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

**Características morfo-culturais e moleculares de isolados de
Colletotrichum guaranicola Albuquerque procedentes do Estado do
Amazonas**

Ananias Alves Cruz

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2014**

Ananias Alves Cruz
Engenheiro Agrônomo

**Características morfo-culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum*
guaranicola Albuquerque, procedentes do Estado do Amazonas**

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2014

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

Cruz , Ananias Alves

Características morfo-culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum* guaranicola Albuq. procedentes do Estado do Amazonas / Ananias Alves Cruz - - Piracicaba, 2014.
105 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Guaranazeiro 2. Caracterização molecular 3. Filogenia 4. Morfologia de conídios e apressórios I. Título

CDD 633.88328
C957c

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

**À Francisca Pereira Cruz e a Eustáquio Alves Moreira, meus pais,
pelos ensinamentos de vida;
À Arlene Pereira de Souza, companheira de todas as horas,**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, pela orientação;

Ao Paulo Cézar Santos, pela colaboração nas análises estatísticas;

Ao Luiz Alberto Guimarães Assis (Tirico), pela ajuda na coleta dos isolados;

Aos pesquisadores, Dra. Rosalee Coelho Netto e Dr. Rogério Hanada, pelo espaço cedido no Laboratório de Fitopatologia e casa-de-vegetação do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA);

À Dra. Margarida Fumiko Ito, Curadora da Coleção de Micologia do IAC, por ceder o isolado-tipo de *C. guaranicola*;

Ao Dr. Wagner Vicente Pereira, pelas sugestões no texto;

Ao Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança, pela ajuda na análise filogenética;

À Flávia Rogério, pelas sugestões referentes à filogenia;

À Juliana Ramiro, pelas sugestões no texto;

À Carolina de Cássia Pani Medeiros, pelas ajuda nos trabalhos de caracterização dos isolados;

À Marina Coan Gordoni Barbieri, Andrea González Colorado, Geisson Hernandez Romero e Vanessa Mendez, pela ajuda nos trabalhos de caracterização dos isolados;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Esalq/USP, pelos ensinamentos e contribuições;

Ao prof. Dr. Francisco Ossamu Tanaka pela ajuda na caracterização morfológica dos isolados;

Às funcionárias da biblioteca pela prestatividade;

À todos os amigos do Setor de Fitopatologia, em especial aos colegas do Laboratório de Micologia: Hugo Tozze Júnior, Juliana Ramiro, Wagner Vicente Pereira, Carlos Augusto Dórea Bragança, Flávia Rogério, Paulo Cézar Santos, Andrea Gonzalez Colorado, Geisson Hernandez Romero e Larissa Lima;

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

Obrigado.

BIOGRAFIA

Ananias Alves Cruz, filho de Eustáquio Alves Moreira e Francisca Pereira Cruz, nasceu em 19 de outubro de 1956, na cidade de Benjamin Constant, no Estado do Amazonas.

Em março de 1977, ingressou no Curso de Agronomia da Fundação Universidade do Amazonas, atual Universidade Federal do Amazonas (Ufam) em Manaus, graduando-se em novembro de 1986.

Em 1991, obteve o título de Especialista em Fitossanidade pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada na Cidade do Recife.

Iniciou o Mestrado em Sistemas Agroflorestais na Ufam, em março de 2001, concluindo-o em 2004.

Em março de 2010, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP.

"Se os teus projetos forem para um ano,
semeia o grão.
Se forem para dez anos,
planta uma árvore.
Se forem para 100 anos,
instrui o povo."

(Provérbio chinês)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	21
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Revisão Bibliográfica	23
2.1.1 Guaranazeiro.....	23
2.1.2 Aspectos gerais da antracnose e do gênero <i>Colletotrichum</i>	24
2.1.3 <i>Colletotrichum guaranicola</i>	31
2.2 Material e Métodos	33
2.2.1 Obtenção dos isolados	33
2.2.2 Obtenção de culturas monospóricas	38
2.2.3 Preservação dos isolados	39
2.2.4 Caracterização fisiológica pela Taxa de Crescimento Micelial Diária (TCMD) e descrição das características culturais	39
2.2.5 Caracterização morfológica	40
2.2.5.1 Preparo de lâminas semipermanentes para estudos de morfometria de conídios e apressórios	40
2.2.5.2 Morfometria de conídios e apressórios.....	41
2.2.5.2.1 Metodologia	41
2.2.6 Taxa de Crescimento Micelial Diária em função da temperatura	42
2.2.7 Caracterização enzimática	43
2.2.7.1 Atividade Amilolítica	43
2.2.7.2 Atividade celulolítica	44
2.2.7.3 Atividade lacaselítica	44
2.2.7.4 Atividade lipolítica.....	45
2.2.7.5 Atividade pectinolítica.....	45
2.2.7.6 Atividade proteolítica	46
2.2.7.7 Teste bioquímico para fontes de carbono	46
2.2.8 Caracterização molecular.....	47
2.2.8.1 Preparo do tampão de extração	48
2.2.8.3 Quantificação do DNA e Diluição	49
2.2.8.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do DNA	49
2.2.8.5 Gel de agarose.....	50
2.2.8.6 Diluição das amostras	50
2.2.8.7 Purificação das amostras	50
2.2.8.8 Sequenciamento	51

2.2.8.9 Edição das sequências e construção das árvores filogenética	51
2.2.9 Caracterização patogênica	52
2.2.9.1 Origem, seleção e preparo dos genótipos	52
2.2.9.2 Preparo do inóculo	53
2.2.9.3 Inoculação das plantas	53
2.3 Resultados e Discussão	54
2.3.1 Taxa de Crescimento Micelial Diária (TCMD) e características culturais.....	54
2.3.2 Morfometria de conídios	65
2.3.3 Morfometria de apressórios	74
2.3.4 Taxa de crescimento micelial diária em função da temperatura	79
2.3.5 Atividade enzimática	81
2.3.6 Filogenia	86
2.3.7 Caracterização patogênica	92
3 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS	99

RESUMO

Características morfo-culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. procedentes do Estado do Amazonas

O Brasil é o único produtor, em escala comercial, de guaraná do mundo e o Estado do Amazonas destaca-se como o segundo maior produtor do Brasil, sendo superado apenas pelo Estado da Bahia. O principal fator limitante à expansão da cultura do guaranazeiro na região amazônica é a antracnose, causada por *Colletotrichum guaranicola* Albuq. Este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados do fungo visando sua correta identificação. Foram realizadas as caracterizações cultural, morfológica, fisiológica, enzimática, patogênica e molecular (filogenia multilocus). Na caracterização morfo-cultural houve variação no tamanho de conídios e apressórios entre os isolados, porém todos ficaram dentro da faixa de amplitude descrita para a espécie *C. guaranicola* e para duas outras espécies (*C. gloeosporioides* e *C. boninense*). Predominaram conídios de formato cilindro a oblongo e apressórios arredondados. Com exceção de um grupo de isolados de Maués (série C), todos os demais exibiram hilo na base do conídio. Comprimento e largura de conídios e apressórios não foram características importantes na diferenciação dos isolados de *C. guaranicola* devido à sobreposição no tamanho. A taxa de crescimento micelial foi determinada em meio BDA e permitiu diferenciar dois grupos de isolados: com taxa de crescimento acima de 10 mm/dia e abaixo dessa taxa. Com exceção de C-12 e C-14, todos os isolados da série C cresceram acima dos demais, comparando-se aos isolados padrões das espécies *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. acutatum*. Todos os demais cresceram abaixo desse valor. O maior crescimento foi registrado para C-09 (12,25 mm/dia) e o menor para 2601 (2,71 mm/dia). Os demais ficaram na faixa intermediária. Diferença na coloração da colônia também permitiu separar os isolados em duas categorias: colônia branca a creme amarelada e colônias cinza a cinza escuro, semelhante aos padrões de *C. boninense* e *C. gloeosporioides*, respectivamente. Todos os isolados cresceram melhor na faixa de 25 °C, porém os isolados C-18 e C-19 foram capazes de crescer em temperaturas mais altas, em relação aos demais isolados. A caracterização enzimática revelou que *C. guaranicola* produz várias enzimas, destacando-se a pectinase. Por outro lado, houve baixa produção de amilase. Somente dois isolados de *C. guaranicola* (C-18 e C-19) e os padrões de *C. gloeosporioides* e *C. boninense* foram capazes de utilizar o ácido cítrico como fonte de carbono. Com exceção dos isolados 2361, 2419 e 2554, os demais isolados testados foram capazes de utilizar o tartarato de amônio. A caracterização filogenética foi realizada com base na amplificação e sequenciamento parcial dos genes Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), Actina, Quitina Sintase, Calmodulina e região transcrita interna (ITS). Os isolados testados formaram dois clados distintos, o primeiro (25 isolados) agrupou no complexo *C. boninense* próximo a *C. petchii* e o outro no complexo *C. gloeosporioides* próximo a *C. siamense*. A caracterização patogênica foi realizada com base no diâmetro da lesão produzida por oito isolados de *C. guaranicola* em dois genótipos de guaranazeiro (suscetível e resistente). O isolado C-18 expressou maior severidade quando inoculado nos dois genótipos, enquanto o isolado 2512 demonstrou a menor severidade.

Palavras-chave: Guaranazeiro; Caracterização molecular; Filogenia; Morfologia de conídios e apressórios

ABSTRACT

Morpho-cultural and molecular characteristics of isolates of *Colletotrichum guaranicola* Albuq. from the State of Amazonas

Brazil is the world's sole producer of guaraná on a commercial scale, and the Amazonas State stands out as Brazil's the second largest producer, only after the Bahia State. The main limiting factor for the expansion of guaraná culture in the Amazon region is anthracnose caused by *Colletotrichum guaranicola* Albuq. This study aimed to characterize isolates of the fungus for its correct identification. Cultural, morphological, physiological, enzymatic, pathogenic, and molecular characterizations were performed (multilocus phylogeny). In the morpho-cultural characterization, there was variation in the size of conidia and appressoria among the isolates, but all remained within the range of amplitude described for the species *C. guaranicola* and for two other species (*C. gloeosporioides* and *C. boninense*). The cylinder-shaped conidia were oblong and the appressoria were round, except for a group of isolates of Maués (C series), all other isolates exhibited a hilo at the base of the conidium. Length and width of conidia and appressoria were not important features in the differentiation of isolates of *C. guaranicola* due to the overlap in size. The mycelial growth rate was determined in BDA medium and allowed to differentiate two groups of isolates: growth rate above 10 mm/day and growth rate below 10 mm/day. With the exception of C-12 and C-14, all C-series isolates grew above the rest, comparing to standard isolates of species *C. gloeosporioides*, *C. boninense* and *C. acutatum*. All others grew below the standard values. The highest growth was registered for C-09 (12.25 mm/day) and the lowest for 2601 (2.71 mm/day). The others remained within an intermediate range. Color difference of the colony also allowed to separate the isolates into two categories: white to yellowish cream colony and grey to dark grey colonies, similar to standards of *C. boninense* and *C. gloeosporioides*, respectively. All isolates grew best at the range of 25°C, but the isolates C-18 and C-19 were able to grow at higher temperatures, compared to other isolates. The enzymatic characterization showed that *C. guaranicola* produces various enzymes, mainly pectinase. On the other hand, there was low production of amylase. Only two isolates of *C. guaranicola* (C-18 and C-19) and the standards of *C. gloeosporioides* and *C. boninense* were able to use citric acid as a carbon source. With the exception of isolates 2361, 2419 and 2554, the other isolates tested were able to use the ammonium tartrate. The phylogenetic characterization was performed based on amplification and partial sequencing of genes Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Actin, Chitin Synthase, Calmodulin and internal transcribed section (ITS). The isolates tested formed two distinct clads. The first (25 isolates) grouped in the complex *C. boninense* near *C. petchii* and the other in the complex *C. gloeosporioides* near *C. siamense*. The pathogenic characterization was performed based on the lesion diameter caused by eight isolates of *C. guaranicola* in two guaraná genotypes (susceptible and resistant). The isolate C-18 expressed greater severity when inoculated into both genotypes, while isolate 2512 showed least severity.

Keywords: Guaraná; Molecular characterization; Phylogeny; Morphology of conidia and appressoria

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mapa de localização das áreas de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. e produtoras de guaraná, no Estado do Amazonas (Brasil). Os municípios estão representados com suas respectivas cores: Maués (verde escuro); Manaus (alaranjado); Presidente Figueiredo (verde água); Itacoatiara (azul); Manacapuru (vermelho); Boa Vista dos Ramos (cinza); e, Urucará (amarelo). Imagens retirada do de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Amazonas#mediaviewer/Ficheiro:Amazonas_MesoMicroMunicip.svg>. Acesso em: 10 mai. 2014.....34
- Figura 2 – Formas de conídios avaliados: 1. Fusiforme; 2. Oblongo ou cilíndrico; 3. Clavado; e, 4. Constricto. Adaptado de Tozze Júnior (2007).....42
- Figura 3 – Formas de apressórios: 1. Lobados; 2. Levemente lobados, e, 3. Arredondados. Adaptado de Cox e Irwin, 1988; Sutton, 1980).....42
- Figura 4 – Aspecto de colônias de isolados de *Colletotrichum guaranicola* cultivados a 25 °C em BDA (Fila 1 e 2); *C. boninense* e *C. gloeosporioides* (fila 3). Da esquerda para a direita. Primeira fila: C–16, C–18, C–19, 2373, 2506. Segunda fila: 2509, 2516, 2517, 2539, 2554. Terceira fila: PS–67, PS–64, MN–57.....64
- Figura 5 – Reverso das colônias exibidas na Figura 2.....64
- Figura 6 – Aspectos do verso de colônias de *Colletotrichum guaranicola* cultivadas a 25 °C em BDA, após seis dias de incubação. Da esquerda para direita. Fila 1: 2552, 2361, 2353, 2543 e C–15. Fila 2: 2360, 2342, 2419, 2519 e 2545. Fila 3: 2348, C–33, 2512, 2396 e 2412. Fila 4: 2343, 2365, 2109, C–9 e 2380. Fila 5: C–14 e 2411.....65
- Figura 7 – Taxa de crescimento micelial diário (TCMD), ao longo de seis dias, de oito isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose coletadas em áreas de produção de municípios do Estado do Amazonas, Brasil, em relação à temperatura.....80
- Figura 8 – Árvore filogenética de inferência Bayesiana de 25 isolados de *C. guaranicola* (vermelho) comparadas com 21 sequências de espécies do complexo *C. boninense* (preto), mais um *outgroup* de *C. gloeosporioides*. A

árvore foi reconstruída usando dados particionados de sequências de ITS, GADPH, Actina, Quitina Sintase e Calmodulina. Valores de probabilidade Bayesiana posteriores são mostrados nos nós. A escala representa o número de mudanças esperadas por local.....87

Figura 9. Árvore filogenética de inferência Bayesiana de cinco isolados de *C. guaranicola* (vermelho) comparadas com 52 sequências de espécies do complexo *C. gloeosporioides* (preto) mais um *outgroup* de *C. boninense*. A árvore foi reconstruída usando dados particionados de sequências de ITS, GADPH, Actina, Quitina Sintase e Calmodulina. Valores de probabilidade Bayesiana posteriores são mostrados nos nós. A escala abaixo representa o número de mudanças esperadas por local.....89

Figura 10 – Figura de uma Escala Descritiva para os diversos tipos de lesão (folha do clone BRS Maués inoculada com o isolado C-18). A. Sem lesão; B. Amarelecimento abaixo da área do disco; C. Pontos necróticos na área foliar abaixo do disco; D. Lesão necrótica definitiva e restrita à área do disco; e, E. Lesão necrótica definida além da área do disco.....94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Numeração, hospedeiro, método de propagação da planta e município de coleta dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose, no Estado do Amazonas.....36
- Tabela 2 – Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil.....55
- Tabela 3 – Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura), presença de hilo e formato de conídios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose.....66
- Tabela 4 – Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura) e formato de apressórios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose.....76
- Tabela 5 – Área do halo de degradação (cm²) da atividade das enzimas amilase, celulase, lacase, lipase, pectinase, proteinase e teste bioquímico de fontes de carbono do tartarato de amônio e ácido cítrico, em meios específicos, de oito isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp., obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose coletadas em áreas de produção de municípios do Estado do Amazonas, Brasil.....83
- Tabela 6 – Severidade final (em cm), taxa de progresso da doença (r), Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em folhas de guaranazeiro inoculadas com disco de micélio contendo estruturas do patógeno *Colletotrichum guaranicola*.....95

1 INTRODUÇÃO

O único produtor de guaraná [*Paulinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke], em escala comercial, no mundo é o Brasil. Segundo estimativas do IBGE (2014), referente a dados do ano de 2012, a área destinada à colheita de guaranazeiro ocupavam aproximadamente 13.998 ha no Brasil e a área colhida foi estimada em 11.489 ha, com produção de 3.794 t, com rendimento médio de 330,29 kg/ha, que gerou R\$ 34.061.000,00. Desse total, o Estado da Bahia participou com 2.682 t e área colhida de 6.669 ha, se constituindo no maior produtor de guaraná-semente do Brasil. O Estado do Amazonas vem em segundo lugar, produzindo 882 t de guaraná-semente do Brasil. Dados anteriores mostravam um aumento na área cultivada de guaraná no país.

No ano de 2010, os principais estados produtores de guaraná foram: Bahia (2.682 toneladas), Amazonas (822 toneladas) e Mato Grosso (242 toneladas). Portanto, nos últimos anos, houve redução na área cultivada no Amazonas (IBGE, 2014). No Amazonas, essa redução na guaranicultura se deve a diversos fatores, dentre os quais, a incidência da antracnose, considerada a doença mais importante do guaranazeiro e fator limitante à expansão da cultura no Estado.

As antracnoses são doenças cujos sintomas afetam todas as partes da planta, especialmente folhas, frutos, ramos, brotos e inflorescência. (SUTTON, 1992). Os sintomas diferem de um órgão para outro, porém os mais comuns são aqueles que afetam o desenvolvimento dos frutos no campo e em pós-colheita, durante o armazenamento (FREEMAN, 1998). Os sintomas típicos da doença são caracterizados por lesões arredondadas ou angulares escuras, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992; LIMA-FILHO, 2003).

O agente causal da doença é o fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque, tendo sido descrito pela primeira vez por Albuquerque (1961). Entretanto, a taxonomia da espécie *C. guaranicola* ainda não é reconhecida pela revisão mais recente do gênero realizada por Hyde et al. (2009). Além disso, o gênero *Colletotrichum* notoriamente apresenta uma grande variação morfológica, o que reflete a ampla variabilidade genética que ocorre entre e dentro das espécies deste gênero (SUTTON, 1992). Dessa forma, estudos de identificação e caracterização de isolados tornam-se necessários, visto que são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias

eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença (WALLER, 1992; ANDRADE et al., 2007).

Sabe-se, porém, que a identificação de espécies de *Colletotrichum* unicamente com base em caracteres morfológicos é falha, porque os fatores ambientais, tais como composição do meio, temperatura de crescimento, luz e outras variáveis, causam variações no tamanho de conídios e cor da colônia (FREEMAN et al., 1998). Além disso, a especificidade hospedeira é característica complexa, havendo diversos relatos de mais de uma espécie de *Colletotrichum* causando a mesma doença em um único hospedeiro, ou uma mesma espécie causando doença em mais de um hospedeiro (FREEMAN et al., 1998). Desse modo, as características patogênicas também não são confiáveis quando usadas unicamente com finalidade taxonômica.

Assim, um passo importante na criação de taxonomia estável para o gênero é a chamada abordagem polifásica, integrando características morfológicas, culturais e patogênicas com testes moleculares baseados em análise filogenética de sequências (HYDE et al., 2009; CAI et al., 2009).

O objetivo desse trabalho foi fazer a caracterização de isolados do agente causal da antracnose do guaranazeiro, visando sua correta identificação. Foram realizadas as seguintes caracterizações: cultural; morfológica; fisiológica; enzimática, patogênica e molecular (filogenia).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Guaranazeiro

O guaranazeiro é uma planta nativa da Amazônia distribuída atualmente pela Amazônia Legal, Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso e São Paulo, e já era conhecida há séculos pelas civilizações indígenas, existindo relatos de sua utilização em 1669 (PESQUISA FAPESP, 2013).

O guaraná tem propriedades medicinais comprovadas cientificamente, podendo ser usado como: antitérmico, antineurálgico, antidiarréico, estimulante, analgésico e antigripal. Suas sementes são usadas na indústria farmacêutica e na fabricação de refrigerantes, xaropes, sucos, pós-solúveis e bastões. O bastão é a forma utilizada pelas populações nativas para uso e comercialização do guaraná. A semente seca é colocada no pilão e misturada com água até formar uma massa pastosa. Essa massa é moldada manualmente na forma de bastão. Os bastões são desidratados e tornam-se firmes. Os nativos usam a língua do pirarucu para ralar o bastão e preparar a bebida que é servida em cuia (TAVARES et al., 2005).

O guaraná em pó é muito utilizado por laboratórios, farmácias e lojas de produtos naturais para fabricação de produtos energizantes. Estes fatores despertaram nos agricultores da região o interesse por sua domesticação e exploração racional em forma de plantios comerciais. O produto desponta com grande potencial para os mercados interno e externo, e no Estado do Amazonas é uma cultura de grande importância para a agricultura familiar, uma vez que o guaraná é cultivado principalmente por pequenos produtores, envolvendo um grande contingente de mão-de-obra familiar (TAVARES et al., 2005).

O Brasil é o único produtor, em termos comerciais, de guaraná do mundo. No Amazonas, o guaranazeiro é uma cultura plantada tanto por grandes como por pequenos produtores.

No Amazonas, em 2003, a produtividade média da cultura foi de 150 kg de sementes secas por hectare, menor que a média do Brasil, que foi de 298 kg/ha. Esta produtividade é baixa quando comparada com as obtidas com os clones lançados pela Embrapa, que produzem pelo menos 400 kg/ha/ano de sementes secas. As razões apontadas para esta baixa produtividade são o não-uso de mudas de clones

selecionados, o plantio de variedades tradicionais não melhoradas, a idade avançada dos guaranazais, a alta incidência de pragas e doenças e a falta de tratamentos culturais adequados (TAVARES et al., 2005).

Atualmente, quase toda a produção brasileira de guaraná é consumida no mercado interno, sendo pequena a quantidade exportada para outros países. Estima-se que, da demanda nacional de sementes de guaraná, pelo menos 70% seja absorvida pelos fabricantes de refrigerantes, enquanto o restante é comercializado na forma de xarope, bastão, pó, extrato e outras formas (TAVARES et al., 2005).

2.1.2 Aspectos gerais da antracnose e do gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* sp. (teleomorfo: *Glomerella*) compreende várias espécies, incluindo fitopatogênicas (MENEZES, 2002), saprófitas (MENEZES, 2002; SUTTON, 1980) e endofíticas (AZEVEDO, 1998). As espécies parasitas são responsáveis por doenças economicamente importantes, denominadas antracnoses, sendo que as plantas estão sujeitas a doença em todas as fases de seu desenvolvimento.

Os sintomas induzidos por *Colletotrichum* spp. incluem desde crestamento foliar, *damping-off* de pré e pós-emergência, morte descendente dos ponteiros, podridões de frutos e raízes, caracterizando-se por lesões escuras e deprimidas, que se mostram subcircular ou angular, sobre as quais massas de esporos de coloração salmão são produzidas (BAILEY; JAGER, 1992).

De acordo com Bailey e Jeger (1992), o gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos em todo o mundo, especialmente nas regiões subtropicais e tropicais. Afirmam que os patógenos incluídos nesse gênero causam doenças economicamente importantes em cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças e culturas perenes, incluindo frutíferas, atacando partes abaixo do solo em todos os estágios de maturidade, de plântulas a árvores adultas, até a semente.

Colletotrichum spp. e seu teleomorfo *Glomerella cingulata* pertencem a um grupo de patógenos importantes e largamente disseminados no mundo inteiro, com mais de 900 espécies isoladas de ampla gama de plantas hospedeiras, em algumas das quais são importantes patógenos de plantas (SUTTON, 1980). Alguns dos representantes desse grupo de fungos são frequentemente relatados como colonizadores endofíticos de plantas tropicais (SUTTON, 1980; RODRIGUES;

PETRINI, 1997). Os autores relatam a habilidade de *Colletotrichum* em causar infecções quiescentes ou latentes, o que o torna um importante patógeno pós-colheita nos trópicos.

A princípio, presumiu-se que os fungos incluídos nesse gênero tivessem alta especificidade hospedeira. Desse modo, a identificação da espécie estava atrelada ao hospedeiro do qual foi isolada, resultando em cerca de 750 espécies descritas. Posteriormente, com base em estudos de morfologia de conídios e características culturais, foi possível reduzir o número de espécies para cerca de 40 (SUTTON, 1980).

Colletotrichum é um gênero notoriamente variável em questões fundamentais relacionadas à taxonomia, evolução, origem da variação, especificidade hospedeira e mecanismos de patogenicidade, que ainda permanecem desconhecidas (BRYSON et al., 1992). Para ilustrar alguns problemas de especificidade hospedeira e a dificuldade do uso desse critério na delimitação de espécies de *Colletotrichum* spp., alguns exemplos são citados. O morangueiro (*Fragaria* × ananassa Duch.), por exemplo, pode ser infectado por *C. fragariae* Brooks, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (AZEVEDO, 1998). As três espécies causam antracnose, mas a podridão do pedúnculo, inflorescências e frutos, conhecida como “flor preta”, é atribuída somente a *C. acutatum*.

Embora a identificação ao nível de gênero esteja hoje bem definida, os conceitos para separação de espécies em *Colletotrichum* permanecem ainda confusos, especialmente para os grupos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (WEIR et al., 2012).

A diferenciação de espécies de *Colletotrichum* spp. é feita com base em caracteres morfológicos, tais como dimensão e forma de conídios e apressórios, além dos testes de patogenicidade em gama de hospedeiros (SUTTON, 1992). O limitado número de descritores taxonômicos convencionais disponíveis para diferenciação de espécies do gênero *Colletotrichum* spp. e o rápido desenvolvimento de métodos baseados em marcadores moleculares tem levado ao aprimoramento das técnicas de separação de espécies com maior precisão (HYDE et al., 2009). A abordagem mais recentemente utilizada é por meio de sequenciamento de genes conservados, seguido de filogenia multilocus (DAMM et al., 2012a, DAMM et al., 2012b, WEIR et al., 2012).

O progresso dos métodos moleculares foi revolucionado pela descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR), um método que permite a amplificação de um grande número de cópias de uma parte do DNA presente em baixa concentração,

o ideal para fungos de crescimento lento ou material infectado assintomaticamente, contendo pouca biomassa fúngica (GAMS, et al., 2007).

De acordo com Hyde et al. (2009), a identificação correta das espécies dentro do gênero *Colletotrichum* tem se mostrado muito difícil, principalmente devido ao número limitado de caracteres morfológicos utilizados com essa finalidade, e também porque raramente é formado o estágio teleomórfico. Os autores afirmam também que a delimitação de espécies através de critérios moleculares baseados somente na análise filogenética de um único gene não tem obtido muito sucesso. Dessa forma, apontam como causa parcial desse insucesso o grande número de espécies que estão depositadas com nomes errados no GeneBank. Por outro lado, alguns autores afirmam que a única forma de superar essa dificuldade é associar técnicas tradicionais com técnicas moleculares para caracterizar e identificar espécies dentro de *Colletotrichum* (PERES et al., 2002; MORIWAKI et al., 2003).

Cannon et al. (2000) relatam que a análise do ácido nucléico é a maneira mais confiável para classificar espécies de *Colletotrichum*, uma vez que as características do DNA não são diretamente influenciadas pelos fatores ambientais. Por isso, na atualidade, Cannon et al. (2000) e Cai et al. (2009) afirmam que o uso combinado de ferramenta de identificação molecular com técnicas morfológicas tradicionais é, até o presente momento, a maneira mais apropriada para estudar complexos de espécies dentro do gênero *Colletotrichum*.

Os métodos moleculares têm-se revelado como ferramentas bastante úteis na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum*. Como exemplo da aplicação dessa ferramenta tem-se a comparação de sequências da região ITS 1 do rDNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero, que levaram ao desenvolvimento de oligonucleotídeos (*primers*/iniciadores) táxon-específicos para a diferenciação entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (MILLS et al., 1992). Esses *primers*/iniciadores têm sido utilizados para a confirmação da identidade de isolados patogênicos a diversas hospedeiras (ADASKAVEG; HARTIN, 1997; FREEMAN et al., 1998; PERES et al., 2002; AFANADOR-KAFURI et al., 2003).

Marcadores moleculares, como AFLP e APPCR vêm sendo utilizados para identificação e observação de variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* provenientes de diversas fruteiras (PERES et al., 2002; TALHINHAS et al., 2005), de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) (SICARD et al., 1997) dentre outras espécies.

Um dos problemas com a identificação acurada de espécies de *Colletotrichum* usando análise filogenética multilocus ou DNA *barcoding* é que muitas sequências estão depositadas com nomes errados no GeneBank, principalmente as da região ITS, com taxa de 86% de erro (HYDE, 2009; CROUCH et al., 2009). No entanto, a análise filogenética que utilizam dados de sequências ITS é uma ferramenta para dar uma identificação preliminar para espécies de *Colletotrichum* ou para colocá-las num complexo de espécies (CAI et al., 2009).

Cai et al. (2009) relatam que a filogenia multilocus provê entendimento muito melhor do relacionamento dentro do gênero *Colletotrichum* e deve ser sempre empregados. De acordo com os autores, a sistemática de *Colletotrichum* deve ser baseada em filogenia multilocus, comparando espécimes-tipo, e uma linhagem filogenética deve ser bem definida em conjunção com caracteres polifásicos confiáveis, tais como morfologia, fisiologia, patogenicidade, características culturais e metabólitos secundários.

No passado, a classificação taxonômica de *Colletotrichum* spp era baseada principalmente em características morfológicas e culturais (tamanho e forma de conídios e apressórios; presença/ausência de setas, escleródios, acérvulos, estado teleomórfico, cor das colônias, taxa de crescimento, etc), às vezes complementadas com informação sobre patogenicidade ou metabolismo. Porém, esses caracteres se revelaram insuficientes quando a cultura era estéril, não viável ou quando havia sobreposição nas medidas das estruturas reprodutivas estudadas, uma vez que tradicionalmente as espécies de *Colletotrichum* têm sido delimitadas e identificadas utilizando essas características (SIMONDS, 1965; SMITH; BLACK, 1990; SUTTON, 1992; GAMS, et al., 2007). Porém, com o passar dos tempos, esses métodos se revelaram inadequados para fungos com crescimento lento, resultando em longos períodos de crescimento para se obter material suficiente para a identificação. Além disso, a identificação baseada na morfologia frequentemente requer o conhecimento de um especialista em um gênero particular, surgindo daí a necessidade de métodos que permitisse a identificação, mesmo quando o fungo produzisse pouca biomassa (fungos com crescimento lento ou nos primeiros estágios de infecção), ou quando é estéril, não podendo ser identificado ao nível de espécies usando caracteres morfológicos (GAMS, et al., 2007).

Aqui, novamente é enfatizado que a identificação com base apenas em critérios morfo-culturais é insuficiente para delimitação e diferenciação corretas de espécies

dentro do gênero *Colletotrichum*, e isso se deve à grande variação observada na morfologia e no fenótipo entre espécies e isolados, sob a influência de condições ambientais (HYDE et al., 2009).

Guozhong et al. (2004) estudaram a diversidade e a especificidade hospedeira de uma coleção de *strains* de *Colletotrichum* sp. derivados de colônias de fungos endofíticos isolados de folhas de doze espécies de árvores na Guiana. Os estudos levaram à identificação de oito espécies de *Colletotrichum*, vários dos quais produziram o teleomorfo *Glomerella cingulata* em cultura; porém, somente um *strain*, identificado como *C. acutatum*, pôde ser separado utilizando critérios moleculares. Sessenta e dois *strains* restantes foram identificados como *C. gloeosporioides*/*Glomerella cingulata*. Na realidade, *C. gloeosporioides* é reconhecido hoje como um grupo de espécies muito polimórficas e amplamente disseminadas, envolvendo provavelmente um grande número de taxa infra-específicos (CANNON et al., 2000).

Espécies de *C. gloeosporioides* são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Características como morfologia de conídios, presença de setas e do teleomorfo, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento têm sido usadas para diferenciar espécies morfológicamente próximas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998).

As dificuldades encontradas na identificação das espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998).

O estudo da taxonomia, isto é, da classificação dos seres vivos, foi profundamente afetado pelos conceitos evolutivos (SCHNEIDER, 2007). Segundo o autor, o conceito de evolução deixou de constituir-se em simples exercícios praticados por profissionais de diferentes formações para estabelecer uma meta mais ambiciosa: a da compreensão de toda a história da vida através de suas relações de parentesco, a chamada filogenia. Daí por diante, ocorreu uma verdadeira revolução molecular combinada com a revolução eletrônica. Podendo-se estabelecer métodos mais sofisticados de estudo do material genético e de seus produtos, indispensáveis para

uma análise filogenética apropriada em nível molecular, bem como programas para computadores e outros instrumentos de bioinformática (SCHNEIDER, 2007).

Nas últimas décadas, o crescimento da literatura científica utilizando métodos moleculares de análise filogenética tem sido constante, inicialmente usada para elucidar relações hierárquicas, como taxonomia e classificação. Após esse primeiro passo, a filogenética se expandiu e hoje é utilizada com inúmeros objetivos, tais como criar novos grupos taxonômicos; reconstruir árvores filogenéticas de organismos com representantes de diferentes áreas geográficas, visando detectar correlação com eventos vicariantes; buscar relações de ramificação com áreas de endemismo; investigar a evolução de espécies que interagem entre si, tais como hospedeiros e parasitas ou simbioses, co-evolução de inseto, fungos e plantas; estudar a evolução de caracteres em si mesmo e compreender melhor a dinâmica de populações (SCHNEIDER, 2007).

O princípio básico da filogenia molecular é que a espécie tem origem em outras espécies (suas ancestrais) (SUDHAUS; REHFELD, 1992) durante o processo de especiação. Admitem que duas espécies intimamente relacionadas geneticamente possam ser polimórficas e, conseqüentemente tão diferentes quanto duas espécies distantes, como resultado de mutação ou recombinação. Relatam que quando se compara o mesmo fragmento da sequência de DNA entre espécies diferentes, é possível inferir o relacionamento filogenético entre as espécies baseado no polimorfismo presente. Para estudos filogenéticos de *Colletotrichum* spp. tem-se utilizado comumente fragmentos específicos do DNA genômico como as regiões ITS (*Internal Transcribed Spacers*), genes GPDH, Actina, Calmodulina, Histona 3 e Quitina Sintase (DAMM, et al., 2012a). Os autores relatam que a análise filogenética do gênero *Colletotrichum* revela que o mesmo compreende nove clados, bem como um número de pequenos *clusters* e espécies isoladas. Destacam ainda que não há processo atualmente aceito para o nome clado e nem reconhecimento deles como uma categoria taxonômica tradicional no Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (ICNAFP), embora já existam alguns passos nessa direção, com a criação do PhyloCode (CANTINO; KEVIN, 2010). Por isso, os autores fazem o reconhecimento formal de categorias taxonômicas infragenéricas dentro de espécies do gênero *Colletotrichum*. Isso é altamente desejável por razões filogenéticas, no qual o gênero contém muitas unidades monofiléticas com características comuns, como na morfologia de conídios, apressórios, etc.

O uso do sistema de nomenclatura infra-genérico estritamente hierárquico do ICNAFP é uma maneira possível de assinalar nomes formais a grupos de espécies dentro de *Colletotrichum* (DAMM et al., 2012b).

O principal objetivo da classificação filogenética é classificar espécies de uma maneira tão próxima, ou intimamente relacionadas, que estas reflitam o seu estado de evolução (WILEY et al., 1981). Sequências individuais ligadas à filogenia molecular estão ligadas a isolados únicos ou *strains*; assim, vários isolados podem representar uma espécie. Pela construção de uma árvore filogenética a partir das sequências de fragmentos do DNA, é possível determinar o relacionamento entre diferentes taxa e, uma vez obtida a árvore, características tais como morfologia podem ser mapeadas dentro da árvore. A construção de uma árvore filogenética ocorre em vários passos, envolvendo a matriz de caracteres, análise dessa matriz e, finalmente, o árvore é apresentada e interpretada (DAMM et al., 2012a).

Sharma e Shenoy (2013) empregaram análise filogenética multigenes (multilocus) para identificação de seis isolados de *Colletotrichum* pertencente ao complexo de espécies *C. boninense*, na Índia. Nesse estudo, os autores utilizaram os genes ITS/5.8S RNA (ITS-1, ITS-4), ACT (Actina parcial), CAL (Calmodulina), CHS-1 (Quitina Sintase) e GAPDH (Glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase). As regiões dos genes foram analisadas pelo método de Máxima Parcimônia, o qual permitiu identificar os isolados dentro das espécies morfologicamente similares a *C. cymbidiicola*, *C. karstii*, *C. phyllanthi*, isoladas de diversas amostras de plantas originárias da Índia. A cultura ex-tipo originária de material fresco foi depositado no CBS como *C. phyllanthi*, estágio não esporulado, constituindo-se no primeiro relato de *C. cymbidicola* e *C. karstii* da Índia.

C. gloeosporioides é considerado um fungo ubíquo porque está presente em alta frequência entre os principais taxa isolados de hospedeiros tropicais. Estudos desenvolvidos por Cruz (2005) sobre as características morfológicas e patogênicas das estruturas reprodutivas de *C. gloeosporioides* endofítico isolado de folhas de imbaúba (*Cecropia* spp.), de cajueiro (*Anacardium occidentale*) e de mangueira (*Mangifera indica*). (patogênicos), verificaram diferenças marcantes na forma e no tamanho de conídios e apressórios. Relatam também que as diferenças entre tamanho (comprimento e largura de conídios) variaram conforme os dois tipos de isolamento testados, isto é, isolados monospóricos e massa de conídios.

Estudos de patogenicidade por inoculação cruzada de isolados endofíticos x patogênicos sobre imbaúba, mangueira e cajueiro revelaram não haver interação patogênica, com expressão de sintomas visíveis, entre os isolados endofíticos de imbaúba e os isolados patogênicos de cajueiro e mangueira e vice-versa.

A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a uma determinada hospedeira, bem como a determinação de sua variabilidade são de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias eficazes e duradouras de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia do patossistema.

No Brasil existem poucos estudos referentes à caracterização de *Colletotrichum* endofítico e patogênico, associado a hospedeiras tropicais e frutíferas e, quando existem, geralmente envolvem um número reduzido de isolados (PERES et al., 2002).

A patogenicidade de isolados de fungos fitopatogênicos está relacionada com fatores do ambiente e, principalmente, com o genótipo do hospedeiro (DODD et al., 1992).

2.1.3 *Colletotrichum guaranicola*

Albuquerque (1960) foi quem primeiramente identificou a espécie *C. guaranicola* em folhas de guaranazeiro coletadas na cidade de Maués, Estado do Amazonas. Depois dele, Bentes e Barreto (2004) fizeram a reavaliação taxonômica de *C. guaranicola*, concluindo não haver ocorrência do patógeno em outros hospedeiros, além do guaranazeiro. Concluem também que outras características como coloração da colônia, aspecto do micélio e presença de setas são difíceis de serem comparadas devido à grande variação entre e dentro das espécies de *Colletotrichum*. Posteriormente, Miléo et al. (2007) relataram que várias espécies de plantas daninhas são colonizadas pelo fungo *C. guaranicola* em cultivos de guaranazeiro situados em quatro municípios do Estado do Amazonas. O estudo da presença/identificação do fungo foi realizado através de isolamentos feitos a partir de fragmentos de folhas lesionadas e morfologia de conídios. Concluem assim que espécies daninhas podem se constituir em fonte de inóculo potencial de propagação e sobrevivência do patógeno, reforçando a importância de se estabelecer práticas de manejo visando o controle dessas plantas nas áreas de cultivos.

Estudos relacionados com a interação *Colletotrichum* spp. × hospedeiros são muito comuns, porém são escassos e/ou praticamente inexistentes estudos de taxonomia de *C. guaranicola* envolvendo caracteres tradicionais (morfo-culturais) associados a características moleculares (filogenia multigenes) para identificação de *C. guaranicola*.

Portanto, estudos combinando caracteres morfo-culturais e moleculares na identificação de *C. guaranicola* são fundamentais para o conhecimento do patógeno e da interação patógeno–hospedeiro no processo doença, contribuindo assim para o estabelecimento de estratégias eficazes e duráveis da doença no campo.

Bentes e Costa Neto (2011) estudaram a variabilidade genética de 20 isolados de *C. guaranicola*, provenientes de diferentes localidades produtoras de guaraná no Estado do Amazonas. Os autores utilizaram marcadores moleculares AFLP nesse trabalho, conseguindo separar os isolados em dois grupos geneticamente distintos. Esses estudos confirmam a variabilidade intra-específica de isolados de *C. guaranicola*.

Com relação à fisiologia de *C. guaranicola*, Duarte e Albuquerque (1984) estudaram este fungo e concluíram que o meio de cultura Batata–Dextrose–Ágar (BDA) foi o melhor para esporulação, quando associado com fotoperíodo de 12 horas.

Véras, Gasparotto e Menezes (1997) observaram que existe variação no comprimento e na largura de conídios, dentro de um mesmo isolado de *C. guaranicola*, em função do meio de cultura empregado. As mesmas variações e/ou diferenças, em função do meio, foram encontradas entre os isolados quanto à presença e/ou ausência de estruturas como acérvulos, apressórios e escleródios. No mesmo estudo, verificaram que as características culturais dos isolados mostraram grande variabilidade na coloração e nos aspectos gerais da colônia, de acordo com o meio de cultura e com o próprio isolado.

O controle das antracnoses provocadas pelas diversas formas de *Colletotrichum* spp. é feito hoje quase que exclusivamente através de pulverizações semanais alternadas com fungicidas, os quais, além de encarecerem a atividade, colocam em risco o meio ambiente e o próprio homem. E para que novos avanços significativos sejam produzidos no sentido de um controle epidemiológico eficiente e duradouro, torna-se essencial o entendimento das relações patógeno–hospedeiro em nível molecular. O entendimento das relações de patogenicidade entre isolados

endofíticos e patogênicos permite a manipulação genética para fins de resistência à antracnose de espécies importantes para o Brasil.

O apressório de *C. guaranicola* apresenta uma forma de funil. Essa estrutura apressorial é composta de material de parede fúngica e se forma junto ao poro germinativo (BENTES; MATSUOKA, 2004).

De acordo Bentes e Matusuoka, *C. guaranicola* apresentou variação na patogenicidade, conforme o genótipo do hospedeiro utilizado.

O apressório é a estrutura de penetração do fungo no hospedeiro e no caso dos estudos de resistência de clones de guaranazeiro a isolados de *C. guaranicola* (BENTES; MATSUOKA, 2004), os autores sugerem que a expressão da resistência está ligada ao atraso na penetração do patógeno e colonização dos seus tecidos, encontrando baixa quantidade de formação de apressório em clones de guaranzeiros resistentes.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção dos isolados

As amostras com lesões típicas de antracnose foliar foram coletadas em sítios e comunidades de produtores rurais dos municípios de Maués, Urucará, Presidente Figueiredo, Manaus, Boa Vista do Ramos, Manacapuru e Itacoatiara (Figura 1).

Figura 1- Mapa de localização das áreas de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. e produtoras de guaraná, no Estado do Amazonas (Brasil). Os municípios estão representados com suas respectivas cores: Maués (verde escuro); Manaus (alaranjado); Presidente Figueiredo (verde água); Itacoatiara (azul); Manacapuru (vermelho); Boa Vista dos Ramos (cinza); e, Urucará (amarelo). Imagens retiradas de http://pt.wikipedia.org/wiki/Amazonas#mediaviewer/Ficheiro:Amazonas_MesoMicroMunicip.svg. Acesso em: 10 mai. 2014

O isolamento do fungo foi realizado pelo método direto e indireto, nas instalações do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Do local de coleta até o laboratório, os folíolos atacados foram preservados dentro de caixa de isopor contendo uma camada de gelo recoberta com jornais dobrados. Folíolos e pecíolos foram envolvidos em chumaço de algodão embebido em água corrente.

No método indireto, fragmentos da zona de transição entre o tecido lesionado e sadio foram colocados em álcool 70% por 30 s, seguido de desinfestação superficial em solução de hipoclorito de sódio a 2%; lavagem em água estéril, secagem em papel filtro e plaqueamento em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) natural. As placas foram incubadas sob luz contínua e após o crescimento da colônia (36 horas), procedeu-se

à repicagem de estruturas vegetativas da extremidade da colônia para tubos de ensaio contendo BDA.

Posteriormente, cinco discos de 4,8 mm diâmetro foram depositados no interior de microtubo Eppendorf contendo água destilada e esterilizada.

No método direto, segmentos foliares de $\pm 2,5 \text{ cm}^2$ foram previamente lavados em água corrente e detergente, e a seguir desinfestados em solução de hipoclorito de sódio por 2 min. Os segmentos de tecido foram lavados em água destilada e esterilizada e postos para secar sobre papel toalha em ambiente de laboratório. Em seguida os fragmentos foram submetidos à câmara úmida a fim de induzir a reprodução do patógeno. Os fragmentos infectados e tratados foram mantidos no interior de bandeja plástica de 15 cm, forrada ao fundo com camada dupla de papel filtro umedecida por chumaço de algodão embebido em ADE (Água Destilada Esterilizada). Foram utilizados cinco fragmentos por bandeja.

O conjunto foi envolvido por saco plástico transparente umedecido internamente com ADE e vedado com fita adesiva. Após 48 horas, os segmentos de tecido contendo as lesões foram examinados em estereomicroscópio de dissecação sob ocular de 50x.

Com ajuda de agulha histológica flambada, massa de conídios representada por pontos de coloração alaranjada na superfície da lesão foi transferida para placa de Petri contendo BDA e incubadas sob luz fluorescente contínua fria e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o crescimento das colônias, fragmentos de micélio foram repicados para tubos de ensaio contendo BDA e retirados discos de micélio contendo estruturas do patógeno de 4,8 mm de diâmetro para microtubos de 2,0 mL, contendo 1 mL de ADE. Os isolados foram identificados por código, procedência, coordenada geográfica e data de coleta.

Os microtubos foram acondicionados em caixas de papelão providas de tampa e suporte interno quadriculado. No total foram coletados 94 isolados, dos quais foram obtidas culturas monospóricas para o prosseguimento dos estudos de caracterização. Além dos isolados provenientes de *C. guaranicola*, também foram utilizados nos estudos o Isolado-Tipo 8183, depositado em 1959 por Albuquerque (1960) na Coleção Micológica do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), gentilmente cedido pela curadora do Herbário Fitopatológico, Dra. Margada Fumiko Ito. Três outros isolados de *Colletotrichum*, devidamente identificados até espécies, gentilmente cedidos por Tozze Júnior (TOZZE JÚNIOR, 2012) foram utilizados para comparações (Tabela 1).

Tabela 1- Numeração, hospedeiro, método de propagação da planta e município de coleta dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose, no Estado do Amazonas

(Continua)

Isolado	Hospedeiro	Método de Propagação	Município
C-09	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-12	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-13	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-14	Guaranazeiro	Clone BRS-80	Maués
C-15	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-16	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-17	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-18	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-19	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-20	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-22	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
C-33	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
2109	Guaranazeiro	Clone BRS-800	Maués
2271	Guaranazeiro	Clone 619	Presidente Figueiredo
2342	Guaranazeiro	Clone 619	Presidente Figueiredo
2343	Guaranazeiro	Clone 372	Presidente Figueiredo
2346	Guaranazeiro	Semente	Maués
2347	Guaranazeiro	Semente	Maués
2348	Guaranazeiro	Semente	Maués
2349	Guaranazeiro	Semente	Boa Vista do Ramos
2350	Guaranazeiro	Semente	Maués
2351	Guaranazeiro	Semente	Boa Vista do Ramos
2352	Guaranazeiro	Semente	Manacapuru
2353	Guaranazeiro	Semente	Maués
2354	Guaranazeiro	Semente	Boa Vista do Ramos
2355	Guaranazeiro	Semente	Maués
2356	Guaranazeiro	Semente	Maués
2357	Guaranazeiro	Semente	Manacapuru
2360	Guaranazeiro	Semente	Boa Vista do Ramos
2361	Guaranazeiro	Semente	Maués
2365	Guaranazeiro	Semente	Boa Vista do Ramos
2373	Guaranazeiro	Semente	Boa Vista do Ramos
2380	Guaranazeiro	Semente	Manacapuru
2396	Guaranazeiro	Acesso 147	Manaus
2408	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2411	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2412	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2414	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara

Tabela 1- Numeração, hospedeiro, método de propagação da planta e município de coleta dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose, no Estado do Amazonas

(Continua)

Isolado	Hospedeiro	Método de Propagação	Município
2416	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2417	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2418	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2419	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2420	Guaranazeiro	Semente	Itacoatiara
2505	Guaranazeiro	Clone CMA-189	Manaus
2506	Guaranazeiro	Clone CMU-693	Manaus
2507	Guaranazeiro	Clone CMU-980	Manaus
2508	Guaranazeiro	Clone -17	Manaus
2509	Guaranazeiro	Clone CMU-30	Manaus
2510	Guaranazeiro	Clone-613	Manaus
2511	Guaranazeiro	Clone 871 x 626	Manaus
2512	Guaranazeiro	Clone-861	Manaus
2513	Guaranazeiro	Clone-601	Manaus
2514	Guaranazeiro	Clone 2282*	Manaus
2515	Guaranazeiro	Clone CMA-431	Manaus
2516	Guaranazeiro	CMU-618	Manaus
2517	Guaranazeiro	Clone 366	Manaus
2518	Guaranazeiro	Clone CMA-36	Manaus
2519	Guaranazeiro	Clone CMA-348	Manaus
2520	Guaranazeiro	Clone CMA-28	Manaus
2521	Guaranazeiro	Clone-613	Manaus
2522	Guaranazeiro	CMU-938	Manaus
2523	Guaranazeiro	Clone-2282*	Manaus
2524	Guaranazeiro	Clone-613	Manaus
2538	Guaranazeiro	Clone-Luzéia	Presidente Figueiredo
2539	Guaranazeiro	Clone-871	Presidente Figueiredo
2540	Guaranazeiro	Clone 370	Presidente Figueiredo
2541	Guaranazeiro	Clone-375	Presidente Figueiredo
2542	Guaranazeiro	Clone-37	Presidente Figueiredo
2543	Guaranazeiro	Clone-37	Presidente Figueiredo
2544	Guaranazeiro	Clone-619	Presidente Figueiredo
2545	Guaranazeiro	Clone-375	Presidente Figueiredo
2546	Guaranazeiro	Clone-300	Presidente Figueiredo
2547	Guaranazeiro	Clone-601	Presidente Figueiredo
2548	Guaranazeiro	Clone-372	Presidente Figueiredo
2550	Guaranazeiro	Cêre-Saporanga	Presidente Figueiredo
2552	Guaranazeiro	Clone-608	Presidente Figueiredo
2554	Guaranazeiro	Clone-608	Presidente Figueiredo
2582	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2583	Guaranazeiro	Clone 217	Urucará
2585	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2588	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2589	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2590	Guaranazeiro	Semente	Urucará

Tabela 1- Numeração, hospedeiro, método de propagação da planta e município de coleta dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose, no Estado do Amazonas

(Continua)

Isolado	Hospedeiro	Método de Propagação	Município
2592	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2594	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2595	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2596	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2597	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2598	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2599	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2601	Guaranazeiro	Semente	Urucará
2602	Guaranazeiro	Série 200	Urucará
2603	Guaranazeiro	Semente	Urucará
8183 ¹	Guaranazeiro	Semente	Maués
MN-57 ²	Manga	Fruta	Cabrália Paulista (SP)
PS-64 ²	Maracujá	Fruta	Campinas (SP)
PS-67 ²	Maracujá	Fruta	Valinhos (SP)

¹Isolado-tipo, obtido em 1959, gentilmente cedido pela curadora do Herbário Fitopatológico do Instituto Agrônomo de Campinas, Dra. Margarida Fumiko Ito

²Isolados utilizados na Tese de Tozze Júnior (2012) e cedidos por este. Os mesmos serviram para fins de comparação neste trabalho.

2.2.2 Obtenção de culturas monospóricas

A partir de discos de BDA contido em microtubos, culturas monospóricas foram obtidas, adotando o seguinte procedimento: a mucilagem alaranjada em culturas de 10 dias foi raspada com alça de platina e diluída em 0,5 mL de ADE (água destilada e esterilizada) contida em microtubo de 2,0 mL. A suspensão de conídios foi diluída até a concentração de 400 conídios/mL e alíquotas de 40 mL foram plaqueadas sobre meio Ágar-Água a 2%, contido em placa de poliestireno. Após 12 horas de incubação a 25 °C, a superfície do meio foi observada em microscópio de luz, sob objetiva de 10x. Para cada isolado, três conídios germinados foram transferidos para novas placas contendo meio de cultura BDA (39g/L Difco®). Após o crescimento, selecionou-se uma colônia típica do patógeno para preservação.

2.2.3 Preservação dos isolados

Os isolados monoconidiais de *C. guaranicola* foram preservados em água destilada estéril pelo método de Castellani. Para isso, cinco discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos para frascos de vidro de 13 mL contendo 5 mL de ADE e, em seguida, mantidos em câmara fria a 4 °C. Utilizou-se também preservação em papel de filtro desidratado. As colônias foram cultivadas em meio BDA contendo pedaços (1 cm × 1 cm) de papel de filtro esterilizados na superfície. Após o crescimento da colônia, os pedaços de papel de filtro foram retirados e secos em sílica gel azul por 24 h, seguindo-se seu acondicionamento em microtubos e armazenamento em ultrafreezer a -80 °C.

2.2.4 Caracterização fisiológica pela Taxa de Crescimento Micelial Diária (TCMD) e descrição das características culturais

Na caracterização fisiológica e cultural foram utilizados 62 isolados de *C. guaranicola*, além de três isolados já caracterizados até espécie, para fins de comparação: *C. boninense* (PS-64), *C. acutatum* (PS-67) e *C. gloeosporioides* (MN-57). A caracterização fisiológica baseou-se no crescimento micelial em meio de cultura.

Discos de meio BDA de 4,3 mm de diâmetro, contendo estruturas fúngicas do fitopatógeno e com seis dias de idade foram transferidos das bordas de culturas monospóricas para o centro de novas placas de Petri de poliestireno estéril de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA industrializado (Difco®, 39 g/L). Após a repicagem, as placas foram mantidas em fotoperíodo de 24 h à temperatura de 25 ± 1 °C em câmara de crescimento do tipo BOD. A partir do primeiro dia, após a repicagem, procedeu-se à leitura do crescimento micelial diário de cada isolado. Com auxílio de paquímetro digital, foi realizada a mensuração do diâmetro médio das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos e previamente marcados no fundo da placa. As avaliações foram realizadas até o 6º dia, que foi o dia anterior ao fechamento das placas de Petri, por pelo menos uma repetição dos isolados.

Em todas as avaliações foi descontado do valor obtido, o diâmetro do disco inicialmente depositado no centro de cada placa. O delineamento experimental foi

inteiramente ao acaso, com quatro repetições por isolado, sendo cada repetição constituída por uma placa.

A análise estatística foi realizada no programa Assistat versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002) e os dados submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade.

No final do experimento de caracterização fisiológica, aproveitou-se as mesmas placas para a realização da caracterização cultural em meio BDA, observando-se parâmetros como coloração das colônias, a cor do bordo e do reverso, conforme a carta de cores elaborada por Saccardo (1894), assim como a topografia, textura micelial, formação de setores, formato da colônia e produção de microescleródios de acordo com Gams, Verkeley e Crous (2009).

2.2.5 Caracterização morfológica

2.2.5.1 Preparo de lâminas semipermanentes para estudos de morfometria de conídios e apressórios

O preparo de lâminas para determinação das dimensões e formas de conídios e apressórios foi realizado através do método de microcultura, segundo metodologia sugerida por Cai et al. (2009). Cubos de meio BDA de 10 mm³ foram colocados no centro de uma placa de poliestireno estéril. Uma gota de uma suspensão de conídios foi pipetada sobre o cubo e uma lamínula flambada e esfriada foi colocada sobre o bloco inoculado. Pequenos chumaços de algodão embebidos em água destilada e esterilizada foram colocados nos bordos da placa, promovendo-se uma câmara úmida. O conjunto foi incubado em condições padronizadas de temperatura (25 °C ± 1) e fotoperíodo de 12, no interior de BOD. Oito dias depois as lamínulas foram retiradas e colocadas sob lâmina para microscopia contendo uma gota de lactoglicerol. As lamínulas foram vedadas com esmalte incolor e guardadas em estojo de lâmina para determinação da morfometria de conídios e apressórios.

2.2.5.2 Morfometria de conídios e apressórios

2.2.5.2.1 Metodologia

Para a morfometria de conídios foram preparadas microculturas originárias de culturas monospóricas de cada isolado. Blocos de meio BDA de 2,5 mm foram colocados dentro de placas de poliestireno estéreis. Sob os blocos de meio foi pipetada uma suspensão de conídios e a seguir coberto com lamínulas. Quando o isolado não esporulada, procedeu-se à inoculação das faces do bloco de meio com estruturas reprodutivas do fungo. Fez-se câmara úmida por cinco dias, colocando-se chumaço de algodão umedecido no interior da placa. Após o período de incubação de cinco dias, a lamínula foi retirada e montada em lâmina sob água ou ácido láctico para posterior medição. Foram medidos um total de 50 conídios por isolado.

As medições foram realizadas em Microscópio tipo Axioskop 2 (Zeiss), acoplado a um computador com Software Axiovision Rel. 4.6, que permite capturar, medir e fotografar imagem observada no microscópio.

Para morfometria de apressórios foi preparada uma suspensão de esporos. Uma alíquota de 30 µL foi pipetada diretamente na superfície de poliestireno. Após 24–36 horas, cobriu-se a superfície com lamínula e procedeu-se a medição e observação, da mesma forma que os conídios. Foram medidos a dimensão (comprimento x largura) de 50 apressórios por isolado.

A morfometria de conídios foi conduzida em delineamento estatístico inteiramente ao acaso, constando de 76 tratamentos, representados pelos isolados, e 50 repetições. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade. A análise estatística para conídios foi realizada no programa Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

A morfologia foi realizada com base no percentual do formato dos conídios, que foram agrupados em quatro tipos distintos, segundo Sutton (1980) e Cox e Irwin (1988) e adaptado por Tozze Júnior (2007): fusiforme, oblongo ou cilíndrico, clavado, constricto (Figura 2).

Figura 2 - Formas de conídios avaliados: 1. Fusiforme; 2. Oblongo ou cilíndrico; 3. Clavado; e, 4. Constricto. Adaptado de Tozze Júnior (2007)

No experimento de morfometria de apressórios foram medidos 50 apressórios por isolado. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 66 tratamentos e 50 repetições. Os dados foram analisados pelo Teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade. A morfologia de apressórios foi realizada conforme metodologia adotada por Sutton (1980) e Cox e Irwin (1988) modificada, e os resultados foram apresentados em porcentagem dos 3 tipos de apressórios predominantes em *Colletotrichum* spp.: lobado, levemente lobado e arredondado.

Figura 3 - Formas de apressórios: 1. Lobados; 2. Levemente lobados, e, 3. Arredondados. (Adaptado de Cox e Irwin, 1988; Sutton, 1980)

2.2.6 Taxa de Crescimento Micelial Diária em função da temperatura

A escolha dos isolados para o teste do crescimento micelial em diferentes temperaturas foi realizada com base na análise filogenética e pela área de procedência, dentro do Estado do Amazonas. Ao todo, oito isolados foram testados: C-18, C-19, 2361 (Maués), 2380 (Manacapuru), 2419 (Itacoatiara), 2512 (Manaus), 2554 (Presidente Figueiredo) e 2589 (Urucará).

As faixas de temperatura testadas foram: 15, 20, 25, 30 e 35 °C.

Os isolados monospóricos foram cultivados em placas contendo BDA (39 g/L) durante 5 dias em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 ± 1 °C. No final do período de incubação, discos de micélio e meio de 4,3 mm de diâmetro foram

retirados da periferia das colônias, com auxílio de furador de rolha, e transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA. Cinco BODs foram utilizadas, cada uma para uma faixa de temperatura. As BODs foram limpas com álcool 70% e as temperaturas ajustadas para as respectivas faixas. Fotoperíodo foi escuro contínuo.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 5×8 , perfazendo um total de 40 tratamentos com cinco repetições cada um.

As avaliações foram realizadas diariamente e sempre no mesmo horário, procedendo-se a leitura do diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares, com auxílio de paquímetro digital.

Ao final de seis dias, os valores do diâmetro médio diário da colônia em mm foram tabulados e analisados estatisticamente no Excel, gerando o gráfico e a partir deste, a estimação da equação da reta e a curva de crescimento micelial em função da temperatura.

2.2.7 Caracterização enzimática

O experimento foi implantado para avaliar a capacidade de oito isolados de *C. guaranicola* em produzir enzimas com atividade amilolítica, celulolítica, lacaselítica, lipolítica, pectinolítica e proteolítica. O ensaio foi conduzido com os mesmos isolados utilizados no experimento do crescimento micelial em função da temperatura.

2.2.7.1 Atividade Amilolítica

Discos de 4,3 mm de diâmetro de BDA Difco® (39 g/L) contendo estruturas do fungo de cada isolado foram retirados do bordo de colônias cultivadas por 5 dias no escuro sob temperatura de 25 ± 1 °C e repicados individualmente para o centro de placas de Petri contendo cada um dos meios descritos a seguir, visando detectar e avaliar.

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio mínimo, o qual teve a glicose substituída por amido (6 g de NaNO_3 , 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de KCl, 0,5 g de $\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de FeSO_4 , 0,01 g de ZnSO_4 , 10 g de amido, 15 g de ágar, 1 L, de água destilada, pH = 6,8. As colônias foram incubadas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias de incubação foi aplicado em cada placa cerca de 2 mL de solução lugol (5 g de KI, 1 g de iodo metálico, 100 mL de água destilada) sobre a

superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada e avaliou-se o halo de degradação produzido pela atividade amilolítica, caracterizado pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada ao redor da colônia (PEREIRA, 2009).

A avaliação foi realizada por meio da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia e da colônia mais o halo decorrente da atividade enzimática, obtendo as respectivas áreas. A área do halo de degradação decorrente da atividade da enzima foi obtida subtraindo a área da colônia (PEREIRA, 2009).

2.2.7.2 Atividade celulolítica

Os isolados foram cultivados em ágar carboximetilcelulose (1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de KCl, 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de CaCl_2 , 0,5 g de extrato de leveduras, 10 g de carboximetilcelulose, 20 g de ágar, e 1 L de água destilada). As colônias de cada isolado foram incubadas por 5 dias a 25 °C no escuro e, em seguida, submetidas a choque térmico por 16 horas a 50 °C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, para revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (PEREIRA, 2009).

A área do halo decorrente da atividade celulolítica foi avaliada conforme descrito para a enzima amilase.

2.2.7.3 Atividade lacaselítica

Neste experimento, utilizou-se o protocolo descrito por Santos (2007).

Os isolados foram cultivados em meio contendo 20 g de ágar acrescido de 0,5% (p/v) de ácido gálico, 15 g extrato de malte e 1 g de peptona em 1 L de água destilada (pH 7,0). O ácido gálico foi homogeneizado em 50 mL de água destilada e autoclavado separadamente ao meio de cultura, sendo misturado ao mesmo antes de vertê-lo para as placas. As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C no escuro.

A atividade da enzima lacase foi detectada pela formação de um halo marrom ao redor das colônias.

A área do halo decorrente da atividade celulolítica foi avaliada conforme descrito para a enzima amilase.

2.2.7.4 Atividade lipolítica

O protocolo para avaliação da atividade lipolítica utilizado foi adaptado de Hankin e Anagnostakis (1975).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura específico para detecção da atividade lipolítica (10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar, 0,01 g de rodamina, 10 mL de Teen 20 (esterilizado separadamente), 1 L de água destilada, pH = 6,0).

As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C no escuro e em seguida incubadas a 4 °C por 48 h. Após este período foi avaliado o halo ao redor da colônia, formado por cristais de sais de cálcio decorrentes da liberação da enzima lipolítica.

A área do halo decorrente da atividade celulolítica foi avaliada conforme descrito para a enzima amilase.

2.2.7.5 Atividade pectinolítica

O protocolo utilizado para avaliação da atividade da pectinase foi adaptado a partir das descrições de Hankin e Anagnostakis (1975).

Os isolados foram cultivados em meio de cultura sólido composto de 500 ml de solução mineral [2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de CaCl_2 , 10 µg de H_3BO_3 , 10 µg de MnSO_4 , 70 µg de ZnSO_4 , 50 µg de CuSO_4 , 10 µg de MoO_3] + 500 mL de solução de pectina (1 g de extrato de levedura, 15 g de ágar, 5 g de pectina cítrica). O meio foi ajustado para pH 7,0.

As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C no escuro. Decorrido este período, o halo de degradação, formado por uma região translúcida ao redor da colônia, foi revelado com aplicação de vermelho de metila (2%).

A avaliação do halo de degradação decorrente da atividade da pectinase foi realizada da mesma maneira que para a enzima amilase.

2.2.7.6 Atividade proteolítica

O protocolo para avaliação da atividade da proteinase está de acordo com a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis adaptada (1975).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio solidificado composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl, 15 g de ágar, 0,4 g de gelatina e 1 L de água destilada em pH = 6,0. A gelatina foi autoclavada separadamente e misturada ao meio antes de vertê-lo para as placas.

As colônias foram incubadas por 48 horas a 25 °C no escuro. Após este período, o halo caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia contrastando com o vermelho presente na região em que não houve atividade proteolítica, foi revelado por meio da aplicação de 10 mL de vermelho de metila (2%) em cada placa.

A área do halo decorrente da atividade proteolítica foi avaliada da mesma forma que para a enzima amilase.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, cada placa com o isolado representando uma parcela experimental.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias das repetições dos isolados foram comparadas entre si para cada enzima, por meio da aplicação do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando para as análises o programa Assistat versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

2.2.7.7 Teste bioquímico para fontes de carbono

A habilidade dos isolados em utilizar ácido cítrico ou tartarato de amônio como fonte de carbono foi avaliada em meio de cultura de acordo com Lynch et al. (1981), Bridge (1985) e Waller et al. (1993) com modificações. Utilizou-se o meio C de Ayers et al. (1919) adaptado ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 1 g; KCl: 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g; e, água destilada: 1.000 mL). Com a suplementação de 17 g de ágar. A cada combinação do meio C + ácido cítrico e meio C + tartarato de amônio foi adicionado 10 g de cada reagente e 50 mg de púrpura de bromocresol (WALLER et al. 1993; BRIDGE et al. 2008).

O pH dos meios foi ajustado para 4,5 antes da esterilização. Para o teste, discos (4 mm de diâmetro) de meio C (modificado e suplementado somente com ágar e

púrpura de bromocresol) contendo estruturas fúngicas do fitopatógeno foram transferidos das bordas da colônia com sete dias de idade. As placas, após repicagem, foram mantidas à temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h.

A avaliação do uso das fontes exclusiva de carbono foi realizada aos sete dias após a instalação do experimento, visualizando o crescimento micelial através da mudança de coloração do meio de cultura (da cor amarela para a púrpura). Aqueles que mudaram a coloração foram considerados positivos e os que não alteraram a coloração do meio, foram considerados negativos.

O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo que cada unidade experimental foi constituída por uma placa com o meio C + ácido cítrico ou tartarato de amônio.

2.2.8 Caracterização molecular

Culturas monospóricas preservadas em Castellani e -80 °C, armazenadas em câmara fria a 4 °C e ultrafreezer, respectivamente, foram repicados para placas de poliestireno. As placas foram incubadas em câmara tipo BOD com temperatura ajustada para 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Após o crescimento, discos de inóculo com as estruturas do patógeno foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido sintético, com a seguinte composição: sacarose, 10 g; L-asparagina, 2 g; extrato de levedura, 2 g; KH_2PO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL (solução estoque – 0,00153M); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mL (solução estoque – 0,00153 M); e, MnCl_2 , 1 mL (solução estoque – 0,00153 M).

Os erlenmeyers com as culturas de cada isolado foram colocados sob mesa agitadora para crescimento. Após sete dias sob agitação, as culturas foram passadas em peneira de aço inox para filtrar o micélio. O micélio, depois de comprimido na peneira, foi colocado no interior de placas de Petri esterilizada forrada com uma camada de papel filtro estéril. A desidratação do micélio foi realizada no interior de estufa regulada para 45 °C em *overnight*. Depois de seco o micélio foi triturado e macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de cadinho e pistilo de porcelana.

O pó resultante da maceração foi transferido para microtubos de 2,0 mL, padronizando-se a quantidade de micélio em 0,2 mL. Os tubos foram identificados e dispostos em *rack* para extração do DNA.

2.2.8.1 Preparo do tampão de extração

O tampão utilizado na extração foi o CTAB 2×, preparado da seguinte forma:

Quantidade para extração de 33 isolados: 5 mL da solução estoque CTAB 10%; 3,5 mL da solução estoque NaCl 5 M; 0,5 mL da solução estoque EDTA 0,5 M, pH 8; 2,5 mL da solução estoque Tris-Base 1 M, pH 8.

Os reagentes foram misturados em vortex no interior de tubo Falcon. Após a mistura, adicionou-se 0,5 mL de β-mercaptoetanol. Completou-se o volume para 25 mL com água Mili-Q autoclavada. O tubo Falcon foi colocado em banho-maria por 30 min, a 65 °C.

2.2.8.2 Extração do DNA

O DNA total utilizado neste estudo foi extraído de acordo com protocolo de Murray e Thompson (1980).

Adicionou-se 750 µL de tampão CTAB 2× [2% brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB: Sigma H-5882); 1,4 M NaCl; 0,2% 2-mercaptoetanol; 20 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) + β-mercaptoetanol (2%) e misturou-se. Incubou-se esse material por 30 min a 65 °C. Homogeneizou-se a mistura a cada 8 min. Adicionou 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e inverteu-se várias vezes. Após isso, centrifugou a mistura por 5 min a 14000 rpm (4 °C). Cerca de 500 µL do sobrenadante foi transferido para novos tubos do tipo eppendorf (1,5 mL). Adicionou-se novamente o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram invertidos várias vezes. Centrifugou-se por 5 min a 14000 rpm (4 °C), com a observação da fase superior transparente. Transferiu aproximadamente 360 µL do sobrenadante para novos tubos do tipo eppendorf (1,5 mL) e adicionou 0,9× o volume de isopropanol (cerca de 324 µL). Em seguida, as amostras foram colocadas em congelador da geladeira, por 15 min a -20 °C. Após, centrifugou-se por 10 min a 14000 rpm. O isopropanol foi descartado e lavou-se o pellet com 500 µL de etanol 70% por 2×, centrifugando por 3 min (cada vez). O etanol foi descartado e os tubos do tipo eppendorf ficaram abertos e de boca para baixo, sobre papel-toalha, por aproximadamente 12 h (*overnight*), com a finalidade de secar o *pellet*.

As amostras foram armazenadas em freezer (-20 °C) para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.2.8.3 Quantificação do DNA e Diluição

O *pellet* de DNA depositado no fundo do microtubo foi ressuspendido com a adição de 30–40 µL de tampão TE + RNase = 1 mL de tampão TE 1× + 40 µL de RNase; As amostras foram mantidas a 37 °C em banho-maria por aproximadamente 1 hora. Em seguida uma alíquota de 2,0 µL de cada amostra foi utilizada para quantificação em aparelho NanoDrop (Wilmington-USA/Thermo Fisher Scientific Inc.). Após a quantificação, o DNA das amostras foi diluído até a concentração de 50 ng/µL, para as reações de PCR. Para diluição utilizou-se a fórmula $V1.V2 = V2.V2$.

2.2.8.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do DNA

Os ingredientes do *mix* para a PCR foram: H₂O Mili-Q autoclavada, 37,5 µL; tampão 10× Thermopol, 5 µL; dNTPs, 1 µL; primer F, 1 µL; primer R, 1 µL; Taq polymerase, 0,25 µL, com um volume final de 46,0 µL de *mix* + 4,0 µL da amostra de DNA, perfazendo um volume total na reação de 50 µL. O *mix*, contido em microtubo de 2,0 mL foi agitado em vortex. Colocou-se 4 µL das amostras de DNA em microtubos de 200 µL, que foram identificados e dispostos em rack próprio e agitado um a um em vortex. Os microtubos foram centrifugados em baixa velocidade por 30-60 s. Após essas etapa, as amostras foram colocadas no termociclador com a seleção do programa correspondente.

Os fragmentos amplificados e seus respectivos iniciadores foram: Actina (CCT-51F – ATG TGC AGG GCC GGT TTC GC/ACT-78R – TAC GAC TCC TTC TGG CCC AT); Calmodulina (CL1 – GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC/CL2 – TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC); Quitina Sintase (CHS-F – TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG/CHS-345R – TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG); GAPDH (GDF-GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA/GDR - GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT); ITS (ITS-1F – CTT GGT CATTGA GAGGAA GTAA/ITS-4 – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). Os genes e respectivos iniciadores foram utilizados por Weir et al.(2012 e Damm et al (2012b).

As condições para PCR de ITS foram as mesmas descritas por Woundenberg (2009). As condições para os genes GAPDH, Actina, Quitina Sintase e Calmodulina foram realizadas com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C, 30 segundos a 72 °C, e um passo final a 72 °C por 5 minutos.

2.2.8.5 Gel de agarose

Após amplificação do DNA, os produtos da PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, por cerca de 45 minutos, utilizando agarose + tampão TBE 0,5x + Sybr. A corrida em gel de eletroforese ocorreu dentro dos pocinhos do gel. Após a corrida, o gel foi fotografado em transiluminador UV para confirmação das bandas. O DNA apareceu como bandas claras em fundo escuro.

2.2.8.6 Diluição das amostras

Constatada a amplificação do gene na PCR, procedeu-se à diluição/padronização das amostras. A diluição foi realizada com água Mili-Q, padronizando as amostras para 50 µL. Para isso utilizou-se a fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$.

2.2.8.7 Purificação das amostras

Foi realizada a purificação dos produtos de amplificação (amplicons), utilizando o kit de purificação Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, da Promega, seguindo o manual do fabricante. A purificação visou retirar as impurezas das amostras acumuladas durante o processo de reação da PCR, viabilizando melhor qualidade para o sequenciamento.

2.2.8.8 Sequenciamento

Os isolados sequenciados e suas respectivas procedências são: 2554 (Presidente Figueiredo), 2552 (Presidente Figueiredo), 2545 (Presidente Figueiredo), 2543 (Presidente Figueiredo), 2541 (Presidente Figueiredo), 2419 (Itacoatiara), 2360 (Boa Vista do Ramos), 2354 (Boa Vista do Ramos), 2519 (Manaus), 2517 (Manaus), 2396 (Manacapuru), 2361 (Maués), 2380 (Manacapuru), 2373 (Maués), 2365 (Maués), 2349 (Maués) 2357 (Boa Vista do Ramos) 2356 (Maués) 2347 (Maués), 2343 (Boa Vista do Ramos), 2516 (Manaus), 2514 (Manaus), 2506 (Manaus), 2512 (Manaus), 2509 (Manaus), C-14 (Maués), C-15 (Maués), C-16 (Maués), C-18 (Maués) e C-19 (Maués).

As amostras foram enviadas para sequenciamento na Empresa Macrogen (Coréia do Sul).

2.2.8.9 Edição das sequências e construção das árvores filogenética

A análise filogenética foi realizada com base nas sequências nucleotídicas concatenadas das regiões gênicas ITS (gene ribossômico nuclear 5.8S, com dois espaçadores transcritos internos - ITS-1 e ITS-4), um íntron de 200 bp de Glyceraleide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Actina (ACT), Chitin Synthase (CHS-1), e Calmodulina (CAL). As árvores originárias da análise filogenética são mostradas na Figura 5.

As análises filogenéticas baseadas em Inferência Bayesiana foram realizadas separadamente com o alinhamento das sequências ITS e Quitina Sintase para separar isolados do complexo. A análise dividiu os isolados em dois grupos. A busca no BLAST do GeneBank foi realizada para verificar o índice de similaridade dessas sequências.

Os modelos de evolução foram estimados utilizando o programa ModelTest v.37 (HUSENBECK e RONQUIST, 2001; RONQUIST e HUSENBECK, 2003), usando o critério de informação Akaike (AIC) para cada locus. A inferência Bayesiana foi usada para reconstruir a filogenia baseada no alinhamento multilocus (ITS, Actina, Quitina Sintase, Calmodulina e GADPH). Para representar os limites das espécies e

sua variabilidade, 52 sequências ex-tipo de *C. gloeosporioides* + uma sequência de *C. boninense*, usada como outgroup, todas disponíveis no GenBank, foram adicionadas ao complexo *C. gloeosporioides*, enquanto 21 sequências do complexo *C. boninense* + uma sequência de *C. gloeosporioides*.

As análises foram realizadas duas vezes utilizando o Programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012), usando algoritmo da cadeia de Markov para gerar as árvores filogenéticas com probabilidades posteriores. Quatro cadeias de Markov foram executadas simultaneamente para 1×10^7 gerações de árvores aleatórias. As amostras foram tomadas a cada 1000 gerações, as primeiras 25% foram descartadas de cada análise e as probabilidades foram determinadas a partir das árvores remanescentes.

A partir das sequências de consenso, foram construídas árvores filogenéticas baseadas na análise concatenada de cinco fragmentos de DNA: ITS, Calmodulina, GDPH, Quitina Sintetase e Actina. Sequências depositadas no GeneBank do IMI, CBS, ICMP e BRIP, ao todo 21 espécies do complexo *C. boninense* e 52 espécies do complexo *C. gloeosporioides* foram blastadas e analisadas para construção das árvores filogenéticas. Para obtenção das árvores filogenética foi utilizado o método de inferência Bayesiana.

2.2.9 Caracterização patogênica

O ensaio de caracterização patogênica teve início com a escolha dos isolados a serem inoculados nas mudas de guaranazeiro. Os trabalhos foram conduzidos nas instalações do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Inpa), em Manaus–AM. Com base nos resultados obtidos na análise filogenética multigenes, os isolados selecionados foram C–16, C–18, C–19, 2343, 2361, 2512, 2523 e 2552. Todos os isolados estão presentes na árvore filogenética.

2.2.9.1 Origem, seleção e preparo dos genótipos

As mudas foram adquiridas na cidade de Maués (AM). Dois genótipos foram selecionados: O clone resistente BRS Maués, adquirido no viveiro de mudas da Embrapa Amazônia Ocidental em Maués, e a variedade suscetível Andirá, propagada

por semente e adquirida de produtor rural em Maués (Guaranazal Andirá). As mudas de ambos os genótipos tinham cerca de 8–10 meses de idade.

As mudas encontravam-se acondicionadas em embalagens plásticas de poliestileno de 5 kg e foram dispostas sobre bancada de casa-de-vegetação munida de dispositivo de nebulização intermitente. As mudas foram inoculadas com 8 isolados de *C. guaranicola* Albuq. obtidos de plantas infectadas procedentes de Maués (C–16, C–18 e C–19 e 2361), Presidente Figueiredo (2343, 2552) e Manaus (2512, 2523).

2.2.9.2 Preparo do inóculo

Discos de inóculo de cada isolado foram depositados na superfície de meio BDA Difco® (39 g/L). As condições de incubação foram luz fria fluorescente contínua e temperatura de 25 ± 1 °C. O período de incubação foi de sete dias.

2.2.9.3 Inoculação das plantas

O método de inoculação foi o de discos de micélio proveniente de cultura monospórica pura. A inoculação foi feita em mudas de cada genótipo, na casa-de-vegetação, utilizando-se discos de micélio de 5 mm de diâmetro, contendo estruturas do patógeno, retirados da área de crescimento ativo de colônias. O inóculo foi depositado na face adaxial da folha de mudas do clone resistente BRS–Maués e mudas da variedade suscetível Andirá, em dois pontos equidistantes, um de cada lado do limbo foliar.

Cada isolado foi inoculado nos três últimos folíolos dos dois genótipos testados, enumerados de 1 a 3 a partir do topo. No tecido foliar correspondente ao centro da área do disco de inóculo foi feito um ferimento, com auxílio de agulha hipodérmica esterilizada, sem atravessar o tecido foliar. O disco de micélio foi posicionado sobre o ferimento e mantido com auxílio de fita adesiva. Utilizou-se uma planta para cada genótipo testado. Três folhas de cada genótipo foram inoculadas apenas com discos de BDA + ferimento, sem estruturas do patógeno.

Após a inoculação as plantas foram identificadas com o tratamento e permaneceram em câmara úmida por 48 h, sobre bancada de casa-de-vegetação, até a avaliação dos sintomas.

A câmara úmida foi realizada utilizando sacos plásticos transparentes de 30 kg, umedecidos internamente. Os sacos foram presos na base do vaso/saco com ligas de borracha, utilizando-se suporte de madeira para manter as mudas livres dentro do saco plástico. A câmara úmida foi retirada 48 horas após a inoculação.

A partir do segundo dia, após a instalação do experimento, procedeu-se à leitura diária das lesões. Com auxílio de paquímetro digital, foi realizada a mensuração do diâmetro médio das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos. As avaliações foram realizadas até o 7º dia. Em todas as avaliações foi descontado do valor obtido, o diâmetro do disco inicialmente depositado nos folíolos.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×8 , com 3 repetições por isolado. Oito mudas, quatro de cada genótipo, foram inoculadas apenas com disco de BDA Difco® (39 g/L), servindo como controle.

A partir dos dados de severidade, procedeu-se o cálculo da taxa de progresso da doença (r) (CAMPBELL; MADDEN, 1990), baseado na fórmula: $r = (1/t) \cdot \ln(X/x_0)$, onde: t = tempo decorrente entre a primeira e a última avaliação (em dias); $\ln$ = logaritmo natural; X = severidade da doença na última avaliação (%); x_0 = severidade da doença na primeira avaliação (%). Calculou-se também a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (SHANER; FINNEY, 1977), com base na fórmula: $AACPD = \sum [(y_i + y_{i+1})/2] \cdot (t_{i+1} - t_i)$, onde: n = número de avaliações; y = severidade de *Colletotrichum guaranicola* (%); t = tempo (dias).

Os valores de severidade final, taxa de progresso da doença e AACPD foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa Assistat versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Taxa de Crescimento Micelial Diária (TCMD) e características culturais

Os valores médios da taxa de crescimento micelial diária (TCMD) dos isolados testados são apresentados na Tabela 2.

Entre os descritores morfológicos, culturais e fisiológicos utilizados em estudos de taxonomia de *Colletotrichum* spp., a taxa de crescimento micelial é, sem dúvida, um dos mais recomendados e confiáveis (SUTTON, 1992).

Tabela 2 - Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil

(Continua)

Isolado	TCMD (mm/dia) ¹	Cor da colônia ²	Cor do reverso da colônia ²	Borda da colônia ³	Topografia ³	Textura micelial ³	Forma marginal ³	Setor ⁴	ME ⁵
C-09	12,25 a*	Cinza claro	Creme alaranjada	Inteira	Convexa Cupulada	Cotonosa	Esfiapada	-	-
C-12	3,17 h	Branca a Cinza claro	Creme amarelada	Inteira	Cupulada	Flocosa	Esfiapada	-	-
C-15	10,31 b	Branca a Cinza claro	Branca acinzentada	Inteira	Convexa baixa	Cotonosa	Desfiada	-	-
C-16	10,60 b	Branca a Cinza claro	Creme amarelada	Inteira	Convexa/ Cupulada	Flocosa	Esfiapada	-	-
C-18	9,54 c	Branca a Cinza claro	Creme amarelada	Inteira	Convexa baixa	Cotonosa	Esfiapada	-	-
C-19	8,63 d	Branca a Cinza claro	Creme amarelada	Inteira	Convexa/ Cupulada	Cotonosa	Esfiapada	-	-
C-33	11,21 b	Cinza escura	Creme acinzentada	Inteira	Convexa baixa	Média	Esfiapada	-	-
2109	9,27 c	Cinza escura	Creme a branca	Inteira	Convexa/ Cupulada	Cotonosa	Esfiapada	-	-
2271	5,61 f	Branca a Creme amarelada	Amarelo creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2342	5,67 f	Branca a Creme amarelada	Amarelo creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2343	5,96 f	Branca a Creme amarelada	Amarelo creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2348	4,58 g	Branca a Creme amarelada	Amarelo creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2353	5,11 g	Branca a Creme amarelada	Amarelo creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2360	3,73 h	Creme amarelada	Amarelo creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2361	6,89 e	Branca alaranjada	Creme alaranjada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2365	4,67 e	Creme	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-

Tabela 2 - Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil

(Continua)

Isolado	TCMD (mm/dia) ¹	Cor da colônia ²	Cor do reverso da colônia ²	Borda da colônia ³	Topografia ³	Textura micelial ³	Forma marginal ³	Setor ⁴	ME ⁵
2373	4,40 g	Creme amarelada	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2380	7,20 e	Creme	Creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2396	4,80 g	Creme amarelada	Creme amarelada	Inteira	Achatada	Escarsa	Desfiada	-	-
2408	7,33 e	Branca a clara	Creme acinzentada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2411	4,38 g	Branca a clara	Creme claro	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	-
2412	3,47 h	Branca a clara	Creme claro	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	-
2414	3,55 h	Branca a clara	Creme claro	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	-
2416	6,61 e	Branca a creme	Castanho	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	-
2417	6,10 f	Creme clara	Creme alaranjada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2418	3,83 h	Creme clara	Creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2419	7,08 e	Creme clara	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2420	3,75 h	Creme clara	Creme alaranjada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2505	5,96 f	Creme clara	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2506	8,68 d	Creme amarelada	Amarela	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Esfiapada	+	+
2507	7,41 e	Creme clara	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2508	8,26 d	Creme a creme clara	Amarela clara	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+

Tabela 2 - Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil

(Continua)

Isolado	TCMD (mm/dia) ¹	Cor da colônia ²	Cor do reverso da colônia ²	Borda da colônia ³	Topografia ³	Textura micelial ³	Forma marginal ³	Setor ⁴	ME ⁵
2509	8,87 d	Creme	Creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2510	7,50 e	Creme clara	Creme	Inteira/ Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2511	5,44 f	Creme amarelada	Amarela	Inteira	Convexa/ Cupulada	Média/ Escarsa	Desfiada	-	-
2512	6,12 f	Creme clara	Creme alaranjada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Média/ Escarsa	Desfiada	+	+
2513	7,23 e	Creme	Creme amarelada	Ondulada/ Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2514	10,68 b	Amarela a esverdeada	Cinza escura	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2515	5,23 f	Creme clara	Creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2516	7,39 e	Creme clara	Creme amarelada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2517	6,23 f	Creme amarelada	Amarela a Creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2518	5,78 f	Creme	Creme escura	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2519	6,71 e	Creme amarelada	Amarela	Inteira	Achatada	Escarsa	Desfiada	-	-
2520	5,93 f	Creme amarelada	Amarela a Creme	Inteira	Achatada	Escarsa	Desfiada	-	-
2521	6,12 f	Creme acinzentada	Creme alaranjada	Inteira	Achatada	Escarsa	Desfiada	-	-
2522	6,24 f	Amarela clara	Amarela a Creme	Inteira	Achatada	Escarsa	Desfiada	-	+
2523	6,81 e	Creme amarelada	Creme amarelada	Inteira	Achatada	Escarsa	Desfiada	-	+
2524	5,24 f	Amarelo a clara	Amarela a Alaranjada	Ondulada	Achatada	Escarsa	Desfiada	-	+

Tabela 2 - Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil

(Continua)

Isolado	TCMD (mm/dia) ¹	Cor da colônia ²	Cor do reverso da colônia ²	Borda da colônia ³	Topografia ³	Textura micelial ³	Forma marginal ³	Setor ⁴	ME ⁵
2538	7,20 e	Branca	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa/Leve	Desfiada	-	-
2539	6,98 e	Branca a cinza	Amarela clara/Creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa/Leve	Desfiada	-	-
2540	4,22 e	Branca/Raias pretas	Creme alaranjada	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	-
2541	5,85 g	Branca amarelada	Creme	Inteira/ Lev ondulada	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	+
2542	5,56 f	Branca a creme alaranjada	Branca a creme	Ondulada	Achatada/ Efusa	Média/ Escarsa	Desfiada	-	-
2543	5,94 f	Branca/Raias pretas	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/ Escarsa	Desfiada	-	+
2544	6,57 e	Branca	Creme alaranjada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2545	5,90 f	Branca acinzentada	Creme amarelada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2546	6,1 f	Branca	Amarela a creme	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2547	4,94 g	Branca esverdeada	Creme a Amarela	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	-	-
2548	3,73 h	Branca	Creme a Amarela	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Recortada	+	-
2550	3,22 h	Branca a laranja clara	Creme alaranjada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	-	-
2552	5,87 f	Branca	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	+	+
2554	5,43 f	Branca esverdeada	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	-	+
2582	5,46 g	Creme clara	Creme clara	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2583	6,3 f	Branca a cinza claro	Laranja clara	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-

Tabela 2 - Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil

(Continua)

Isolado	TCMD (mm/dia) ¹	Cor da colônia ²	Cor do reverso da colônia ²	Borda da colônia ³	Topografia ³	Textura micelial ³	Forma marginal ³	Setor ⁴	ME ⁵
2585	6,78 e	Branca a Cinza claro	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2588	4,21 g	Branca a Cinza claro	Creme alaranjada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2589	6,59 e	Branca a Creme	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2538	7,20 e	Branca	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa/Leve	Desfiada	-	-
2539	6,98 e	Branca a cinza	Amarela clara/Creme	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa/Leve	Desfiada	-	-
2540	4,22 e	Branca/Raias pretas	Creme alaranjada	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	-
2541	5,85 g	Branca amarelada	Creme	Inteira/ Lev ondulada	Achatada/ Efusa	Leve/Escarsa	Desfiada	-	+
2542	5,56 f	Branca a creme alaranjada	Branca a creme	Ondulada	Achatada/ Efusa	Média/ Escarsa	Desfiada	-	-
2543	5,94 f	Branca/Raias pretas	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Leve/ Escarsa	Desfiada	-	+
2544	6,57 e	Branca	Creme alaranjada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2545	5,90 f	Branca acinzentada	Creme amarelada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2546	6,1 f	Branca	Amarela a creme	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2547	4,94 g	Branca esverdeada	Creme a Amarela	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	-	-
2548	3,73 h	Branca	Creme a Amarela	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Recortada	+	-

Tabela 2 - Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil

(Continua)

Isolado	TCMD (mm/dia) ¹	Cor da colônia ²	Cor do reverso da colônia ²	Borda da colônia ³	Topografia ³	Textura micelial ³	Forma marginal ³	Setor ⁴	ME ⁵
2550	3,22 h	Branca a laranja clara	Creme alaranjada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	-	-
2552	5,87 f	Branca	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	+	+
2554	5,43 f	Branca esverdeada	Creme amarelada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada/ Lisa	-	+
2582	5,46 g	Creme clara	Creme clara	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2583	6,3 f	Branca a cinza claro	Laranja clara	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2585	6,78 e	Branca a Cinza claro	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2588	4,21 g	Branca a Cinza claro	Creme alaranjada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2589	6,59 e	Branca a Creme	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2590	5,99 f	Branca a cinza claro	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	-
2592	6,61 e	Branca a cinza clara	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2594	6,02 f	Branca a cinza claro	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2595	4,59 g	Branca a cinza claro	Creme alaranjada	Ondulada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2596	5,34 f	Branca a cinza claro	Creme alaranjada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	+	+
2597	6,73 e	Cinza claro	Creme escura	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2598	6,87 e	Branca a cinza claro	Creme salmão	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-

Tabela 2 - Taxa de crescimento micelial diária (TCMD) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose e provenientes de áreas produtoras do Estado do Amazonas, Brasil

(Conclusão)									
Isolado	TCMD (mm/dia) ¹	Cor da colônia ²	Cor do reverso da colônia ²	Borda da colônia ³	Topografia ³	Textura micelial ³	Forma marginal ³	Setor ⁴	ME ⁵
2599	5,73 f	Branca a Cinza esverdeada	Amarela alaranjada	Inteira	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	-
2601	2,71 i	Branca a cinza claro	Castanho clara	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2602	5,85 f	Branca a cinza claro	Creme amarelada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
2603	5,62 f	Branca a cinza claro	Creme amarelada	Lobada	Achatada/ Efusa	Escarsa	Desfiada	-	+
MN-57	9,73 c	Cinza claro	Castanho a cinza	Inteira	Elevada/ Côncava	Flocosa	Desfiada	-	-
PS-64	8,49 d	Branca acinzentada	Salmão	Inteira	Elevada/ Côncava	Flocosa	Desfiada	-	-
PS-67	7,85 d	Branca acinzentada	Salmão	Inteira	Elevada/ Côncava	Flocosa	Desfiada	-	-
C.V. (%) ⁶	9,48								

¹Taxa de crescimento micelial diária dos isolados estimada com os dados de leitura de seis dias em meio BDA cultivados a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h

²Descrição com base na carta de cores de Saccardo (1894) e observada nas quatro repetições aos seis dias após a repicagem. Os isolados foram cultivados em meio BDA, a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h.

³Descrição com base nas informações preconizadas por Gams, Verkeley, Crous (2009) e Saccardo (1894). observada nas quatro repetições aos seis dias após a repicagem. Os isolados foram cultivados em meio BDA, a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h

⁴Presença (+) ou ausência (-) de setores nas quatro repetições

⁵ME = Microescleródios. + = Presente; - = Ausente

⁶C.V. (%) = Coeficiente de variação

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($P = 0,05$)

As médias de crescimento micelial de *C. guaranicola*, em meio BDA, que foram analisados e agrupados, estão representadas na Tabela 03. De acordo com a análise estatística, houve diferença significativa entre os isolados e estes diferiram quanto à taxa de crescimento micelial diária (TCMD) obtidas no decorrer dos seis dias de avaliação, com a formação de oito grupos distintos pelo teste de Scott-Knott ($P = 0,05$). Dos 86 isolados analisados (incluindo os três controles de outros grupos), C-09 apresentou a mais alta taxa de crescimento micelial, com média de crescimento de 12,25 mm/dia. Por outro lado, o isolado 2601 teve a menor taxa de crescimento (2,71 mm/dia). Cinco isolados apresentaram taxa de crescimento médio acima de 1,0 cm.dia⁻¹ (C-09, C-15, C-16, C-33 e 2514). Os menores crescimentos foram registrados pelos isolados 2601, C-12, 2550, 2412, 2414, 2360, 2548, 2420, 2418.

Os isolados PS-64 (*C. boninense*), PS-67 (*C. acutatum*) e MN-57 (*C. gloeosporioides*) utilizados como controle, também cresceram a taxas superiores a 7,0 mm/dia.

A taxa de crescimento micelial têm sido utilizada na taxonomia de *Colletotrichum* para distinção de espécies e foi considerada por Vinnere (2004) uma característica estável e útil para distinção entre *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Sutton (1992) afirma que *C. gloeosporioides* tem taxa de crescimento superior a *C. acutatum*, fato também verificado por Adaskaveg e Hartin (1997). Eles observaram que a última espécie cresce a taxa sempre superior a 10 mm/dia, concordando com os resultados desse trabalho em relação aos isolados da série C, originários do clone BRS-800. A exceção foi o isolado 2514, que também teve crescimento acima de 10 mm/dia. A diferença na taxa de crescimento dos isolados da série C, além das diferenças nas características culturais (colônias cinzas), podem indicar que esses isolados são próximos ao complexo *C. gloeosporioides*, como realmente veio a ser confirmado na análise filogenética deste trabalho. Por outro lado, *C. boninense* cresce a taxas bem menores, conforme relato de Tozze Júnior (2013), Damm et al. (2012a) e Moriwaki et al. (2003). Na filogenia, com exceção do isolado C-14, todos os isolados da série C tiveram crescimento acima ou próximo de 10 mm/dia. Entre os isolados utilizados como controle de comparação nesse trabalho, o isolado MN-57, identificado como *C. gloeosporioides* por Tozze Júnior (2013), apresentou a maior taxa de crescimento em relação a PS-64 (*C. boninense*) e PS-67 (*C. acutatum*), aproximando-se dos isolados com maiores taxas de crescimentos, descritos anteriormente.

Veras et al. (1997) testaram nove isolados de *C. guaranicola* provenientes de cinco municípios do Estado do Amazonas e encontraram variação na taxa de crescimento, tanto em relação ao meio quanto ao isolado utilizado. Em meio BDA, cinco dos oito isolados cresceram acima de 1 cm/dia, concordando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Sutton (1980, 1992) afirma que *C. gloeosporioides* apresenta crescimento mais rápido que as outras espécies de conídios cilíndricos.

Quanto à descrição das características culturais, percebeu-se que a maioria dos isolados apresenta colônia de coloração branca a creme-amarelada (verso) e amarelo a creme-amarelado (reverso), com poucos setores e sem microescleródios. A maioria das colônias apresentou micélio baixo, liso e escarso, às vezes coriáceo, com reverso de coloração branca a creme amarelada (Figuras 3 e 4). Diferente dos demais isolados, C-09, C-14, C-16, C-15, C-33, C-16, C-18, C-19 e 2109, procedentes da Fazenda Santa Helena (Clone BRS-800, Maués), apresentaram micélio aéreo muito mais denso e cotonoso, de coloração branco-acinzentada a cinza-claro (verso) e reverso de coloração branco a cinza-escuro. O aspecto da colônia dos referidos isolados se assemelham às características culturais de *C. gloeosporioides* (SUTTON, 1992; TOZZE JÚNIOR, 2013) e *C. boninense* (MORIWAKI et al., 2003).

Comparando-se os resultados obtidos com as descrições de Sutton (1992) para espécies de *Colletotrichum*, observa-se a maior semelhança dos isolados da série C (clone BRS-800) com *C. gloeosporioides*, enquanto os demais não se enquadram nos padrões culturais de Sutton (1992), estando mais próximos do padrão de coloração da espécie *C. boninense* (MORIWAKI et al., 2003)

Figura 4 - Aspectos de colônias de isolados de *Colletotrichum guaranicola* cultivados a 25 °C em BDA (Fila 1 e 2); *C. boninense* e *C. gloeosporioides* (fila 3). Da esquerda para a direita. Primeira fila: C-16, C-18, C-19, 2373, 2506. Segunda fila: 2509, 2516, 2517, 2539, 2554. Terceira fila: PS-67, PS-64, MN-57

Figura 5 - Reverso das colônias da Figura 2

Figura 6 - Aspectos do verso de colônias de *Colletotrichum guaranicola* cultivadas a 25 °C em BDA, após seis dias de incubação. Da esquerda para direita. Fila 1: 2552, 2361, 2353, 2543 e C-15. Fila 2: 2360, 2342, 2419, 2519 e 2545. Fila 3: 2348, C-33, 2512, 2396 e 2412. Fila 4: 2343, 2365, 2109, C-9 e 2380. Fila 5: C-14 e 2411

2.3.2 Morfometria de conídios

Os resultados médios para comprimento, largura e relação comprimento/largura, assim como os resultados para formato de conídios de 76 isolados de *C. guaranicola* são apresentados na Tabela 3.

Os dados da Tabela 3 mostram que o teste de agrupamento de Scott-Knott foi capaz de separar os isolados em três e dois grupos distintos, em relação ao comprimento de conídios. Quanto à largura e relação C/L foram separados apenas dois grupos de conídios (Tabela 3).

Tabela 3- Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura), presença de hilo e formato de conídios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose (Continua)

Isolado	Tamanho (µm)						Hilo	Formato (%) ³			
	Comprimento ^{1*}		Largura ^{1*}		Relação C/L ^{2*}			Fusiforme	Cilíndrico/Oblongo	Clavado	Constricto
C-09	12,3 c	(10,2-14,2)	4,3 b	(3,7-4,9)	2,91 a	(2,41-3,57)	—	0	70	6	24
C-12	12,3 c	(9,8-14,2)	4,2 b	(3,8-4,8)	2,94 a	(2,36-3,28)	—	0	66	8	26
C-13	12,4 c	(10,8-14,0)	4,2 b	(3,8-4,8)	2,95 a	(2,84-3,02)	—	0	68	10	22
C-16	12,4 c	(10,8-14,0)	4,2 b	(3,8-4,8)	2,95 a	(2,44-3,66)	—	0	58	16	26
C-17	13,0 b	(10,4-15,6)	4,3 b	(3,7-4,9)	3,06 a	(2,43-3,89)	—	0	64	8	28
C-22	12,5 c	(9,7-14,4)	4,2 b	(3,8-4,8)	2,96 a	(2,31-3,51)	—	0	62	22	16
C-33	13,4 a	(10,2-17,8)	4,7 a	(3,7-6,0)	2,91 a	(1,96-3,66)	—	0	66	6	28
2271	12,5 c	(9,9-15,8)	4,4 b	(3,8-5,3)	2,85 b	(2,06-4,16)	—	0	58	28	14
2346	12,5 c	(9,8-15,6)	4,5 a	(3,8-5,2)	2,83 b	(2,13-3,54)	+	0	58	16	26
2347	12,8 b	(10,4-15,2)	4,5 a	(3,8-5,2)	2,88 b	(2,31-3,53)	+	0	58	8	34
2348	12,2 c	(9,8-14,2)	4,4 b	(3,8-5,0)	2,78 b	(2,00-3,29)	+	0	68	12	20
2349	12,4 c	(9,9-14,8)	4,4 b	(3,8-4,9)	2,83 b	(2,11-3,56)	+	0	60	12	28
2350	12,5 c	(10,2-14,9)	4,4 b	(3,8-5,1)	2,86 b	(2,12-3,55)	+	0	70	6	24
2351	12,4 c	(10,2-14,5)	4,5 a	(3,9-5,1)	2,79 b	(2,04-3,15)	+	0	70	6	24
2352	12,4 c	(9,8-14,3)	4,5 a	(3,9-5,2)	2,74 b	(2,04-3,33)	+	0	74	8	18
2353	12,6 b	(9,8-14,6)	4,5 a	(3,8-5,2)	2,81 b	(2,28-3,56)	+	0	72	8	20
2354	12,5 c	(9,8-14,5)	4,6 a	(3,9-5,2)	2,75 b	(2,13-3,54)	+	0	70	12	18
2355	12,5 c	(9,9-14,9)	4,6 a	(3,9-5,2)	2,76 b	(2,02-3,48)	+	0	60	10	30
2356	12,5 c	(10,6-15)	4,6 a	(3,9-5,3)	2,73 b	(2,22-3,49)	+	0	70	6	24
2408	13,5 a	(10,5-16,2)	4,6 a	(3,2-5,8)	2,94 a	(2,17-4,75)	+	0	88	2	10
2416	13,0 c	(9,5-15,3)	4,6 a	(3,8-5,6)	2,85 b	(2,40-3,19)	+	0	86	6	8
2417	12,8 b	(10,4-15,2)	4,5 a	(3,8-5,2)	2,89 b	(2,56-3,40)	+	0	76	8	16
2418	13,0 b	(10,5-15,6)	4,5 a	(3,9-5,2)	2,91 a	(2,52-3,49)	+	0	78	8	14
2419	13,0 b	(10,4-14,8)	4,5 a	(3,9-5,2)	2,87 b	(2,17-3,54)	+	0	82	10	8
2420	13,0 b	(9,8-15,6)	4,4 b	(3,8-5,3)	2,96 a	(2,52-3,43)	+	0	68	8	24
2505	13,5 a	(10,2-17,0)	4,6 a	(4,0-5,7)	2,94 a	(2,18-3,90)	+	0	64	12	24
2506	13,2 a	(10-17,7)	4,7 a	(3,8-5,7)	2,82 b	(1,92-3,54)	+	0	62	14	24
2507	13,2 a	(9,8-17,4)	4,6 a	(3,7-5,6)	2,93 a	(2,04-4,51)	+	0	72	8	20
2508	13,2 a	(10,6-17,4)	4,5 a	(3,8-5,6)	2,95 a	(2,15-4,02)	+	0	86	2	12

Tabela 3- Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura), presença de hilo e formato de conídios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose (Continua)

Isolado	Tamanho (µm)						Hilo	Formato (%) ³			
	Comprimento ^{1*}		Largura ^{1*}		Relação C/L ^{2*}			Fusiforme	Cilíndrico/Oblongo	Clavado	Constricto
2509	13,4 a	(9,8–17,9)	4,7 a	(3,7–5,8)	2,91 b	(1,98–4,43)	+	0	58	12	30
2510	13,0 b	(10,2–15,4)	4,6 a	(3,8–5,4)	2,85 b	(2,04–3,61)	+	0	76	4	20
2511	13,1 b	(9,4–18,0)	4,6 a	(3,7–6,0)	2,87 b	(1,95–4,18)	+	0	80	8	12
2512	12,5 c	(9,7–16,8)	4,5 a	(3,8–5,6)	2,77 b	(1,88–3,35)	+	0	72	4	24
2513	12,9 b	(9,4–17,3)	4,5 a	(3,7–5,2)	2,88 b	(2,04–4,55)	+	0	68	8	24
2514	13,4 a	(10,4–17,4)	4,6 a	(3,7–5,8)	2,93 a	(2,21–3,80)	+	0	66	10	24
2515	13,1 a	(10,2–18,2)	4,6 a	(3,8–5,7)	2,87 b	(1,96–4,20)	+	0	64	6	30
2516	13,0 b	(10,2–17,3)	4,6 a	(3,7–5,6)	2,88 b	(1,91–4,15)	+	0	74	8	18
2517	13,3 a	(10,2–17,2)	4,6 a	(3,8–6,0)	2,89 b	(1,90–4,00)	+	0	74	10	16
2518	13,0 b	(9,7–15,9)	4,6 a	(3,8–5,8)	2,86 b	(1,96–3,64)	+	0	76	12	12
2519	13,2 a	(10,8–16,6)	4,7 a	(3,9–6,4)	2,84 b	(2,15–3,46)	+	0	72	8	20
2520	13,0 b	(9,8–16,2)	4,5 a	(3,8–5,6)	2,90 a	(1,96–3,53)	+	0	74	6	20
2521	13,2 a	(10,6–17,5)	4,7 a	(3,7–5,8)	2,84 b	(1,96–4,49)	+	0	74	6	20
2522	13,3 a	(10–17,3)	4,6 a	(3,8–5,6)	2,92 a	(1,96–3,76)	+	0	70	10	20
2523	13,7 a	(10,5–17,5)	4,5 a	(4,0–5,2)	3,02 a	(2,16–3,93)	+	0	70	2	28
2524	13,4 a	(9,9–16,4)	4,6 a	(3,8–6,0)	2,95 a	(2,16–4,24)	+	0	68	12	20
2538	13,5 a	(9,5–16,2)	4,5 a	(3,8–5,3)	2,97 a	(2,50–3,27)	+	0	80	8	12
2539	13,5 a	(10,4–16,3)	4,5 a	(3,9–5,2)	2,99 a	(2,67–3,24)	+	0	68	6	26
2540	13,5 a	(10,4–16,4)	4,5 a	(3,8–5,2)	2,99 a	(2,72–3,22)	+	0	66	6	28
2541	13,6 a	(9,8–16,1)	4,6 a	(3,8–5,1)	2,98 a	(2,58–3,31)	+	0	70	10	20
2542	13,6 a	(10,4–16,2)	4,6 a	(3,9–5,4)	2,95 a	(2,58–3,29)	+	0	70	10	20
2543	13,5 a	(10,4–16,2)	4,6 a	(3,9–5,2)	2,95 a	(2,35–3,59)	+	0	66	12	22
2544	13,7 a	(10,8–16,5)	4,6 a	(3,8–5,4)	2,96 a	(2,76–3,22)	+	0	60	12	28
2545	13,7 a	(9,8–16,4)	4,7 a	(3,9–5,4)	2,94 a	(2,13–3,50)	+	0	74	6	20
2546	13,6 a	(10,8–16,1)	4,7 a	(3,9–5,3)	2,92 a	(2,53–3,22)	+	0	70	6	24
2547	13,6 a	(11,2–16,4)	4,7 a	(3,8–5,4)	2,92 a	(2,60–3,22)	+	0	74	8	18
2548	13,4 a	(10,6–16,3)	4,6 a	(3,8–5,3)	2,92 a	(2,44–3,54)	+	0	78	4	18
2550	13,5 a	(10,6–16,4)	4,6 a	(3,7–5,3)	2,97 a	(2,47–3,90)	+	0	78	6	16
2552	13,5 a	(10,5–16,2)	4,6 a	(3,8–5,3)	2,94 a	(2,33–3,30)	+	0	76	10	14

Tabela 3- Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura), presença de hilo e formato de conídios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose (Continua)

Isolado	Tamanho (µm)						Hilo	Formato (%) ³			
	Comprimento ^{1*}		Largura ^{1*}		Relação C/L ^{2*}			Fusiforme	Cilíndrico/Oblongo	Clavado	Constricto
2554	13,3 a	(10,6–16,2)	4,6 a	(3,8–5,3)	2,91 a	(2,67–3,20)	+	0	72	2	26
2582	12,8 b	(10,8–14,8)	4,3 b	(3,8–5,2)	2,96 a	(2,51–3,51)	+	0	60	16	24
2583	12,9 b	(10,8–15,4)	4,3 b	(3,8–5,4)	2,98 a	(2,70–3,32)	+	0	64	14	22
2385	12,4 c	(10,8–14)	4,2 b	(3,8–4,8)	2,96 a	(2,44–3,66)	+	0	58	16	26
2588	12,9 b	(11,4–15,6)	4,5 a	(3,8–5,2)	2,89 b	(2,59–3,19)	+	0	58	16	26
2589	13,1 a	(10,8–15,8)	4,5 a	(3,8–5,2)	2,89 b	(2,58–3,16)	+	0	70	4	26
2590	12,9 b	(10,8–14,6)	4,5 a	(3,8–5,1)	2,87 b	(2,49–3,26)	+	0	72	4	24
2592	13,1 a\	(11,8–14,8)	4,6 a	(3,8–5,2)	2,87 b	(2,58–3,33)	+	0	60	12	28
2594	13,1 a	(11,3–15,3)	4,6 a	(3,8–5,3)	2,87 b	(2,72–3,13)	+	0	74	8	18
2595	13,2 a	(11,8–15,8)	4,6 a	(3,8–5,2)	2,89 b	(2,60–3,26)	+	0	76	4	20
2596	13,0 a	(11,6–15,2)	4,5 a	(3,9–5,2)	2,89 b	(2,41–3,21)	+	0	74	6	20
2597	12,9 b	(11,5–15,3)	4,5 a	(3,9–5,2)	2,86 b	(2,63–3,21)	+	0	82	6	12
2598	12,9 b	(10,2–15,4)	4,6 a	(3,8–5,3)	2,84 b	(2,19–3,05)	+	0	78	4	18
2599	13,8 a	(11,4–16,3)	4,7 a	(4,1–5,2)	2,95 a	(2,71–3,54)	+	0	70	12	18
2601	13,7 a	(10,6–16,4)	4,7 a	(3,8–5,2)	2,93 a	(2,59–3,46)	+	0	68	6	26
2602	13,3 a	(9,6–16,2)	4,6 a	(3,8–5,3)	2,91 a	(2,53–3,17)	+	0	74	2	24
2603	13,6 a	(9,4–16,2)	4,6 a	(3,9–5,1)	2,93 a	(2,41–3,20)	+	0	70	6	24
8183	13,6 a	(9,7–16,2)	4,7 a	(3,8–5,4)	2,92 a	(2,11–3,47)	+	0	66	16	18
C.V. (%) ⁴	9,12		10,45		10,22						

¹Média de 50 conídios produzidos em meio BDA, aos sete dias de cultivo a 25 ± 1 °C e 12 h de fotoperíodo

²Média de 50 valores da relação C/L, calculada pela divisão do comprimento pela largura de conídio de cada isolado

³Distribuição da frequência de formatos de conídios. Observação em 50 conídios/isolado

⁴C.V. (%) = Coeficiente de variação

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($P = 0,05$)

Os resultados médios para comprimento de conídios de *C. guaranicola* variaram entre os isolados de 12,20 µm (isolado 2348) a 13,80 µm (isolado 2599).

Para largura média de conídios os isolados variaram de 4,20 µm (isolados C-12, C-13, C-16, C-22 e 2585) a 4,70 µm (isolados 2599 e 2519). A amplitude média de variação para comprimento ficou entre 9,40 µm (isolados 2511, 2513 e 2603) e 18,20 µm (isolado 2515). A amplitude média de variação para largura ficou entre 3,2 µm (isolado 2408) e 6,4 µm (isolado 2519).

A média para relação C/L variou de 2,73 µm (isolado 2356) a 4,75 µm (isolado 2408). A amplitude média para C/L variou entre 2,73 µm e 4,75 µm. Os resultados de comprimento e largura de conídios estão de acordo com a amplitude média para comprimento e largura de conídios de *C. guaranicola* encontrados por Albuquerque (1960), quando descreveu e identificou a espécie pela primeira vez, isto é, 12–20 µm × 4–6 µm.

Os resultados, no entanto, contrariam os obtidos por Bentes e Matusuoka (2004), que reavaliaram a taxonomia do patógeno com base na morfometria de conídios e apressórios, e encontraram comprimento e largura variando de 10,5–15,5 µm × 3,0–4,3 µm, respectivamente. Portanto, para os isolados testados, a amplitude de variação do comprimento de conídios foi bem menor.

As diferenças encontradas nos valores tanto para comprimento como para largura de conídios em relação ao trabalho de Bentes e Matsuoka (2004) podem refletir tanto diferentes condições ambientais de incubação (luminosidade, temperatura, meio de cultura), como também condição inerente ao único isolado utilizado pelos referidos autores.

Moriwaki et al. (2003) descreveu pela primeira vez o holotipo NIAES 20520, definindo a etimologia da espécie como *C. boninense* (MAFF 305972), em referência à origem geográfica das ilhas Bonin, no Japão, onde o fungo foi primeiramente encontrado e descrito. Cultivada em BDA, a espécie é descrita como possuindo conídios robustos, forma cilíndrica, com ápice obtuso e base com hilo semelhante à cicatriz. Essa descrição coincide com os resultados do formato predominante (cilíndrico a oblongo) e a presença de hilo, observado entre isolados de *C. guaranicola*, com exceção dos isolados da Série C, pertencentes ao clone BRS-800, e coletados na Fazenda Santa Helena, no município de Maués. Ao contrário de *C. gloeosporioides* (3,5 µm) (SUTTON, 1992), todas as descrições sobre morfometria e formato de *C.*

boninense mencionam presença de hilo em conídios mais robustos (2,3 μm) (MORIWAKI et al., 2003).

Colletotrichum boninense enquadra-se dentro do conceito das espécies de *C. gloeosporioides lato sensu* (von Arx 1957; Sutton, 1980), porém difere de *C. gloeosporioides stricto sensu* em características morfológicas (MORIWAKI et al., 2003). Os autores afirmam que *C. boninense* pode ser separada de *C. gloeosporioides* pela morfologia da colônia, forma e relação comprimento/largura de conídios. A relação C/L é importante na descrição de *C. boninense* porque a espécie é descrita como tendo conídios mais robustos que *C. gloeosporioides*, resultados que corroboram os resultados obtidos no presente trabalho.

Em relação à morfologia da colônia, relata que *C. boninense* apresenta colônias de coloração creme a laranja, coberta com massas de conídios coalescentes, de cor laranja, quando comparadas com *C. gloeosporioides* que apresentaram colônias de coloração branco-acinzentadas a cinza escuro, resultados que estão de acordo com os encontrados neste trabalho.

As características culturais dos isolados de *C. guaranicola* estudadas neste trabalho revelam que houve diferença no padrão de coloração de colônias entre os isolados. Os isolados pertencentes às series 23, 24, 25 e 26, procedentes de Maués, Boa Vista do Ramos, Manacapuru, Presidente Figueiredo e Manaus se aproximaram do padrão de cor descrito por Moriwaki et al. (2003), isto é, apresentaram colônia de coloração creme, creme-amarelado ou creme-alaranjado, as últimas principalmente no reverso; enquanto os isolados da série C (C-09, C-12, C-14, C-16, C-18, C-19, C-33), apresentaram padrão de coloração de colônia semelhantes a *C. gloeosporioides*, isto é, branco acinzentado a cinza escuro (SUTTON, 1992).

Embora o tamanho de conídios de *C. boninense* (15,5) 13-15,5 (17) μm x (4) 5-6 (7) μm mostre sobreposição ao limite de tamanho de *C. gloeosporioides* (12-17 μm x 3,5-6 μm) (MORIWAKI et al., 2003; SUTTON, 1980), o primeiro autor relata que conídios de *C. boninense* são diferentes porque apresentam protuberância (hilo) na base e são geralmente mais curtos e mais largos que os conídios de *C. gloeosporioides*, apresentando relação comprimento/largura maior (1,8) 2-3 (3,3) μm .

No presente trabalho, *C. guaranicola* apresentou média de comprimento (12,20-13,80 μm) um pouco inferior aos encontrados por Moriwaki et al. (2003) para *C. boninense* (13-15,5 μm), porém dentro do limite de comprimento descrito tanto para *C. boninense* quanto para *C. gloeosporioides*. Em relação à largura, verificou-se

também dimensão um pouco inferior em comparação às duas espécies descritas, porém, dentro da faixa de limite estabelecido (4,21 μm e 4,71 μm).

A amplitude de comprimento (limites inferior e superior) variou mais que a amplitude da largura e a relação comprimento largura não mostrou diferença entre os isolados testados, se aproximando dos resultados descritos por Moriwaki et al. (2003) e Sutton (1980) para *C. boninense* e *C. gloeosporioides*.

C. boninense foi morfológicamente diferente de *C. kahawae* e *C. xanthorrhoeae* e separado de outras espécies de *Colletotrichum* de conídios retos, principalmente em relação à largura dos conídios (4-) 5-6 (7-) μm , bem mais robustos que *C. kahawae* (4 μm) ou *C. xanthorrhoeae* (3-5 μm) (WALLER et al., 1993; MORIWAKI et al., 2003). Esses resultados não estão de acordo com a largura média de conídios encontrados para *C. guaranicola* (4,21 μm para o isolado C-12; 4,71 μm para o isolado 2506) e mais próximos dos limites de largura encontrados por Albuquerque (1960) no isolado original de *C. guaranicola* (4-6 μm).

Damm et al. (2012a) descreveram as características morfológicas de *C. boninense* isolados de ramo de *Anthriscus* e cultivado em meio SNA como apresentando conídios hialinos, de parede lisa, asseptados, retos, cilíndricos a clavados, com ápice e base arredondados e hilo proeminente. Os conídios variaram de 12 a 14,5 μm de comprimento x 5,5 a 6,5 μm de largura. . No presente trabalho, a maioria dos conídios de *C. guaranicola* cultivados em BDA apresentaram formato cilíndrico a oblongo, enquadrando-se dentro das características morfométricas descritas por Damm et al. (2012a) para *C. boninense*, principalmente quanto comprimento (9,40-) 12,20 μm -13,80 (18,20-) μm , porém com largura bem inferior (3,2-) 4,20-4,70 (6,4-) μm . Com exceção dos isolados originários do clone BRS-800 coletados na Fazenda Santa Helena (isolados da série C, Maués), todos os demais isolados exibiram hilo ou cicatriz na base do conídio. Essa característica é importante na separação de *C. boninense* de *C. gloeosporioides* (MORIWAKI et al., 2003) (Tabela 3).

Veras et al. (1997) encontraram grandes variações no comprimento, largura e relação C/L de conídios de *C. guaranicola*, em função dos isolados e dos meios de cultura empregados. Os autores encontraram valores médios de comprimento e largura de conídios em meio BDA de 12,6-17,4 μm x 4,0-6,6 μm e relação C/L de 2,5 μm . A amplitude superior média para comprimento neste trabalho está acima do encontrado pelos autores, porém ficou dentro do comprimento médio (12,20 – 13,80

μm). Em relação à largura, o limite mínimo da amplitude média foi menor neste trabalho, porém ficou dentro da média de largura encontrada pelos autores ($4,0\text{-}6,6\ \mu\text{m}$). A relação C/L média encontrada neste trabalho foi de ($1,88\text{-}$) $2,73\ \mu\text{m} - 3,06$ ($4,75\text{-}$), acima da média dos resultados encontrados para *C. guaranicola* por Vera et al. (1997) ($2,5\ \mu\text{m}$),

Véras et al. (1997) encontraram grandes variações no comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios de *C. guaranicola*, em função do isolado (8 isolados), mas principalmente devido aos meios de cultura empregados. A autora encontrou valores médios máximo e mínimo para comprimento e largura de $22,7\ \mu\text{m} \times 7,4\ \mu\text{m}$ (meio de aveia, ISO-1), até $10,0\ \mu\text{m} \times 3,9\ \mu\text{m}$ (farinha de milho ISO-6). Comprimento, largura e relação C/L em BDA foram de $17,4 \times 6,6\ \mu\text{m}$ (1) – $12,6 \times 4,0\ \mu\text{m}$ (6) e relação C/L de $2,5\ \mu\text{m}$, todos dentro do tamanho encontrado no presente trabalho empregando meio BDA, com exceção da relação C/L, onde observou-se valores médios mínimo e máximo bem superiores, respectivamente $2,73$ (isolado 2356) e $3,06$ (isolado C-17).

Duarte (1995) estudou a morfologia de oito isolados de *C. guaranicola*, encontrando valores médios para comprimento e largura de conídios de $9,5\ \mu\text{m}$ ($6\text{-}16\ \mu\text{m}$) $\times 4,74\ \mu\text{m}$ ($4\text{-}10\ \mu\text{m}$). Os resultados estão de acordo com os encontrados em nosso trabalho, com exceção do comprimento mínimo, possivelmente devido também a fatores ambientais.

Finalmente, Sutton (1980) classificou a espécie *C. gloeosporioides* como tendo conídios cilíndricos variando de $12\text{-}17\ \mu\text{m} \times 3,5\text{-}6\ \mu\text{m}$. Pelo critério morfométrico, estes conídios seriam facilmente confundidos com *C. guaranicola*, principalmente pela sobreposição nas medidas de tamanho (comprimento $\times$ largura), embora Moriwaki et al. (2003) e Dam et al. (2012a) mencionem características morfológicas que podem diferenciar conídios de *C. gloeosporioides* de *C. boninense*, como presença do hilo e maior largura e robustez na última espécie.

Esses resultados vêm corroborar a importância de se padronizar os procedimentos metodológicos e os fatores ambientais quando se estuda taxonomia de *Colletotrichum* spp., combinando sempre dados morfológicos, culturais e moleculares para se obter comparações confiáveis na identificação.

A Tabela 3 mostra que o formato predominante entre os 86 isolados de *C. guaranicola* estudados é o cilíndrico a oblongo, seguido pelo formato constricto e clavado, respectivamente, não ocorrendo o formato fusiforme (Tabela 5). Os

resultados do presente trabalho estão de acordo com o formato descrito por Albuquerque (1960) em seu trabalho pioneiro de identificação da espécie, e por Bentes e Barreto (2004), que também relataram formato cilíndrico para *C. guaranicola*, o mesmo descrito por Sutton (1992) para *C. gloeosporioides*. Na realidade, a forma cilíndrico-oblonga parece ser predominante entre as espécies dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, ficando fora desse formato às espécies do complexo *C. acutatum*, que apresentam conídios fusiformes (CROUS et al., 2012).

Na Tabela 3 são apresentadas as médias para comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios de isolados provenientes de cinco municípios do Amazonas: Maués (C-9, C-12, C-13, C-16, C-18, C-19, C-33 e 2271), Itacoatiara (2408, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420), Presidente Figueiredo (2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2601, 2602, 2603).

Os resultados mostram que o isolado 2590 apresentou a maior média de comprimento de conídios, porém não diferiu estatisticamente dos isolados C-18, C-19, 2408, 2416, 2418, 2420, 2588, 2592, 2594, 2597 e 2599. Comparando-se as dimensões de conídios de isolados da Tabela 3, verifica-se que, com exceção do isolado 2590 (14,76 μm), todos os isolados dos municípios de Maués, Itacoatiara, Presidente Figueiredo e Urucará tiveram limite superior de comprimento médio abaixo de 13 μm ; enquanto os isolados de Manaus (série de 2505 a 2523) apresentaram maior comprimento médio. No entanto, independente do município de origem, os resultados apresentados estão dentro do limite de comprimento médio descrito por Sutton (1980, 1992) para as espécies de *Colletotrichum* que apresentam conídios cilíndricos/oblongo.

Em relação à largura, o isolado 2408 apresentou a maior média de largura de conídios, não diferindo dos isolados C-18, 2418, 2419, 2588, 2589, 2590 e 2603.

De acordo com Sutton (1988), *C. gloeosporioides* possui conídios retos, oblongos com ápice arredondados, com dimensões entre 12 μm a 17 μm de comprimento por 3,5 μm a 6 μm de largura.

Comparando-se as dimensões e o formato dos isolados de *C. guaranicola* com as dimensões e formatos descritos para *C. gloeosporioides* e *C. boninense* (espécies predominantemente cilíndricos a oblongos), percebe-se que essas características morfológicas também não contribuíram de modo consistente para a identificação de isolados de *Colletotrichum*. Isso porque a maioria dos isolados estudados por Pereira

(2009) e Andrade et al. (2007) apresentam dimensões dentro da faixa em que há sobreposição para as espécies descritas. Em síntese, comprimento e largura de conídios variaram entre os isolados de *C. guaranicola* testados, porém, quando comparados com as dimensões de conídios de *C. gloeosporioides* descritas por Sutton (1992), observa-se que há sobreposição nas dimensões de comprimento e largura, de maneira que no presente trabalho o critério morfométrico não foi útil para delimitar táxon em nível de espécie dentro dos isolados de *C. guaranicola*, enquadrado dentro das espécies de *Colletotrichum* de formato reto/cilíndrico a oblongo descrito Sutton (1980, 1992). A presença de hilo na base do conídio e o formato cilíndrico a oblongo mais robusto podem indicar que esses isolados se assemelham a *C. boninense*, conforme descrição de Moriwaki et al. (2003) e Damm et al. (2012b). Por outro lado, os conídios que se mostram menos robustos e desprovidos de hilo na base podem indicar que estejam próximo de *C. gloeosporioides* (MORIWAKI et al., 2004). Por outro lado, Bentes e Matsuoka (2002) encontraram conídios de *C. guaranicola* com conídios de dimensões muito inferiores aos encontrados nesse trabalho, mas dentro da amplitude de variação descrito por Albuquerque (1960), o que pode ser explicado por condições ambientais distintas das utilizadas no presente trabalho, como também por condições intrínsecas inerentes aos próprios isolados. Menor número de isolados usados por Bentes e Matsuoka (2004) também pode ser causa de variação no tamanho dos conídios.

Como se sabe, a reprodução exata das condições de cultivo utilizadas na ocasião em que as espécies foram descritas é difícil, e que as variáveis ambientais podem assumir uma forte influência tanto no tamanho como na formação dos conídios (TOZZE JÚNIOR, 2012).

2.3.3 Morfometria de apressórios

Na Tabela 4 são apresentados os valores de comprimento, largura e relação C/L, assim como, o percentual do formato de apressórios de 65 isolados de *C. guaranicola*.

De acordo com o teste de Scott-Knott, foi possível separar quatro grupos distintos de apressórios em relação ao comprimento e a largura, e 7 grupos em relação ao C/L.

O menor comprimento médio observado foi de 8,8 μm (isolado 2361) e o maior 13,5 μm (isolado 2552). A menor largura foi de 4,6 μm (isolado 2552) e a maior 6,7 μm (isolados 2408 e 2419). Não há referência a tamanho e forma de apressórios no trabalho de Albuquerque (1960). Porém, Bentes e Barreto (2004) descrevem apressórios de *C. guaranicola* com dimensão de 4,5–8,0 μm $\times$ 5–8,0 μm e formato globoso. Os resultados para comprimento diferem totalmente dos encontrados no presente trabalho, que apresentaram apressórios de comprimento maior.

Ao contrário do comprimento, a largura média de 5,0–8,0 μm está muito acima dos valores encontrados neste trabalho. O formato globoso coincide com o formato arredondado, predominante neste trabalho.

Cox e Irwin (1988) afirmam que *Colletotrichum* spp. têm poucos caracteres taxonômicos confiáveis, com exceção da dimensão dos conídios. Citando Sutton (1962, 1968), Cox e Irwin afirmam que a morfologia de apressórios produzidos de hifas pode ser um bom critério para separação de algumas espécies de *Colletotrichum* que produzem conídios curvos/falcados. Simmonds (1965) encontraram forma de apressórios e dimensão de conídio muito variáveis no grupo *C. gloeosporioides*, relevando o seu uso como critério taxonômico para separação de espécies.

De acordo com Sutton (1980) e Cox e Irwin (1988), o tamanho e a forma de conídios são caracteres mais importantes que tamanho e forma de apressórios, principalmente para as espécies do complexo *C. gloeosporioides*.

O formato predominante foi o arredondado/globoso, seguido dos formatos levemente lobado e lobado, respectivamente.

Tabela 4 - Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura) e formato de apressórios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose

(Continua)

Isolado	Tamanho (µm)						Formato (%) ³	
	Comprimento ^{1*}		Largura ^{1*}		Relação C/L ^{2*}		Lobado	Arredondado
C-9	10,0 c	(6,9-13,2)	5,7 c	(3,7-8,4)	1,81 e	(1,15-2,51)	6	34
C-12	10,2 c	(7,5-12,5)	5,5 c	(3,5-8,4)	1,91 d	(1,22-2,86)	12	34
C-13	10,0 c	(7,4-13,2)	5,7 c	(3,6-8,3)	1,81 e	(1,25-2,53)	20	24
C-16	9,9 c	(7,4-13,4)	5,8 c	(3,6-9,7)	1,78 e	(1,09-2,57)	10	32
C-17	9,8 c	(6,8-14,2)	5,7 c	(3,5-8,6)	5,69 a	(3,50-8,60)	12	28
C-18	9,6 d	(7,4-11,4)	5,5 c	(2,3-7,8)	1,84 d	(1,14-4,04)	6	34
C-19	9,3 d	(5,7-11,7)	4,9 d	(2,2-7,4)	2,04 d	(1,11-4,39)	12	34
C-22	9,8 c	(6,4-13,2)	5,7 c	(3,4-8,5)	1,78 e	(1,05-2,69)	10	38
C-33	9,6 d	(6,3-12,4)	5,7 c	(3,4-8,4)	1,73 e	(1,14-2,43)	14	26
2271	9,6 d	(6,4-13,2)	5,8 c	(3,6-8,4)	1,73 e	(1,10-2,70)	12	30
2346	9,6 d	(6,3-12,5)	5,7 c	(3,7-8,4)	1,73 e	(1,09-2,91)	10	38
2347	9,4 d	(6,4-12,6)	5,8 c	(3,4-8,4)	1,68 f	(1,02-2,93)	12	32
2348	9,7 c	(6,3-13,2)	5,8 c	(3,5-8,6)	1,75 e	(0,98-2,78)	10	30
2349	9,5 d	(5,8-13,4)	5,7 c	(3,4-10,8)	1,72 e	(1,04-2,98)	14	28
2350	8,8 d	(5,8-12,5)	5,3 c	(3,7-8,5)	1,69 e	(1,10-2,65)	14	30
2351	9,7 c	(6,8-13,7)	5,1 d	(3,6-8,5)	5,42 a	(4,20-8,50)	12	24
2352	9,2 d	(5,4-12,5)	5,3 c	(3,7-7,5)	1,78 e	(1,09-2,72)	16	22
2353	9,7 c	(6,3-14,2)	5,7 c	(3,6-8,6)	1,74 e	(1,09-2,80)	18	24
2354	9,0 d	(5,3-12,5)	5,4 c	(3,6-7,8)	1,69 e	(1,03-2,34)	22	22
2355	9,9 c	(6,9-12,6)	5,4 c	(3,6-9,4)	1,89 d	(0,97-2,56)	22	24
2356	9,2 d	(6,2-12,5)	5,9 c	(4,2-9,5)	1,60 f	(0,78-2,43)	12	30
2361	8,8 d	(5,3-11,4)	5,8 c	(2,5-11,4)	1,60 f	(0,98-3,28)	12	32
2365	9,8 c	(6,4-12,5)	6,1 b	(4,3-11,4)	1,67 f	(0,84-2,38)	14	28
2380	8,8 d	(6,2-12,3)	5,2 d	(2,2-9,2)	1,84 d	(1,13-4,64)	12	28
2408	9,6 d	(6,2-13,2)	6,7 a	(4,8-9,2)	1,45 g	(0,93-2,02)	0	88
2416	9,4 d	(6,0-12,7)	6,3 c	(4,7-7,9)	1,51 g	(1,15-2,21)	0	86
2417	11,8 b	(7,0-15,2)	5,1 d	(3,8-7,4)	2,45 c	(1,32-3,10)	0	76
2418	9,4 d	(5,8-19,1)	6,2 c	(3,7-8,5)	1,51 g	(1,12-2,58)	0	78
2419	9,8 c	(6,8-13,5)	6,7 a	(4,8-9,2)	1,46 g	(1,21-1,86)	0	82

Tabela 4 - Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura) e formato de apressórios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose

(Continua)

Isolado	Tamanho (µm)						Formato (%) ³		
	Comprimento ^{1*}		Largura ^{1*}		Relação C/L ^{2*}		Lobado	Levemente Lobado	Arredondado
2420	9,5 d	(6,7–13,6)	6,5 a	(4,5–8,9)	1,46 g	(1,13–1,78)	0	68	32
2505	9,9 c	(6,4–14,2)	5,6 c	(4,3–7,4)	1,77 e	(1,25–2,38)	12	30	58
2506	10,0 c	(7,5–12,5)	5,7 c	(3,6–8,4)	1,81 e	(1,15–2,61)	10	36	54
2507	9,8 c	(7,3–13,2)	5,7 c	(3,7–8,5)	1,76 e	(1,17–2,55)	8	32	60
2508	9,8 c	(6,8–13,2)	6,1 b	(3,7–9,7)	1,68 f	(1,06–2,54)	10	32	58
2509	9,7 c	(6,4–13,2)	6,2 b	(3,8–9,3)	1,62 f	(0,97–2,40)	10	36	54
2510	9,5 d	(7,2–13,2)	5,8 c	(3,6–8,4)	1,69 e	(1,12–2,36)	10	30	60
2511	9,6 d	(6,8–12,6)	6,2 b	(3,7–9,5)	1,62 f	(0,80–2,56)	8	40	52
2512	9,6 d	(7,4–13,2)	5,6 c	(3,6–8,4)	1,76 e	(1,17–2,57)	12	24	64
2513	9,6 d	(6,4–13,2)	5,6 c	(3,6–9,7)	1,77 e	(1,02–2,57)	14	36	50
2514	9,7 c	(5,8–13,2)	5,9 c	(4,2–8,4)	1,69 e	(0,92–2,67)	6	26	68
2515	9,6 d	(6,9–13,2)	5,9 c	(3,6–8,4)	1,67 f	(1,00–2,87)	8	32	60
2516	9,6 d	(7,3–13,2)	5,6 c	(3,6–8,7)	1,76 e	(0,97–2,63)	10	36	54
2517	9,7 c	(7,3–13,2)	5,7 c	(3,5–8,3)	1,73 e	(1,16–2,50)	18	24	58
2518	9,6 d	(7,4–12,3)	5,8 c	(3,7–8,4)	1,71 e	(1,13–2,54)	12	32	56
2519	9,4 d	(7,3–12,6)	5,7 c	(3,6–7,4)	1,68 f	(1,00–2,40)	10	30	60
2520	9,8 c	(7,4–12,5)	5,6 c	(3,7–8,4)	1,79 e	(1,17–2,45)	14	30	56
2521	9,7 c	(7,4–12,4)	5,7 c	(3,7–8,4)	1,78 e	(1,25–2,84)	12	28	60
2522	9,4 d	(6,3–13,2)	5,9 c	(3,8–9,5)	1,65 f	(0,78–2,42)	12	34	54
2523	9,4 d	(7,3–12,5)	5,8 c	(4,3–8,5)	1,66 f	(1,16–2,72)	12	32	56
2524	9,4 d	(6,3–13,2)	5,5 c	(3,5–8,5)	1,74 e	(1,03–2,69)	74	26	0
2538	9,5 d	(5,9–13,2)	6,3 b	(3,8–8,5)	1,52 g	(1,13–2,00)	84	16	0
2539	9,6 d	(6,6–12,6)	6,3 b	(3,9–8,6)	1,53 g	(1,22–2,04)	76	18	6
2540	9,8 c	(6,7–13,6)	6,3 b	(3,9–8,7)	1,58 f	(1,22–2,10)	60	38	2
2541	9,8 c	(6,8–13,6)	6,2 b	(3,9–8,4)	1,60 f	(1,31–2,15)	78	8	14
2542	9,9 c	(7,4–13,7)	6,3 b	(4,7–8,3)	1,58 f	(1,30–2,02)	52	36	12
2543	9,9 c	(6,8–13,4)	6,1 b	(3,8–8,4)	1,63 f	(1,30–2,00)	62	30	8
2544	9,6 d	(6,7–13,5)	5,9 c	(3,9–8,6)	1,64 f	(1,37–2,13)	14	32	54
2545	9,4 d	(6,4–13,5)	5,4 c	(3,5–10,5)	1,78 e	(0,82–2,53)	74	18	8

Tabela 4 - Características morfológicas de tamanho (comprimento, largura e relação comprimento/largura) e formato de apressórios (porcentagem de cada classe) de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de guaranazeiro, com sintomas de antracnose

(Continua)

Isolado	Tamanho (µm)						Formato (%) ³	
	Comprimento ^{1*}		Largura ^{1*}		Relação C/L ^{2*}		Lobado	Levemente Lobado
2546	10,1 c	(7,4–14,2)	6,2 b	(4,2–9,6)	1,64 f	(0,90–2,19)	60	32
2547	10,2 c	(7,3–14,1)	5,8 c	(3,9–9,2)	1,79 e	(1,48–2,50)	60	30
2548	10,2 c	(7,2–14,2)	5,9 c	(3,8–8,6)	1,78 e	(1,27–2,50)	68	22
2550	10,3 c	(7,3–14,2)	5,5 c	(3,8–8,4)	1,89 d	(1,34–2,67)	0	76
2552	13,5 a	(10,5–16,2)	4,6 d	(3,8–5,3)	2,94 b	(2,33–3,30)	10	38
2554	9,1 d	(5,5–12,3)	5,5 c	(2,2–8,5)	1,75 e	(1,01–4,23)	20	24
2582	9,6 c	(6,8–13,6)	5,7 c	(3,8–9,4)	1,72 e	(1,12–2,50)	20	24
C.V. (%) ⁴	15,73		19,26		21,71			

¹Média de 50 apressórios produzidos pelo método de microcultura, aos 6 dias de cultivo a 25 ± 1 °C e 12 h de fotoperíodo

²Média de 50 valores da relação C/L, calculada pela divisão do comprimento pela largura de apressório de cada isolado

³Distribuição da frequência de formatos de apressórios. Observação em 50 apressórios/isolado

⁴C.V. (%) = Coeficiente de variação

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($P = 0,05$)

2.3.4 Taxa de crescimento micelial diária em função da temperatura

A figura 7 mostra a Taxa de Crescimento Micelial de isolados de *C. guaranicola* em função da temperatura.

Houve interação significativa entre a temperatura e os isolados de *Colletotrichum* spp. para a taxa de crescimento micelial diária (TCMD), sendo que as interações foram todas ajustadas ao modelo de regressão polinomial (equação do segundo grau). A temperatura ótima para as maiores TCMD dos diferentes isolados estudados variou entre 22 e 27 °C. Os isolados C-18 e C-19, apresentaram máximo crescimento às temperaturas de 26,15 e 26,71 °C, respectivamente, obtida pela derivada das equações de regressão, enquanto que os menores valores de temperaturas para as TCMD ótimas foram para os isolados 2419 (22,77 °C) e 2380 (23,41 °C), respectivamente. Um dado interessante foi para o isolado 2589, que apresentou o menor valor estimado de crescimento micelial dentre o conjunto das maiores TCMD dos isolados em estudo, porém, ele se encaixou no grupo daqueles isolados que necessitaram de maiores valores de temperaturas para que ocorressem esses máximos valores de TCMD. Nesse caso, a temperatura ótima estimada para o isolado em questão ficou em torno de 26,14 °C (Tabela 7).

Os isolados de *C. guaranicola* apresentaram variação quanto à temperatura. De uma maneira geral, a temperatura de 25 °C foi a melhor para o crescimento micelial dos isolados testados. Porém, os isolados C-18 e C-19 principalmente o último, requer temperatura acima de 25 °C para crescimento ótimo. Por outro lado, o isolado 2419 (Itacoatiara) encontra melhor crescimento em faixa de temperatura um pouco abaixo de 25° C. De modo geral, a temperatura limite de 35 °C inibiu muito mais o crescimento de todos os isolados que a temperatura de 15 °C (Tabela 7).

Figura 7 – Taxa de crescimento micelial diário (TCMD), ao longo de seis dias, de oito isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose coletadas em áreas de produção de municípios do Estado do Amazonas, Brasil, em relação à temperatura

De acordo com Tozze Júnior (2012), nas análises realizadas com base no crescimento médio das colônias em diferentes faixas de temperatura, foi observada a existência de padrões distintos entre hospedeiros, o que ficou evidente quando o autor comparou a taxa de crescimento das colônias de um mesmo isolado quando cultivadas a 35 °C com as cultivadas a 25 °C.

Em todas as temperaturas, Tozze Júnior (2012) observou grande variabilidade entre isolados, independente do hospedeiro de origem. Porém, quando o autor

considerou apenas o crescimento das colônias sob as diferentes temperaturas, notou que todos os isolados, independente do hospedeiro ou região de origem, tiveram melhor crescimento entre 20 e 30 °C, faixa adequada para o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* (SANGEETHA; RAWAL, 2009). No presente estudo, a temperatura ótima para as maiores TCMD dos diferentes isolados de *C. guaranicola* variou entre 22 e 27 °C, portanto, dentro da faixa de crescimento ótimo para *C. gloeosporioides*. Poltronieri (2012), trabalhando com 4 isolados de *C. gloeosporioides* de juçara (*Euterpe edulis*), encontrou maiores índices de velocidade de crescimento micelial na faixa de temperatura de 28 °C, seguida pela temperatura de 25 °C. Dados semelhantes também foram encontrados por Dias et al. (2005), que relataram temperatura ótima para crescimento micelial de *C. gloeosporioides* de frutos de café variando de 22 a 28 °C. Batista (1983), trabalhando com frutos de manga infectados por *C. gloeosporioides*, relata que a temperatura de 28 °C foi a mais favorável às infecções do patógeno.

Os resultados mostram que o crescimento em diferentes faixas de temperatura pode ser um critério útil na separação de espécie de *Colletotrichum* e, no presente estudo, serviram para confirmar os resultados obtidos por Tozze Júnior (2012) e confirmados pelo sequenciamento e análise filogenética dos isolados da série C. Esses isolados (C-14, C-15, C-16, C-18 e C-19) agruparam no complexo de espécie *C. gloeosporioides*, enquanto os demais agruparam no complexo *C. boninense* (Figura 9), confirmando a variação fisiológica e molecular.

Os isolados C-18 e C-19 apresentaram máximo crescimento às temperaturas de 26,15 e 26,71 °C, como já descrito, enquanto os isolados 2419 (22,77 °C) e 2380 (23,41 °C) apresentaram os menores valores de temperatura para taxa de crescimento micelial diário ótimo, respectivamente. Os resultados estão de acordo com Batista (1983), que relata a temperatura de 28 °C como a mais favorável à infecção de *C. gloeosporioides* em frutos de manga.

2.3.5 Atividade enzimática

Segundo os testes realizados, foi detectada a capacidade de isolados de *C. guaranicola* produzirem diferentes tipos de enzimas que podem atuar durante os processos de infecção e colonização do hospedeiro. Constatou-se ainda uma grande

variação na produção dessas enzimas entre os isolados testados, conforme pode ser visualizado na Tabela 5.

Conforme pode ser visualizado na Tabela 5, nem todos os isolados produziram halo de degradação decorrente da atividade celulolítica das enzimas celulasas. Os isolados 2589 (Urucará) e 2419 (Itacoatiara) destacaram-se dos demais na produção dessa enzima. Os isolados C-18 (Maués) e 2361 (Maués) apresentaram os menores halos de degradação, evidenciando baixa produção de celulasas. Segundo Cavalcanti (2007), a produção de celulasas é importante para fungos fitopatogênicos porque a celulose e a hemicelulose, juntamente com as substâncias pécticas, são componentes estruturais da parede celular vegetal, agindo como barreira física para a colonização do patógeno.

C. guaranicola é um patógeno que ataca somente as folhas do guaranazeiro. Como nas células e tecidos das folhas tem bastante celulose e hemiceluloses, é possível que o patógeno se utilize de enzimas de degradação desses componentes para obter êxito no processo de infecção e colonização do hospedeiro. Nos testes de caracterização patogênica, baseado no diâmetro das lesões, os isolados C-18, juntamente com mais 2 isolados da série C (C-16 e C-18) foram os mais virulentos/agressivos, quando inoculados em clone resistente (BRS Maués) e variedade suscetível (Variedade de semente Andirá). Nesse caso, a virulência do isolado C-18 via produção de celulasas e consequente degradação de celulose e hemicelulose da parede celular não teve confirmação pelo teste de patogenicidade. Os isolados da série C são oriundos do clone BRS-800 e foram coletados na Fazenda Santa Helena, Maués. Os isolados C-18 (Maués) e 2361 (Maués) apresentaram os menores halos de degradação, evidenciando baixa produção de celulasas.

Tozze Júnior (2012) detectou atividade celulolítica para 92 de 93 isolados de manga, abacate e pêssago, classificando os isolados em oito grupos, de acordo com a área do halo decorrente da ação das celulasas. O fato de apenas um isolado entre todos testados não apresentar atividade celulolítica pode revelar o quanto essa enzima é comum entre espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum*, como a espécie que ataca o guaranazeiro.

Tabela 5 - Área do halo de degradação (cm²) da atividade das enzimas amilase, celulase, lacase, lipase, pectinase, proteinase e teste bioquímico de fontes de carbono do tartarato de amônio e ácido cítrico, em meios específicos, de oito isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp., obtidos de folhas de guaranazeiro com sintomas de antracnose coletadas em áreas de produção de municípios do Estado do Amazonas, Brasil

Isolado	Enzimas (área do halo de degradação – cm ²) ^{1*}						Teste bioquímico ²	
	Amilase	Celulase	Lacase	Lipase	Pectinase	Proteinase	Tartarato de amônio	Ácido cítrico
C-18	1,31 c	0,10 b	0,00 c	0,29 d	0,00 d	1,71 bc	+	+
C-19	3,81 a	0,31 ab	0,00 c	0,12 d	0,00 d	1,03 cd	+	+
2361	0,43 d	0,11 b	0,47 a	0,64 cd	0,84 ab	0,75 d	-	-
2380	1,30 c	0,38 ab	0,45 ab	0,98 c	0,67 bc	1,16 bcd	+	-
2419	0,64 d	0,74 a	0,33 ab	2,21 b	0,62 bc	2,72 a	-	-
2512	2,28 b	0,34 ab	0,20 bc	1,29 c	0,96 a	0,88 d	+	-
2554	0,67 d	0,36 ab	0,27 ab	1,12 c	0,00 d	1,46 bcd	-	-
2589	0,60 d	0,79 a	0,23 ab	3,66 a	0,48 c	1,91 ab	+	-
PS-64	-	-	-	-	-	-	+	+
MN-57	-	-	-	-	-	-	+	+
C.V. (%) ³	6,06	11,85	7,61	10,95	6,22	10,26		

¹Médias originais de cinco repetições. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$, sendo que os motivos foram a presença de valores igual a 0 (zero) em algumas repetições e o C.V. muito alto, quando das análises estatísticas dos dados originais

²Experimento observado aos seis dias. + = capaz de crescer suficientemente no meio mudando a coloração de amarelo para púrpura (alteração do pH); - = incapaz de crescer suficientemente no meio (crescimento fraco) e não promove qualquer mudança de cor

³C.V. (%) = Coeficiente de variação

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P = 0,05$)

Lima Filho et al. (2003) detectaram a produção de celulase por isolados de *C. gloeosporioides* de manga e maracujá, enquanto Pereira observou atividade celulolítica em isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, diferenciando a primeira espécie por produzir maior atividade celulolítica que *C. gloeosporioides*.

Todos os isolados testados mostraram atividade proteolítica, destacando-se o isolado 2419 com o maior halo de degradação. É possível também que a atividade proteolítica esteja ligada à necessidade que o patógeno tem de degradar os tecidos do hospedeiro através da enzima proteinase.

Tozze Júnior (2012) e Pereira (2009) também detectaram atividade proteolítica em isolados de *Colletotrichum* de manga, caju, pêssego e goiaba, destacando-se o isolado AV-11 por promover halo com maior área de degradação. No presente

trabalho, além do isolado 2419, originário do município de Itacoatiara, destacou-se também o isolado 2589, originário de Urucará. O isolado 2589 se destacou na produção de enzimas celulolíticas, por promover halo com maior área de degradação entre todos os isolados testados.

Redman e Rodriguez (2002), relataram a importância das enzimas do grupo proteinases durante o processo de patogênese de *C. coccodes*. Eles descobriram que mutantes do patógeno deficientes na produção de proteinases não foram virulentos.

Em relação à atividade amilolítica, todos os isolados não apresentaram halo de degradação de amido além dos bordos da colônia. Essa atividade ficou restrita a uma pequena área de degradação embaixo da colônia, nunca ultrapassando a sua borda em nenhum dos isolados testados. É possível que o fungo não necessite produzir amilase em grande quantidade porque esse substrato é mais abundante nos frutos do que nas folhas. Mesmo assim, comparando-se a área de degradação embaixo da colônia, foi possível perceber diferenças entre isolados, destacando-se os isolados C-19 e 2512. O isolado C-19, juntamente com mais dois isolados da série C (C-16, C-18) é originário do clone BRS-800 (Fazenda Santa Helena, Maués), destacando-se no teste de patogenicidade como um dos mais virulentos entre todos os isolados testados.

Trabalhando com *Colletotrichum* spp. obtidos de manga, abacate, maracujá e pêssego, Tozze Júnior (2012) constatou que nenhum isolado promoveu halo de degradação no substrato específico para detecção da atividade amilolítica. Esses resultados estão de acordo com os obtidos para atividade amilolítica de *C. guaranicola* e diferentes dos resultados encontrados por Pereira (2009), que constatou atividade amilolítica entre isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* de goiaba, e por Lima Filho et al. (2003), que observaram a produção de amilase para isolados de *C. musae* de banana, e *C. gloeosporioides* de caju, manga e maracujá. Semelhantemente aos resultados obtidos por Tozze Júnior (2012), todos os isolados de *C. guaranicola* cresceram neste substrato, que contém amido como única fonte de carbono, porém não produziram amilases em quantidade suficiente para formação e visualização de halo de degradação, além da área de crescimento da colônia.

Quanto à atividade pectinolítica, todos os isolados apresentaram atividade pectinolítica, evidenciada por grandes halos de degradação da pectina, destacando-se os isolados 2512 (Manaus), 2361 (Maués) 2380 (Manacapuru) e 2419 (Itacoatiara). Os resultados estão de acordo com os encontrados por Tozze Júnior (2012), que

relata a produção de pectinases por todos os isolados de *Colletotrichum* testados, na forma de halo translúcido formado no meio. A pectina faz parte da lamela média que mantém as células unidas e firmes. No caso do tecido foliar, possivelmente *C. guaranicola* produza pectinases para degradar os constituintes da lamela média e facilitar o processo de infecção e colonização do hospedeiro.

Silva et al. (2005), relatam que a enzima pectato liase age na matriz de pectato da parede celular vegetal, em conjunto com outras enzimas pectinolíticas, como a metil-esterases da pectina e as poligalacturonases. Wattad et al., 1997 descrevem o papel dessa enzima durante a patogênese, afirmando que a adição de anticorpos contra pectato liase na superfície de abacate, banana e manga inibiu o desenvolvimento de sintomas da antracnose causada por *C. gloeosporioides*.

Os resultados dos testes bioquímicos estão apresentados na Tabela 5, indicando que 5 isolados de *C. guaranicola* foram capazes de utilizar completamente tartarato de amônio como fonte de carbono. Nesse resultado, podemos incluir também as duas espécies de *Colletotrichum* que serviram de *outgroup*. A exceção para o metabolismo de tartarato de amônio foram para os isolados 2361 e 2554.

Quanto à utilização de ácido cítrico, os isolados C-18 e C-19 e os *outgroup* PS-64 e MN-57 (originários de pêssego e manga) foram capazes de metabolizar essa fonte exclusiva de carbono. Para os outros isolados, não houve alteração de cor nesta combinação de meio.

Para Waller et al. (1993), a alteração de cor no meio de cultura demonstra que o fungo tem a capacidade metabolizar a fonte de carbono. O teste já foi aplicado com resultados bem satisfatórios em diversos patossistemas, envolvendo espécies do gênero *Colletotrichum*. Recentemente, Santos (2011), ao trabalhar com a antracnose da banana, verificou que 53 isolados (de um total de 60) de *C. musae* foram capazes de utilizar completamente tartarato de amônio. Por outro lado, para o ácido cítrico, todos os isolados, com a exceção de um, que mostrou resultado variável, não foram capazes de metabolizar essa fonte de carbono. Derso e Waller (2003) também observaram que a espécie *C. kahawae*, agente causal do CBD (*Coffee Berry Disease*) em bagas de cafeeiro, não tem capacidade de utilizar essas duas fontes de carbono. A deficiência de *C. kahawae* em metabolizar tartarato de amônio e ácido cítrico como fonte de carbono é utilizada como critério taxonômico para diferenciar essa espécie de outras espécies de *Colletotrichum* que atacam culturas perenes em países tropicais.

Waller et al. (1993) relacionaram, de modo indireto, a incapacidade de *C. kahawae* em metabolizar tartarato de amônio e ácido cítrico com a sua patogenicidade e, diretamente, a uma possível redução de sua habilidade saprofítica. Essa característica de vida saprofítica é típica de fungos facultativos, como *C. guaranicola*, que em determinadas situações podem viver saprofiticamente no hospedeiro.

Os isolados C-18 e C-19 foram os únicos capazes de utilizar tanto o tartarato de amônio quanto o ácido cítrico como fontes de carbono, juntamente com os *outgroup* PS-64 e MN-57, os últimos identificados por Tozze Júnior como pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*. Os isolados de *C. guaranicola* compõem o grupo que na análise filogenética agrupou no complexo *C. gloeosporioides*, formando um subclado muito próximo da espécie de *C. siamense*. Também fazem partes dos isolados que tiveram a mais alta taxa de crescimento micelial diária (TCMD), com ótimo de temperatura acima de 25 °C e maior crescimento a 35 °C. No teste de patogenicidade, esses isolados se mostraram mais virulentos que os demais, quando inoculados no clone resistente BRS Maués e a cultivar suscetível Andirá.

O teste bioquímico da utilização do citrato de amônio e do ácido cítrico como fontes de carbono serviu para confirmar a existência de duas espécies de *C. guaranicola*, uma pertencente ao complexo *C. gloeosporioides* (*C. siamense*), e outra pertencente ao complexo *C. boninense* (*C. petchii*). As diferenças nas características culturais também confirmam a separação entre os dois grupos de isolados encontrados em *C. guaranicola*.

2.3.6 Filogenia

A análise multilocus concatenada resultou numa árvore filogenética composta por 30 isolados de *C. guaranicola*, mais 21 espécies do complexo *C. boninense* e 52 do complexo *C. gloeosporioides*, respectivamente, blastadas do GeneBank CBS/IMI/ICMP para determinação do índice de similaridade. Para as espécies do complexo *C. boninense* foi utilizado como *outgroup* à espécie *C. gloeosporioides* (CBS112999). Para as espécies do complexo *C. gloeosporioides* foi utilizada como *outgroup* a espécie *C. boninense* (MAFF305972).

A Figura 8 mostra que a maioria dos isolados (25) formou um clado separado e distinto dentro das espécies pertencentes ao complexo *C. boninense*, sem contudo

agrupar em nenhuma delas. As espécies mais próximas desse clado foram *C. petchii* (CBS 125957) e *C. nova-zelandiae* (CBS128505).

Figura 8 - Árvore filogenética de inferência Bayesiana de 25 isolados de *C. guaranicola* (vermelho) comparadas com 21 sequências de espécies do complexo *C. boninense* (preto), mais um *outgroup* de *C. gloeosporioides*. A árvore foi reconstruída usando dados particionados de sequências de ITS, GADPH, Actina, Quitina Sintase e Calmodulina. Valores de probabilidade a posteriori Bayesiana são mostrados nos nós

Com base no relacionamento intra-clado, percebe-se que os isolados de *C. guaranicola* apresentam maior proximidade genética com as duas espécies de *C. petchii* do clado (*C. petchii*, CBS 37894 e *C. petchii*, CBS 125957), do complexo *C. boninense*, que apresentaram valores de inferência Bayesiana igual a 1. Na extremidade inferior do clado, os isolados de *C. guaranicola* agruparam próximas à espécie *C. novae-zelandiae* (CBS 128505), porém com valor de inferência Bayesiana de 0,79, bem inferior ao das duas espécies de *C. petchii* situadas na extremidade

superior do clado. A estatística filogenética é importante porque, segundo Weir et al. (2012), quanto maior o valor de inferência Bayesiana, maior será a confiabilidade na topologia do clado e menor a distância de ramificação do nó que estabelecem a relação da distância genética dos isolados com as espécies blastadas. No caso, foram utilizados no blast os isolados extremos dos clados de Weir (2012), o que aumenta a probabilidade de *C. guaranicola* ser uma nova espécie, diferente de todas as espécies de *C. boninense*, porém geneticamente muito próximas de *C. petchii*.

Com base nesse resultado pode-se afirmar que esse grupo de espécies de *C. guaranicola* não possui relacionamento evolucionário com as espécies do complexo *C. gloeosporioides*, porém estão evolucionariamente bem próximas das espécies do complexo *C. boninense*.

Caracteres morfo-fisiológicos e culturais como velocidade de crescimento e coloração da colônia mostram que essas espécies são bem distintas de *C. gloeosporioides* e mais próximas de *C. boninense*. Nos ensaios de temperaturas, os isolados que agruparam no clado do complexo *C. boninense* apresentaram média de crescimento ótimo em torno de 25 °C, enquanto os isolados C-18 e C-19, que se agruparam dentro do clado do complexo *C. gloeosporioides*, apresentam crescimento ótimo acima de 25 °C e menor sensibilidade à temperatura de 35 °C.

No caso, características morfológicas como dimensão e forma de conídios e apressórios não se mostraram eficiente para separação de espécies, uma vez que há sobreposição no comprimento e largura dessas estruturas em relação às espécies cilíndricas descritas por Sutton (1988; 1992).

Figura 9- Árvore filogenética de inferência Bayesiana de cinco isolados de *C. guaranicola* (vermelho) comparadas com 52 sequências de espécies do complexo *C. gloeosporioides* (preto) mais um *outgroup* de *C. boninense*. A árvore foi reconstruída usando dados particionados de sequências de ITS, GADPH, Actina, Quitina Sintase e Calmodulina. Valores de probabilidade a posteriori Bayesiana são mostrados nos nós

A Figura 9 mostra os isolados C-14, C-15, C-16, C-18 e C-19 formando um clado monofilético dentro do complexo de espécies de *C. gloeosporioides*, sem contudo agrupar em nenhuma delas. Isso mostra que esses isolados de *C. guaranicola* estão evolucionariamente muito próximos de *C. gloeosporioides* e

totalmente fora do complexo *C. boninense*, uma vez que *C. boninense* (MAFF305972) foi utilizada como *outgroup*.

Portanto, os cinco isolados de *C. guaranicola* formaram um clado separado porém muito próximo das espécies de *C. siamense*, pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*. Os isolados analisados agruparam todos em um subclado dentro do clado contendo as espécies de *C. siamense*. Dentro deste subclado, reunindo os cinco isolados de *C. guaranicola* e mais oito espécies de *C. siamense*, ainda foi possível separar mais três grupos geneticamente distintos, quanto à distância filogenética de *C. guaranicola*. O primeiro grupo, formado pelas espécies *C. siamense* (ICMP17785), *C. siamense* (ICMP18569) e *C. siamense* (ICMP17795), é o mais próximo dos isolados de *C. guaranicola*, com ramo suportado por valor de inferência Bayesiana de 0,99 (Figura 9). No segundo grupo do subclado agruparam-se as espécies *C. siamense* (ICMP18569), *C. siamense* (ICMP17795), *C. siamense* (1857) e *C. siamense* (CBS125378), também muito próximo de *C. guaranicola*, porém suportado por valor de inferência Bayesiana mais fraco (0,87). Um terceiro grupo, formado por *C. siamense* (ICMP18570, CBS125378, ICMP18739 e ICMP18578), também agruparam muito próximo de *C. guaranicola*, porém apoiado em valor de inferência Bayesiana mais forte (0,93). *C. siamense* (CBS125378) e *C. siamense* (CBS130420) são as espécies mais próximas do terceiro grupo de *C. siamense*, com valor de inferência Bayesiana de 0,57, o menor valor de inferência Bayesiana entre os três grupos do subclado. No ramo superior do clado e filogeneticamente mais distante de *C. guaranicola* encontra-se a espécie *C. horii* (ICMP 10492 e ICMP 12942).

De acordo com Bragança (2013), a espécie *C. siamense*, pertencente ao complexo *C. gloeosporioides*, foi a mais variável geneticamente e quanto ao hospedeiro de origem.

Os valores de inferência Bayesiana estabelecem o grau de confiabilidade da topologia do clado e também as distâncias filogenéticas da árvore.

Considerando que os isolados de *C. guaranicola* agrupados nesse subclado estão fora das espécies do complexo *C. boninense* (utilizada como *outgroup*); considerando ainda que os genes utilizados na análise filogenética de *C. guaranicola* separam bem as espécies do complexo *C. gloeosporioides*; considerando ainda que esses genes separam bem as espécies de *C. siamense* descritas no subclado do primeiro grupo; considerando ainda que na análise filogenética dos isolados de *C. guaranicola* foram utilizados os isolados mais extremos do subclado que delimita *C.*

siamense, estabelecido por Weir et al. (2012); pode-se afirmar que os isolados de *C. guaranicola* agrupados no complexo *C. gloeosporioides*, pertencem a uma nova espécie de *C. guaranicola*, filogeneticamente muito próxima das três espécies de *C. siamense*, descritas no primeiro grupo do subclado (*C. siamense* (ICMP17785), *C. siamense* (ICMP18569) e *C. siamense* (ICMP17795)).

Os resultados obtidos pela análise filogenética também estão de acordo com as caracterizações culturais, morfológicas e patogênicas realizadas, que indicaram haver diferenças nas populações de *C. guaranicola* procedentes da Fazenda Santa Helena (Clone BRS-800, de Maués), representados pelos isolados C-14, C-15, C-16, C-18 e C-19, em relação aos isolados coletados nos outros municípios (Manaus, Boa Vista do Ramos, Itacoatiara, Presidente Figueiredo), inclusive Maués, porém fora dos limites da Fazenda Santa Helena, que agruparam no clado do complexo *C. boninense*. Entre essas diferenças, podem ser destacadas a maior velocidade de crescimento, características culturais semelhantes a *C. gloeosporioides*, menor sensibilidade à temperatura de 35 °C e maior virulência em termos de diâmetro das lesões (C-16, C-18 e C-19), quando comparado aos isolados agrupados no clado do complexo *C. boninense*.

Com base nessas informações, pode-se afirmar que os isolados procedentes de Maués e coletados na Fazenda Santa Helena se constituem em população geneticamente diferente daquela de outros locais de coleta, apresentando diversidade genética de origem.

De acordo com Pereira (2009), a taxa de crescimento micelial é um dos caracteres mais confiáveis na identificação de espécies de *Colletotrichum*. No caso, a taxa de crescimento micelial dos cinco isolados analisados é bem superior às das 21 que agruparam dentro do complexo *C. boninense*, com taxa de crescimento micelial sempre superior a 10 mm/dia, tal como ocorre com as espécies de *C. gloeosporioides* descritas por Sutton (1992). Por outro lado, o critério da morfologia de conídios e apressórios não se mostrou eficiente para separação de espécies dentro do gênero, uma vez que comprimento e largura de conídios e apressórios sempre se sobrepõem. Os isolados com estas características foram coletados na Fazenda Santa Helena, no município de Maués-AM e todos são originários do Clone BRS-800 (Ambev).

2.3.7 Caracterização patogênica

Os resultados do teste de patogenicidade são apresentados na Tabela 6. Não houve interação entre as duas origens de propagação da planta, por isso, a análise estatística foi realizada separadamente. Os dados de severidade, com base no diâmetro da lesão às 168 h após a inoculação, mostram que os isolados C-18, C-19 e C-16, de Maués apresentaram as maiores médias de diâmetro de lesão, porém não diferiram estatisticamente dos outros isolados, em relação ao genótipo suscetível proveniente de semente (Variedade Andirá).

Os genótipos testados mostraram reação de sensibilidade diferenciada aos isolados inoculados. Por outro lado, os isolados mostraram grande variação na virulência, com base no diâmetro da lesão, quando inoculados nos dois genótipos, conforme os resultados apresentados na Tabela 6. Não houve diferença significativa entre os isolados testados quanto à severidade final, em relação ao genótipo da variedade suscetível (variedade Andirá, procedente de semente). Os isolados C-18 e C-19 apresentaram maior severidade de doença (foram mais virulentos, quanto aos genótipos testados), respectivamente, não diferindo entre si quanto ao diâmetro das lesões dos genótipos testados, em relação à reação dos genótipos testados, enquanto o isolado 2512 apresentou a menor severidade (foi o menos virulento). Os isolados C-18 e 2512 apresentaram a maior e a menor severidade (revelaram a maior e a menor virulência), respectivamente, em relação aos dois genótipos testados.

Em relação à taxa de progresso da doença, houve resposta diferencial quanto aos isolados e os genótipos testados. O clone BRS Maués não apresentou diferença significativa quando inoculados com os isolados testados, enquanto que a variedade suscetível Andirá (semente), revelou reação diferencial de virulência quanto aos isolados testados. Quando inoculado no genótipo suscetível originário de semente, o isolado C-16 apresentou diferença significativa em relação aos isolados C-18 e C-19, mas não diferiu dos demais isolados, ao nível de 5% de probabilidade.

Os isolados C-16 e 2361 apresentaram as maiores taxas de progresso da doença (r) quando inoculados nos dois genótipos testados. Já os isolados C-16 e C-19 revelaram a maior e a menor taxa de progresso da doença (r) em relação ao genótipo suscetível originário de semente, diferindo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade dos demais isolados, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação à AACPD, o isolado C-18 foi superior aos demais isolados, independente dos genótipos testados, porém, não diferiu estatisticamente dos isolados C-16, C-19, 2343 e 2552. O isolado 2523, porém, também diferiu estatisticamente do isolado C-18, apenas em relação ao clone resistente BRS Maués.

Inúmeros clones resistentes à antracnose do guaranazeiro e plantados por produtores do Amazonas foram lançados pela Embrapa Amazônia Ocidental, com sede em Manaus. Entre eles os da série BRS, como BRS Amazonas, BRS Maués e BRS Luzéia, etc.

Outros clones resistentes foram desenvolvidos pela Ambev (Bebidas da Amazônia S/A), cuja área experimental ocupa vasta área da Fazenda Santa Helena, no município de Maués. Esses clones tendem a perder rapidamente a resistência em função da alta variabilidade genética do fungo e do cultivo inadequado que exerce pressão de seleção de variantes resistentes do patógeno (BENTES; COSTA NETO, 2011). De fato, estudos com *C. guaranicola* revelam que o patógeno possui uma ampla base genética (DUARTE et al., 1995; VÉRAS et al., 1997; BENTES; GASPAROTTO, 1999), que pode diminuir a durabilidade da resistência dos clones de guaranazeiro em campo, devido à seleção de variantes do fungo capazes de superar a resistência hospedeira.

Bentes e Matsuoka (2002) inocularam sete clones de diferentes níveis de resistência com discos de cultura de três isolados de *C. guaranicola* procedentes do Amazonas (Itacoatiara e Manaus) e de Mato-Grosso. Utilizaram nos estudos os clones 224, 368, 514, 619, 620, 626 e 628, procedentes do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental. Os resultados indicaram que os isolados testados infectaram diferentes clones, e apresentaram variação quanto à patogenicidade. A virulência, avaliada pelo diâmetro da lesão, está de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho. No trabalho de Bentes e Matsuoka (2002), os isolados de *C. guaranicola* não diferiram em sua virulência quando inoculados nos clones 368, 626 e 514. Porém, para o clone 620, os isolados ISO-1 e ISO-F foram os mais virulentos, tendo apresentado o maior diâmetro de lesões. Já para os clones 224 e 619, o isolado ISO-F foi o mais virulento, diferindo estatisticamente dos demais. No presente trabalho, os isolados C-18, C-19 e 2552 foram os mais virulentos, tendo apresentado o maior diâmetro de lesões quando inoculados no Clone BRS Maués, diferindo estatisticamente dos demais. Já os isolados C-16, C-18 e C-19 foram os virulentos, tendo apresentado o maior diâmetro de lesões quando inoculado na

variedade suscetível originária de semente (Andirá), diferindo estatisticamente do demais.

Os isolados da série C (C-16, C-18 e C-19) são originários do Clone 800, e foram coletados na Fazenda Santa Helena, no município de Maués. O isolado 2552 tem origem no Clone 608, coletado no município de Presidente Figueiredo-AM. Os isolados da série C apresentaram características culturais e morfológicas diferentes dos demais isolados, apresentando as maiores taxas de crescimento entre todos os isolados testados. Diferiram também quanto à filogenia, formando um clado separado dos demais, agrupando dentro do complexo *C.gloeosporioides*, enquanto os demais agruparam dentro do complexo *C. boninense*, formando outro clado separado. As variações morfoculturais e filogenéticas dos isolados C-16, C-18 e C-19 em relação aos demais podem explicar sua maior virulência, avaliado pelos maiores diâmetros de lesões. Portanto, o presente trabalho está de acordo com os resultados de Bentes e Matsuoka (2002), quanto à variabilidade na virulência dos isolados testados neste experimento.

Abaixo, a Figura 10 mostra a prancha com a escala de notas elaborada para este trabalho.

Figura 10- Figura de uma Escala Descritiva para os diversos tipos de lesão (folha do clone BRS Maués inoculada com o isolado C-18). A. Sem lesão; B. Amarelecimento abaixo da área do disco; C. Pontos necróticos na área foliar abaixo do disco; D. Lesão necrótica definitiva e restrita à área do disco; e, E. Lesão necrótica definida além da área do disco

Tabela 6- Severidade final (em cm), taxa de progresso da doença (r), Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em folhas de guaranazeiro inoculadas com disco de micélio contendo estruturas do patógeno *Colletotrichum guaranicola*

Isolado	Severidade Final (cm) ¹		Taxa de Progresso da Doença (r) ¹		AACPD ¹	
	Semente	Clone	Semente	Clone	Semente	Clone
C-16	3,75 a*	1,71 ab**	0,40 a**	0,27 a ^{ns}	11,646 ab**	5,400 ab**
C-18	4,19 a	3,77 a	0,22 bc	0,21 a	14,300 a	12,629 a
C-19	4,08 a	3,48 ab	0,19 c	0,27 a	13,746 a	11,213 ab
2343	2,74 a	1,56 b	0,29 abc	0,32 a	7,992 ab	4,579 b
2361	2,06 a	1,54 b	0,35 abc	0,37 a	5,946 b	3,900 b
2512	1,88 a	1,38 b	0,33 abc	0,29 a	5,296 b	4,096 b
2523	2,34 a	1,67 ab	0,36 ab	0,33 a	6,567 ab	5,192 ab
2552	2,36 a	2,47 ab	0,27 abc	0,25 a	7,225 ab	8,079 ab
C.V. (%) ²	13,73	13,51	3,80	4,36	14,78	17,35

¹Médias originais de três repetições. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$, sendo que o motivo foi o C.V. muito alto, quando das análises estatísticas dos dados originais

²C.V. (%) = Coeficiente de variação

**significativo ao nível de 1% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,01$)

*significativo ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey ($0,01 \leq p < 0,05$)

^{ns}não significativo ($p \geq 0,05$)

3 CONCLUSÕES

- As características culturais, a taxa de crescimento micelial e a atividade enzimática apresentaram alta variabilidade entre os isolados, não se constituindo em caracteres confiáveis para agrupar os isolados em categorias intra e inter-específicas. A morfometria de conídios e apressórios dos isolados não se revelou um caráter útil na delimitação de táxon em nível intra-específico, devido à sobreposição de tamanho como comprimento, largura e relação comprimento/largura.
- A análise filogenética dos isolados de *C.*
- A análise filogenética dos isolados permitiu separar os isolados em dois grupos distintos: um agrupou no complexo de espécie *C. boninense*, próximo a *C. petchii* e o outro agrupou no complexo *C. gloeosporioides*, próximo a *C. siamense*;
- Os isolados variaram quanto à patogenicidade quando inoculados em genótipos resistente e suscetível. Os mais virulentos foram C-16, C-18 e C-19.

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.
- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003.
- ALBUQUERQUE, F.C. **Antracnose do guaraná**. Belém: Instituto Agronômico do Norte, 1960. 37p. (Instituto Agronômico do Norte. Boletim Técnico, 40).
- ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21–31, 2007.
- AYERS, S.H.; RUPP, P.; JOHNSON JUNIOR, W.T. **A study of the alkali-forming bacteria found in milk**. Washington:United States Department of Agriculture, 1919. 39 p. (United States Department of Agriculture. Bulletin, 782).
- AZEVEDO, J.L. Microorganismo endofíticos. In: MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p.117-137.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388p.
- BATISTA, M.F. **Doenças do Guaranazeiro**. M.A./EMBRAPAUEPAE-Manaus, ago.. 1983. 27p.(Circular Técnico, 9).
- BENTES, J.L.S.; BARRETO, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 1, p. 129-131, 2004.
- BENTES, J.L.S.; COSTA NETO, P.Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 41, n. 2, p. 251-256, 2011.
- BRIDGE, P.D. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *Fasciculata*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 131, n. 8, p. 1887–1895, 1985.
- BRIDGE, P.D.; WALLER, J.M.; DAVIES, D.; BUDDIE, A.G. Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 5, p. 274–280, 2008.ON, R.J; CATEN, C.E;

HOLLOMON, D.W.; BAILEY, J.A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J.; (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford, UK: CAB International, 1992. p 27–46.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E. H.C.; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 183–204, 2009.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532p.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. **Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* Systematics**. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). *Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 1-19.

CANTINO, D.C.; KEVIN, K. 2010. **International Code of Phylogenetic Nomenclature**. Version 4c. Athens, Ohio. Disponível em: <http://www.ohio.edu/phylocode/PhyloCode4c.pdf>. Acesso em: 18 nov 2013.

COSTA, F.M. **Curvas de progresso de doenças foliares do milho, sob diferentes tratamentos fungicidas**. 2007. 49p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

COX, M.L.; IRWIN, A.G. Conidium and apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**, Collingwood, v. 1, n. 2, p. 139–149, 1988.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUTENBERG, J.H.C.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B. S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 1–36, 2012(a).

DAMM, U.; CANNON P.F.; WOUTENBERG J.H.C.; CROUS P.W. (2012b): The *Colletotrichum acutatum* species complex **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 37–113. 2012(b).

DERSO, E.; WALLER, J.M. Variation among *Colletotrichum* isolates from diseased coffee berries in Ethiopia. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 561–565, 2003.

DODD, J.C. ESTRADA, A.; JEGER, J.J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in tropics. In: BAILAY, J.A. JEGER, M.J. (Eds.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: ACB International, 1992. p.308-325.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C. Fisiologia de *Colletotrichum guaranicola*: efeito de meios de cultura e regimes de luz na esporulação. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém. **Resumos...** Belém: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido, 1984. p. 281 (EMBRAPA CPATU. Documentos, 31).

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

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

GAMS, W.; VERKELEY, G.J.M.; CROUS, P.W. Descriptive terms (shapes) and colony characteristics. In: CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. **Fungal Biodiversity**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures–Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, 2009. p. 197. (Centraalbureau voor Schimmelcultures–Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. CBS Laboratory Manual Series, 1).

GUOZHONG, L.; CANNON, P.F.; REID, A.; SIMMONS, C.M. Diversity and molecular relationships of *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 53-63, 2004.

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

HIKISHIMA, M.; CANTIERI, G.M.; GODOY, V.C.; KOGA, J.L.; SILVA, A.J.J. Quantificação de danos e relação entre severidade, medidas de reflectância e produtividade no patossistema ferrugem asiática da soja. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 96–103, 2010.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p. 754-755, 2001.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 147-182, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática produção agrícola**. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 11 jun. 2014.

KRANZ, J. The methodology of comparative epidemiology. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Ed.). **Experimental techines in plant disease epidemiology**. Heidelberg, 1988. p.279–289.

LIMA FILHO, R.M.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.620-625, 2003.

LYNCH, J.M.; SLATER, J.H.; BENNETT, J.A.; HARPER, S.H.T. Cellulose activities of some aerobic micro-organisms isolate from soil. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 127, n. 2, p. 231–236, 1981.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 27, p. 23-27, ago. 2002. Suplemento.

MILÉO, L.J.; SILVA, J.F.; BENTES, J.L.S.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no Estado do Amazonas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 771-782, 2007.

MILLS, P.R.; HODSON, A.; BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Oxon: CAB International, p. 269–288. 1992.

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

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.S. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

PEREIRA, W.V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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.

PESQUISA PAPESP. São Paulo, 2013. Luzeia, **O superguaraná**. Mensal. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2013/01/069-071_Guarana_203.pdf. Acesso em: 20 fev. 2014.

POLTRONIERI, T.P. de S. **Patogenicidade, efeito da temperatura no desenvolvimento e controle de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causador da antracnose da juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**. 2012. 82p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 1427–1434, 2002.

RODRIGUES, K.F.; O. PETRINI. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: Hyde, K.D. (Ed.). **Biodiversity of tropical micro fungi**, Hong Kong: Hong Kong University Press, 1997. p.57-69

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SACCARDO, P.A. **Chromotaxia seu nomenclator colorum polyglottus additis speciminibus coloratis ad usum botanicorum et zoologorum**. Patavii: Typis Seminarii, 1894. 22p.

SANGEETHA, C.G.; RAWAL, R.D. Temperature requirement of different isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango. **American-eurasian Journal of Scientific Research**, Dubai, v. 4, n. 1, p. 20-25, 2009. Disponível em: <[http://www.idosi.org/aejsr/4\(1\)09/5.pdf](http://www.idosi.org/aejsr/4(1)09/5.pdf)>. Acesso em: 18 maio 2013.

SANTOS, E. S. **Microrganismos promissores para degradação de compostos fenólicos presente em bagaço de cana de açúcar, lodo e águas residuais de agroindústrias sulcroalcoólicas**. 2007. 112p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

SANTOS, P.C.M. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum musae* no Estado de Pernambuco**. 2011. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. 3. ed. Holos: Belém, 2007. 200p.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507–512, 1974.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 8, p. 1183–1186. 1977.

SHARMA, G.; SHENOY, B.D. Multigene sequence-based identification of *Colletotrichum cymbidiicola*, *C. karstii* and *C. phyllanthi* from India. **Czech Mycology**, Brno, v. 65, n. 1, p. 79–88, 2013.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 807-813, 1997.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p.71–78, 2002.

SILVA, E.G.; BORGES, M.F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R.H.; SCHWAN, R.F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 859–865, 2005.

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

SMITH, B.J.; BLACK, L.L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 1, p. 69-76, 1990.

SUDHAUS, W.; REHFELD, K. **Einführung in die phylogenetik und systematik**. Stuttgart: G. Fischer, 1992. 241p.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute. 1980. 696p.

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

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 986-996, 2002.

TAVARES, A.M.; ATROCH, A.L.; NASCIMENTO FILHO, F. M.; PEREIRA, J. C. R.; ARAÚJO, J. C. A.; MORAES, L. A. C.; SANTOS, L. P.; GARCIA, M. V. B.; ARRUDA, M.R.; SOUSA, N.R.; ANGELO, P.C.S. Introdução/Propagação do guaranazeiro/Produção de mudas/Implantação/Tratos culturais/Podas/Colheita/Despoldamento/Torrefação/Comercialização/ Usos/Anexos. In: PEREIRA, J.C.R. (Ed. Tec.). **Cultura do guaranazeiro no Amazonas**. 4. ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. 40p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Sistemas de Produção, 2).

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n.1, p. 71–79, 2006.

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

TOZZE JÚNIOR, H.J. **Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-penetração e**

monocíclicos e controle químico. 2012. 124p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

VÉRAS, S.M.; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisio-morfológica de *Colletotrichum guaranicola* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 2, p. 297-305, 1997.

VERAS, S.M.; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Avaliação isoenzimática de *Colletotrichum guaranicola*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 548–553, 1997.

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases**. 2004. 72p. Thesis (Doctor of Phisiology) - Faculty of Science and Technology, Uppsala Universitet, Upssala, 2004. Disponível em: < www.divaportal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902-1__fulltext.pdf >. Acesso em: 14 jan. 2014.

WALLER, J.M.; BRIDGE, P.D.; BLACK, R.; HAKIZA, G. Characterization of the coffee berry disease pathogens, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. **Mycological Research**, London, v. 97, n. 8, p.989–994, 1993.

WATTAD, C.; KOBILER, D.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.50, p.197-212, 1997.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 115–180, 2012.

WOUDENBERG, J.H.C.; AVESKAMP, M.M.; GRUYTER, J.; SPIERS, A.G.; CROUS, P.W. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. **Persoonia**, Utrecht, v. 22, p. 56–62, Jun. 2009.