meio com nitrato e presença de glutamato (B)

Houve a anastomose entre hifas dos isolados pareados, porém no meio com nitrato e presença de glutamato (Figura 3A) o crescimento do micélio foi mais vigoroso em comparação com o crescimento do micélio em meio sem glutamato (Figura 3B). Dessa forma, na ausência de glutamato, os setores mais vigorosos resultantes das anastomoses são mais facilmente revelados. Na Tabela 6 estão relacionados os treze pares de mutantes que realizaram anastomoses entre suas hifas.

Tabela 6 - Pares de isolados que apresentaram anastomoses entre as hifas

Heterocário	Pares de mutantes que realizaram anastomoses*	Hopedeiros
Het 1	SPD 02 m3 / SPD 01 m7	Citros / Citros
Het 2	MR-7 m2 / BTU 01 m11	Morango / Citros
Het 3	Col53 m6 / Guacho m13	Pimentão / Citros
Het4	Col 53 m8 / Guacho m8	Pimentão / Citros
Het5	SPD 01 m1 / CAMP 01 m10	Citros / Goiaba
Het6	Col 53 m12 / CAMP 01 m10	Pimentão / Goiaba
Het7	SPD 02 m3 / SPD 01 m8	Citros / Citros
Het8	CAMP 01 m4 / CAMP 01 m6	Goiaba / Goiaba
Het9	CAMP 01 m4 / CAMP 01 m5	Goiaba / Goiaba
Het10	BTU 01 m5 / BTU 01 m7	Citros / Citros
Het11	CAMP 01 m4 / CAMP 01 m3	Goiaba / Goiaba
Het12	BTU 01 m11 / BTU 01 m12	Citros / Citros
Het13	BTU 01 m10 / BTU 01 m13	Citros / Citros

(*) Em ANEXO E encontra-se a qual classe fenotípica cada um dos mutantes pertence

Em seis pares de mutantes, as anastomoses foram realizadas por mutantes do mesmo isolado e em sete, as anastomoses foram observadas entre mutantes de isolados diferentes. Essa constatação revela que há possibilidade dessas anastomoses estarem acontecendo na natureza. Dessa forma, é possível que isolados com características diferentes estejam passando por recombinações e alterando suas características iniciais, como, por exemplo, a patogenicidade. Segundo MacKenzie et al. (2009), a ocorrência de isolados geneticamente variáveis no mesmo hospedeiro, sugere que múltiplas linhagens contribuam para a epidemia da mesma doença. Vaillancourt e Hanau (1994), ao estudarem heterocariose em *C. graminicola*, sugerem a possibilidade de se utilizá-la como ferramenta para estudos genéticos desse organismo.

2.3.2.3 Teste de estabilidade do heterocário

O teste de estabilidade do heterocário foi feito a partir das combinações surgidas no teste de complementação e compatibilidade vegetativa. Os recombinantes obtidos foram repicados 10

vezes consecutivas em meio com nitrato, para assim ser assegurada a estabilidade do heterocário como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Teste de estabilidade do heterocário por meio de repicagens sucessivas

Heterocário	Número de repicagens									
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
Het 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Het 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Het 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Het 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Het 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Het 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Het 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Het 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Het 9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Het 10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Het 11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Het 12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Het 13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+ Crescimento vigoroso do micélio

- Não houve crescimento do micélio

Os heterocários Het 9, Het 11 e Het 12 cessaram seus crescimentos na 5ª repicagem e o heterocário Het 2, Het 10 e Het 13 na 6ª repicagem (Tabela 7), mostrando-se instáveis, pois houve a dissociação dos mutantes iniciais, diferentemente dos demais recombinantes que mostraram-se estáveis até o final.

2.3.2.4 Caracterização patogênica do heterocário

De acordo com os resultados obtidos nos itens 2.3.2.2 e 2.3.2.3 foram escolhidos dois heterocários que se apresentaram estáveis para serem caracterizados quanto a sua patogenicidade. A escolha foi feita de acordo com o hospedeiro de origem do isolado que formou anastomose, sendo sempre um de citros e outro de cada um dos demais hospedeiros. Os dois heterocários

escolhidos foram Het 3 (citros com pimentão) e Het 5 (citros com goiaba). Os resultados das inoculações dos heterocários e dos isolados que a eles deram origem estão representados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

Tabela 8 – Incidência de Podridão Floral dos Citros em flores de citros inoculadas com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros

Isolado	Hospedeiro	Flores inoculadas (n°)	Flores com sintomas (n°)	Flores lesionadas(%)
	de origem do isolado			
CAMP 01	Goiaba	9	5	55,5 a
SPD 01	Citros	7	5	71,43 a
Het 5	Citros/Goiaba	10	0	0,00 b
Testemunha	-	8	0	0,00 b

Nota – Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança (ANEXO C)

Tabela 9 - Parâmetros monocíclicos da antracnose da goiaba quando inoculada com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros. Área média da lesão (mm²), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos x 10⁵) /mm² da lesão]

Isolado	Hospedeiro	Área da lesão (mm ²)		PI	PL	Esporulação (10 ⁵)	
	de origem do isolado						
CAMP 01	Goiaba	319,25	a	6	7	1,09	a
SPD 01	Citros	173,27	b	6	7	0,71	b
Het 5	Citros/Goiaba	103,27	b	8	9	1,69	a
Testemunha	-	0,00	c	-	-	0,00	c
CV (%)		29,83				11,80	

Nota – Os valores expressos representam dados não transformados, enquanto a análise estatística foi realizada com dados transformados para $\sqrt{(x+1)}$. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Tabela 10 – Incidência de Podridão Floral dos Citros em flores de citros inoculadas com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros

Isolado	Hospedeiro de origem do isolado	Flores inoculadas (n^o)	Flores com sintomas (n^o)	Flores lesionadas(%)
Col 53	Pimentão	26	0	0,00 b
Guacho	Citros	25	21	84,00 a
Het 3	Citros/Pimentão	13	7	53,85 a
Testemunha	-	15	0	0,00 b

Nota – Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança (ANEXO D)

Tabela 11 - Parâmetros monocíclicos da antracnose do pimentão quando inoculado com isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de diferentes hospedeiros. Área média da lesão (mm²), período de incubação (PI), período de latência (PL) e esporulação [(esporos x 10⁵)/mm² da lesão]

Isolado	Hospedeiro	Área da lesão (mm²)		PI	PL	Esporulação (10⁵)	
Col 53	Pimentão	145,19	b	3	6	0,11	a
Guacho	Citros	0,00	c	-	-	0,00	c
Het 3	Citros/Pimentão	532,16	a	3	6	0,07	b
Testemunha	-	0,00	c	-	-	0,00	c
CV (%)		22,89		0,80			

Nota – Os valores expressos representam dados não transformados, enquanto a análise estatística foi realizada com dados transformados para $\sqrt{(x+1)}$. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tanto CAMP 01 como SPD 01 foram capazes de causar sintomas de PFD em flores de citros sem se diferenciarem estatisticamente entre si. Porém, o heterocário formado entre eles, não foi capaz de causar lesões nas flores desse hospedeiro (Tabela 8).

As goiabas inoculadas com os isolados de goiaba e citros apresentaram lesões para ambas as inoculações (Tabela 9), porém o isolado SPD 01 de citros foi menos agressivo do que o isolado CAMP 01 de goiaba. O heterocário Het 5 formado por esses isolados diferiu estatisticamente do isolado de goiaba apresentando menor área de lesão, mas não apresentou

diferença estatística quanto à produção de esporos. Quanto à agressividade no fruto, o heterocário Het 5 se comportou de forma semelhante ao isolado SPD 01 de citros.

De acordo com a Tabela 10, o isolado Col 53 de pimentão por si só não foi capaz de infectar flores de citros, porém ao se recombinar com o isolado Guacho de citros foi capaz de causar infecção com incidência proporcional ao isolado Guacho. O mesmo ocorreu com esses isolados quando inoculados em pimentões (Tabela 11). O isolado Guacho de citros não foi capaz de causar doença nos frutos, diferente do isolado Col 53 de pimentão que causou lesão e esporulou. Entretanto, o heterocário Het 3, além de ter sido infectivo, se mostrou estatisticamente mais agressivo ao fruto em relação ao isolado Col 53 de pimentão.

Isolados de pimentão parecem ter especificidade pelo seu hospedeiro, pois somente eles causaram doença em pimentão e quando inoculados em flores de citros, não causaram PFD. O heterocário citros/pimentão causou doença em pimentão e em flores de citros.

Esses estudos demonstram a capacidade da espécie apresentar variabilidade quanto à sua patogenicidade. A ocorrência de heterocariose entre dois isolados distintos pode provocar o aumento ou redução de sua agressividade. Embora não haja estudos que evidenciem isso, existe possibilidade de essas recombinações ocorrerem na natureza (VAILLANCOUR; HANAU, 1994), podendo assim, influenciar na epidemiologia da doença e no seu controle.

3 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que existe especificidade patogênica dos diferentes isolados de *C. acutatum* de alguns hospedeiros. Isolados de pimentão, morango e pêsego não são capazes de causar sintomas de PFC em flores de citros.

Mesmo quando não ocorre especificidade patogênica, há uma tendência dos isolados apresentarem maior agressividade em seus respectivos hospedeiros de origem.

Isolados de *C. acutatum* oriundos dos citros são capazes de recombinar entre si e com isolados de outros hospedeiros, gerando recombinantes com características patogênicas diferentes. A recombinação pode aumentar ou reduzir a agressividade do isolado.

REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 9, p. 979-987, 1997.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 4, p. 420-425, 1994.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 1377-1382, 1992.
- BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 478-482, 1995.
- BEATTIE, A.; HOLFORD, P.; HAIGH, D.T.; MABBERLEY, D.; BROADBENT, P.; BAYER, R. Retrospectives & insights: hanglongbing, *Diaphorina citri*, Citrus, guava & mineral oils. In: CITRUS EXPO SEMINAR PROGRAM, 2007, Ft. Myers. Disponível em: <http://www.imok.ufl.edu/events/expo/2007/08_22_240_beattie.pdf> . Acesso em: 14 out. 2010.
- BROOKER, N.L.; LESLIE, J.F.; DICKMAN, M.B. Nitrate nonutilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 672-677, 1991.
- BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of Slow-Growing Orange and Key Lime Anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 523-527, 1996.
- CAI, G.; SCHNEIDER, R. W. Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of Cercospora leaf blight and purpleseed stain in soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p.257-261, 2005.
- CHAU, N.M.; ICHINOSE, K.; TUAN, D.H.; DIEN, L.Q.; HOA, N.V.; BANG, D.V.; KANO, T. Guava Intercropping – Management for Citrus Greening Disease. **International Tropical Fruits Network**. 2008. Disponível em: <http://www.itfnet.org/contents/fruit/fruitInfo/pdfFiles/issue10_jan08.pdf>. Acesso em: 14 out. 2010.
- CORRELL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p.1640-1646, 1987.
- DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. **PANS**, London, v. 25, p. 30-36, 1979.

DENOYES, B.; BAUDRY, A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 53-57, 1995.

FAGAN, H.J. POSTBLOOM fruit drop: a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, London, v. 91, p. 13-20, 1979.

FÁVARO, L.C.L. **Instabilidade genética em *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose em sorgo**. 2004. 87 p. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

FÁVARO, L.C.L.; ARAÚJO, W.L.; SOUZA-PACCOLA, E.A.; AZEVEDO, J.L.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chorate. **Mycological Research**, Cambridge, v. 3, p. 93-105, 2007.

FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 513-521, 1991.

_____. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-128, 1994.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO **Agrianual 2010**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2010. 520 p.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v. 8, p. 596-605, 1998.

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

GOES, A. de; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, p. 10-14, 1997.

HALL, D.G.; GOTTWALD, T.R.; NGUYEN, C.M.; ICHINOSE, K., LE, D.Q.; BEATTIE, A. 2007. Intercropping of citrus and guava trees for management of huanglongbing. In: FLORIDA ENTOMOLOGICAL SOCIETY ANNUAL MEETING, 2007, Sarasota. **Abstract...** Paper nº.72. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=212117>. Acesso em: 14 out. 2010.

JACOBSON, D. J.; GORDON, T. R. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 668-672, 1988.

- KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the fungi**. 10th ed. Wallingford: CABI Publ., 2008. 784 p.
- KLITTICH, C.J.R.; LESLIE, J.F. *Nitrate reduction mutants of Fusarium moniliforme (Giberella fujikuroi)*. **Genetics**, Bethesda, v. 118, p. 417-423, 1988.
- KOROLEV, N.; KATAN, J.; KATAN, T. Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahlia* in Israel: Their distribution and association with pathogenicity. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p.529-536, 2000.
- KUMMANG, N.; SMITH, B.J.; DIEHL, S.V.; GRAVES, C.H.Jr. Muscadine grape berry rot diseases in Mississippi: Disease identification and incidence. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 238-243, 1996.
- LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150, 1993.
- LIU, W.; SUNDHEIM, L. *Nitrate nonutilizing mutants and vegetative compatibility groups in Fusarium poae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, p. 12-17, 1996.
- MACKENZIE, S.J., PERES, N.A.; BARQUERO, M.P.; ARAUZ, L.F.; TIMMER, L.W. Host range and genetic relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, p. 620-631, 2009.
- MCMILLAN, R.; TIMMER, L.W. Outbreaks of citrus post bloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, p. 81, 1989.
- MUNIZ, M.F.S., SANTOS, R.C.R. dos; BARBOSA, G.V.S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, p. 177-179, 1998.
- NAUTA, M.J.; HOEKSTRA, R.F. Vegetative incompatibility in ascomycetes: highly polymorphic but selectively neutral. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 183, p. 67-76, 1996.
- NEVES, M.F.; JANK, M.S. Desafios na coordenação na citricultura brasileira. **Valor Econômico**, São Paulo, p. A-10, mar. 2006.
- NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSROR (LAHKIM), L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 827-832, 2002.

NORONHA JUNIOR, N.C. **Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae).** 2010. 72 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OROZCO SANTOS, M.; GOZALEZ GARZA, R. Caída de fruto pequeno y su control em naranja ‘Valencia’ em Veracruz. **Agricultura Técnica em México**, Mexico, v. 12, n. 2, p. 259-69, 1986.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E. CORREL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 784- 795, 2005.

PERES, N.A.; MACKENZIE, S.J.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n.3, p. 345-352, 2008.

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

PORTO, O.M.; ROSSETI, V.; DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citros causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SBF, 1979. p. 681-192.

PRATES, H.S.; RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L. Observações sobre a doença podridão floral na citricultura paulista. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 296, 1995.

ROSSETTI, V.; CARVALHO, M.L.V.; VECHIATO, M.H.; BATISTA, F.A.S. Estudos sobre a queda prematura de frutos cítricos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife. **Anais...** Recife: SBF, 1981. p. 641-654.

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

SOUTHWICK, S.M.; DAVENPORT, T.L. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in citrus. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 81, p. 26-29, 1986.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control.** Oxon: CAB International, 1992. p. 1-26.

TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus – symptoms, disease cycle and control. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 106, p. 102-105, 1993.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions. St. Paul: APS Press, 2000. p. 300-316.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, p. 329-334, 1994.

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

USHIYAMA, K.; AONO, N.; KITA, N.; OGANA, J. First report of Pestalotia disease, anthracnose and angular leaf spot of kiwi fruit and their pathogen in Japan. **Annals of Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 62, p. 61-68, 1996.

VAILLANCOURT, L.J.; HANAU, R.M. Nitrate-nonutilizing mutants used to study heterokaryosis and vegetative compatibility in *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). **Experimental Mycology**, San Diego, v.18, p. 311-319, 1994.

WHARTON, P.S.; URIBEONDO, J.D. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 61, n. 1, p. 3-22, 2004.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, Lancaster, v. 88, p. 121-128, 1996.

ANEXOS

ANEXO A – Análise estatística da primeira inoculação em flores de citros por meio da comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança

(continua)

Isolados		Proporções		Intervalo de Confiança
Guacho	BA 001 a	0,926	0,929	(-0,164 ; 0,170)*
Guacho	CAMP 02	0,926	0,462	(0,248 ; 0,680)
Guacho	CAF 3	0,926	0,700	(-0,074 ; 0,526)*
Guacho	MR-1	0,926	0,143	(0,543 ; 1,023)
Guacho	Oso-03	0,926	0,000	(0,194 ; 0,828)
Guacho	Col 53	0,926	0,026	(0,572 ; 1,228)
Guacho	Col 19	0,926	0,000	(0,828 ; 1,024)
Guacho	PESS-01	0,926	0,000	(0,828 ; 1,024)
Guacho	PESS-07	0,926	0,000	(0,828 ; 1,024)
Guacho	Testemunha	0,926	0,000	(0,828 ; 1,024)
BA 001 a	CAMP 02	0,929	0,462	(0,232 ; 0,702)
BA 001 a	CAF 3	0,929	0,700	(-0,136 ; 0,594)*
BA 001 a	MR-1	0,929	0,143	(0,493 ; 1,079)
BA 001 a	Oso-03	0,929	0,000	(0,794 ; 1,064)
BA 001 a	Col 53	0,929	0,026	(0,760 ; 1,046)
BA 001 a	Col 19	0,929	0,000	(0,794 ; 1,064)
BA 001 a	PESS-01	0,929	0,000	(0,794 ; 1,064)
BA 001 a	PESS-07	0,929	0,000	(0,794 ; 1,064)
BA 001 a	Testemunha	0,929	0,000	(0,794 ; 1,064)
CAMP 02	CAF 3	0,462	0,700	(-0,075 ; 0,581)*
CAMP 02	MR-1	0,462	0,143	(-0,004 ; 0,642)*
CAMP 02	Oso-03	0,462	0,00	(0,270 ; 0,654)
CAMP 02	Col 53	0,462	0,026	(-1,544 ; 2,416)*
CAMP 02	Col 19	0,462	0,000	(0,270 ; 0,654)
CAMP 02	PESS-01	0,462	0,000	(0,270 ; 0,654)
CAMP 02	PESS-07	0,462	0,000	(0,270 ; 0,654)
CAMP 02	Testemunha	0,462	0,000	(0,270 ; 0,654)
CAF 3	MR-1	0,700	0,143	(0,172 ; 0,942)
CAF 3	Oso-03	0,700	0,00	(0,416 ; 0,984)
CAF 3	Col 53	0,700	0,026	(0,386 ; 0,962)

ANEXO A – Análise estatística da primeira inoculação em flores de citros por meio da comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança

(conclusão)

Isolados		Proporções		Intervalo de Confiança
CAF 3	Col 19	0,700	0,000	(0,416 ; 0,984)
CAF 3	PESS-01	0,700	0,000	(0,416 ; 0,984)
CAF 3	PESS-07	0,700	0,000	(0,416 ; 0,984)
CAF 3	Testemunha	0,700	0,000	(0,416 ; 0,984)
MR-1	Oso-03	0,143	0,00	(-0,117 ; 0,403)*
MR-1	Col 53	0,143	0,026	(-0,122 ; 0,407)*
MR-1	Col 19	0,143	0,000	(-0,117; 0,403)*
MR-1	PESS-01	0,143	0,000	(-0,117; 0,403)*
MR-1	PESS-07	0,143	0,000	(-0,117; 0,403)*
MR-1	Testemunha	0,143	0,000	(-0,117; 0,403)*
Oso-03	Col 53	0,000	0,026	(-0,024 ; 0,076)*
Oso-03	Col 19	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Oso-03	PESS-01	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Oso-03	PESS-07	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Oso-03	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Col 53	Col 19	0,026	0,000	(-0,024 ; 0,076)*
Col 53	PESS-01	0,026	0,000	(-0,024 ; 0,076)*
Col 53	PESS-07	0,026	0,000	(-0,024 ; 0,076)*
Col 53	Testemunha	0,026	0,000	(-0,024 ; 0,076)*
Col 19	PESS-01	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Col 19	PESS-07	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Col 19	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
PESS-01	PESS-07	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
PESS-01	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
PESS-07	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*

(*) – O valor 0 está contido no intervalo de 95% de confiança, indicando que as proporções são iguais

ANEXO B – Análise estatística da segunda inoculação em flores de citros por meio da comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança

(continua)

Isolados		Proporções		Intervalo de Confiança
Guacho	BA 001 a	0,840	1,000	(-0,304 ; -0,017)
Guacho	CAMP 02	0,840	0,000	(0,700 ; 0,980)
Guacho	CAF 3	0,840	0,706	(-0,181 ; 0,341)*
Guacho	MR-1	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
Guacho	Oso-03	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
Guacho	Col 53	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
Guacho	Col 19	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
Guacho	PESS-01	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
Guacho	PESS-07	0,840	0,037	(0,643 ; 0,963)
Guacho	Testemunha	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
BA 001 a	CAMP 02	1,000	0,000	(1,000 ; 1,000)
BA 001 a	CAF 3	1,000	0,706	(0,070 ; 0,510)
BA 001 a	MR-1	1,000	0,000	(1,000 ; 1,000)
BA 001 a	Oso-03	1,000	0,000	(1,000 ; 1,000)
BA 001 a	Col 53	1,000	0,000	(1,000 ; 1,000)
BA 001 a	Col 19	1,000	0,000	(1,000 ; 1,000)
BA 001 a	PESS-01	1,000	0,000	(1,000 ; 1,000)
BA 001 a	PESS-07	1,000	0,037	(0,891 ; 1,035)
BA 001 a	Testemunha	1,000	0,000	(1,000 ; 1,000)
CAMP 02	CAF 3	0,000	0,706	(0,490 ; 0,930)
CAMP 02	MR-1	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
CAMP 02	Oso-03	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
CAMP 02	Col 53	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
CAMP 02	Col 19	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
CAMP 02	PESS-01	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
CAMP 02	PESS-07	0,000	0,037	(-0,035 ; 0,105)*
CAMP 02	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
CAF 3	MR-1	0,706	0,000	(0,490 ; 0,930)
CAF 3	Oso-03	0,706	0,000	(0,490 ; 0,930)
CAF 3	Col 53	0,706	0,000	(0,490 ; 0,930)

ANEXO B – Análise estatística da segunda inoculação em flores de citros por meio da comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança

(conclusão)

Isolados		Proporções		Intervalo de Confiança
CAF 3	Col 19	0,706	0,000	(0,490 ; 0,930)
CAF 3	PESS-01	0,706	0,000	(0,490 ; 0,930)
CAF 3	PESS-07	0,706	0,037	(0,443 ; 0,903)
CAF 3	Testemunha	0,706	0,000	(0,490 ; 0,930)
MR-1	Oso-03	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
MR-1	Col 53	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
MR-1	Col 19	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
MR-1	PESS-01	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
MR-1	PESS-07	0,000	0,037	(-0,035 ; 0,105)*
MR-1	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Oso-03	Col 53	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Oso-03	Col 19	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Oso-03	PESS-01	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Oso-03	PESS-07	0,000	0,037	(-0,035 ; 0,105)*
Oso-03	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Col 53	Col 19	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Col 53	PESS-01	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Col 53	PESS-07	0,000	0,037	(0,000 ; 0,000)*
Col 53	Testemunha	0,000	0,000	(-0,035 ; 0,105)*
Col 19	PESS-01	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Col 19	PESS-07	0,000	0,037	(-0,035 ; 0,105)*
Col 19	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
PESS-01	PESS-07	0,000	0,037	(-0,035 ; 0,105)*
PESS-01	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
PESS-07	Testemunha	0,037	0,000	(-0,035 ; 0,105)*

(*) – O valor 0 está contido no intervalo de 95% de confiança, indicando que as proporções são iguais

ANEXO C – Análise estatística caracterização do heterocário Het5 e dos seus isolados parentais em flores de citros por meio da comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança

Isolados		Proporções		Intervalo de Confiança
CAMP 01	SPD 01	0,555	0,714	(-0,307 ; 0,652)*
CAMP 01	Het 5	0,555	0,000	(0,230 ; 0,880)
CAMP 01	Testemunha	0,555	0,000	(0,230 ; 0,880)
SPD 01	Het 5	0,714	0,000	(0,379 ; 1,049)
SPD 01	Testemunha	0,714	0,000	(0,379 ; 1,049)
Het 5	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*

(*) – O valor 0 está contido no intervalo de 95% de confiança, indicando que as proporções são iguais

ANEXO D – Análise estatística caracterização do heterocário Het3 e dos seus isolados parentais em flores de citros por meio da comparação entre duas proporções no intervalo de 95% de confiança

Isolados		Proporções		Intervalo de Confiança
Guacho	Col 53	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
Guacho	Het 3	0,840	0,539	(-0,007 ; 0,607)*
Guacho	Testemunha	0,840	0,000	(0,696 ; 0,984)
Col 53	Het 3	0,000	0,539	(0,270 ; 0,810)
Col 53	Testemunha	0,000	0,000	(0,000 ; 0,000)*
Het 3	Testemunha	0,539	0,000	(0,270 ; 0,810)

(*) – O valor 0 está contido no intervalo de 95% de confiança, indicando que as proporções são iguais

ANEXO E - Identificação do mutante, identificação do isolado parental, hospedeiro e classificação fenotípica do mutante

(continua)

Mutante	Isolado	Hospedeiro	Fenótipo
Guacho m1	Guacho	Citros	NitM
Guacho m2	Guacho	Citros	NitM
Guacho m3	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m4	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m5	Guacho	Citros	NitM
Guacho m6	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m7	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m8	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m9	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m10	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m11	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m12	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m13	Guacho	Citros	<i>nit3</i>
Guacho m14	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m15	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
Guacho m16	Guacho	Citros	<i>nit1</i>
SPD 01 m1	SPD 01	Citros	<i>nit3</i>
SPD 01 m2	SPD 01	Citros	<i>nit1</i>
SPD 01 m3	SPD 01	Citros	<i>nit3</i>
SPD 01 m4	SPD 01	Citros	<i>nit1</i>
SPD 01 m5	SPD 01	Citros	<i>nit1</i>
SPD 01 m6	SPD 01	Citros	<i>nit1</i>
SPD 01 m7	SPD 01	Citros	<i>nit1</i>
SPD 01 m8	SPD 01	Citros	<i>nit3</i>
SPD 02 m1	SPD 02	Citros	<i>nit1</i>
SPD 02 m2	SPD 02	Citros	<i>nit1</i>
SPD 02 m3	SPD 02	Citros	<i>nit1</i>
SPD 02 m4	SPD 02	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m1	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m2	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>

ANEXO E - Identificação do mutante, identificação do isolado parental, hospedeiro e classificação fenotípica do mutante

(continuação)

Mutante	Isolado	Hospedeiro	Fenótipo
BTU 01 m3	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m4	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m5	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m6	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m7	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m8	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m9	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m10	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m11	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m12	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
BTU 01 m13	BTU 01	Citros	<i>nit1</i>
MG 095 a m1	MG 095 a	Citros	NitM
MG 095 a m2	MG 095 a	Citros	<i>nit1</i>
MG 095 a m3	MG 095 a	Citros	<i>nit1</i>
MG 095 a m4	MG 095 a	Citros	<i>nit1</i>
MG 095 a m5	MG 095 a	Citros	<i>nit3</i>
PE 079 a m1	PE 079 a	Citros	<i>nit1</i>
PE 079 a m2	PE 079 a	Citros	<i>nit1</i>
PE 079 a m3	PE 079 a	Citros	<i>nit1</i>
PE 079 a m4	PE 079 a	Citros	<i>nit3</i>
SC 120 a m1	SC 120 a	Citros	<i>nit2</i>
SC 120 a m2	SC 120 a	Citros	<i>nit1</i>
BA 001 a m1	BA 001 a	Citros	<i>nit1</i>
BA 001 a m2	BA 001 a	Citros	<i>nit1</i>
BA 001 a m3	BA 001 a	Citros	<i>nit1</i>
BA 001 a m4	BA 001 a	Citros	<i>nit1</i>
BA 001 a m5	BA 001 a	Citros	<i>nit1</i>
BA 001 a m6	BA 001 a	Citros	<i>nit1</i>
BA 001 a m7	BA 001 a	Citros	NitM

ANEXO E - Identificação do mutante, identificação do isolado parental, hospedeiro e classificação fenotípica do mutante

			(continuação)
Mutante	Isolado	Hospedeiro	Fenótipo
BA 001 a m8	BA 001 a	Citros	<i>nit1</i>
TQ 045 a m 1	TQ 045 a	Citros	<i>nit1</i>
TQ 045 a m2	TQ 045 a	Citros	<i>nit1</i>
TQ 045 a m3	TQ 045 a	Citros	<i>nit1</i>
TQ 045 a m4	TQ 045 a	Citros	<i>nit1</i>
GP 025 a m1	GP 025 a	Citros	<i>nit1</i>
GP 025 a m2	GP 025 a	Citros	<i>nit1</i>
CAMP 01 m1	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 01 m2	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 01 m3	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 01 m4	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 01 m5	CAMP 01	Goiaba	<i>nit3</i>
CAMP 01 m6	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 01 m7	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 01 m8	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 01 m9	CAMP 01	Goiaba	<i>nit3</i>
CAMP 01 m10	CAMP 01	Goiaba	<i>nit1</i>
CAMP 02 m1	CAMP 02	Goiaba	<i>nit3</i>
CAMP 02 m2	CAMP 02	Goiaba	<i>nit3</i>
CAMP 02 m3	CAMP 02	Goiaba	<i>nit3</i>
CAMP 02 m4	CAMP 02	Goiaba	<i>nit3</i>
CAF 3 m1	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>
CAF 3 m2	CAF 3	Goiaba	NitM
CAF 3 m3	CAF 3	Goiaba	NitM
CAF 3 m4	CAF 3	Goiaba	NitM
CAF 3 m5	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>
CAF 3 m6	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>
CAF 3 m7	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>
CAF 3 m8	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>

ANEXO E - Identificação do mutante, identificação do isolado parental, hospedeiro e classificação fenotípica do mutante

(continuação)			
Mutante	Isolado	Hospedeiro	Fenótipo
CAF 3 m9	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>
CAF 3 m10	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>
CAF 3 m11	CAF 3	Goiaba	<i>nit1</i>
CAF 3 m12	CAF 3	Goiaba	<i>nit3</i>
MIR 3 m1	MIR 3	Goiaba	<i>nit3</i>
MIR 3 m2	MIR 3	Goiaba	<i>nit2</i>
Col 53 m1	Col 53	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 53 m2	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m3	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m4	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m5	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m6	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m7	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m8	Col 53	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 53 m9	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m10	Col 53	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 53 m11	Col 53	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 53 m12	Col 53	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 19 m1	Col 19	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 19 m2	Col 19	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 19 m3	Col 19	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 19 m4	Col 19	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 19 m5	Col 19	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 19 m6	Col 19	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 12 m1	Col 12	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 12 m2	Col 12	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 12 m3	Col 12	Pimentão	<i>nit2</i>
Col 12 m4	Col 12	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 12 m5	Col 12	Pimentão	<i>nit3</i>

ANEXO E - Identificação do mutante, identificação do isolado parental, hospedeiro e classificação fenotípica do mutante

			(continuação)
Mutante	Isolado	Hospedeiro	Fenótipo
Col 12 m6	Col 12	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 12 m7	Col 12	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 12 m8	Col 12	Pimentão	<i>nit1</i>
Col 35 m1	Col 35	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 35 m2	Col 35	Pimentão	<i>nit2</i>
Col 35 m3	Col 35	Pimentão	<i>nit2</i>
Col 35 m4	Col 35	Pimentão	<i>nit3</i>
Col 35 m5	Col 35	Pimentão	<i>nit3</i>
Oso-05 m1	Oso-05	Morango	<i>nit1</i>
Oso-05 m2	Oso-05	Morango	<i>nit3</i>
Oso-05 m3	Oso-05	Morango	<i>nit3</i>
Oso-04 m1	Oso-04	Morango	<i>nit3</i>
Oso-04 m2	Oso-04	Morango	<i>nit3</i>
Camarosa 8 m1	Camarosa 8	Morango	<i>nit3</i>
MR-1 m1	MR-1	Morango	<i>nit3</i>
MR-1 m2	MR-1	Morango	NitM
MR-1 m3	MR-1	Morango	<i>nit3</i>
MR-1 m4	MR-1	Morango	<i>nit3</i>
MR-1 m5	MR-1	Morango	NitM
MR-7 m1	MR-7	Morango	<i>nit1</i>
MR-7 m2	MR-7	Morango	<i>nit3</i>
MR-7 m3	MR-7	Morango	<i>nit1</i>
MR-7 m4	MR-7	Morango	<i>nit1</i>
OsoG 1 m1	OsoG 1	Morango	<i>nit1</i>
OsoG 1 m2	OsoG 1	Morango	<i>nit3</i>
OsoG 1 m3	OsoG 1	Morango	<i>nit1</i>
OsoG 1 m4	OsoG 1	Morango	<i>nit1</i>
OsoG 1 m5	OsoG 1	Morango	<i>nit1</i>
OsoG 1 m6	OsoG 1	Morango	<i>nit1</i>

ANEXO E - Identificação do mutante, identificação do isolado parental, hospedeiro e classificação fenotípica do mutante

Mutante	Isolado	Hospedeiro	(conclusão)
			Fenótipo
OsoG 1 m7	OsoG 1	Morango	<i>nit1</i>
OsoG 1 m8	OsoG 1	Morango	<i>nit1</i>
OsoG 2 m1	OsoG 2	Morango	<i>nit3</i>
PESS-01 m1	PESS-01	Pêssego	<i>nit2</i>
PESS-01 m2	PESS-01	Pêssego	<i>nit2</i>
PESS-01 m3	PESS-01	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-01 m4	PESS-01	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-01 m5	PESS-01	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-01 m6	PESS-01	Pêssego	<i>nit2</i>
PESS-02 m1	PESS-02	Pêssego	<i>nit2</i>
PESS-02 m2	PESS-02	Pêssego	<i>nit2</i>
PESS-07 m1	PESS-07	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-07 m2	PESS-07	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-07 m3	PESS-07	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-07 m4	PESS-07	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-07 m5	PESS-07	Pêssego	<i>nit3</i>
PESS-07 m6	PESS-07	Pêssego	<i>nit2</i>
PESS-07 m7	PESS-07	Pêssego	<i>nit3</i>