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

Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico

Hugo José Tozze Júnior

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

Piracicaba
2012

Hugo José Tozze Júnior
Engenheiro Agrônomo

Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

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

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

Piracicaba
2012

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

Tozze Júnior, Hugo José
Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico / Hugo José Tozze Júnior. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2012.
124 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Abacate 2. Antracnose 3. Controle químico 4. Fungicidas 5. Fungos fitopatogênicos 6. Manga 7. Maracujá 8. Pêssego 9. Pós-colheita I. Título

CDD 632.44
T757a

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

A Ana Carolina Firmino,
A toda minha família,

Pelo incentivo e ensinamentos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior pela orientação e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, da UNESP, Botucatu, por disponibilizar o laboratório para execução dos experimentos;

Ao Dr. Ivan Herman Fischer, Dra. Maria Cecília Arruda e Dra. Ana Carolina Firmino pela contribuição em várias etapas deste trabalho;

Ao Carlos Bragança pelo auxílio no preparo de amostras para o seqüenciamento.

A Ana Raquel Soares pela colaboração com análises estatísticas;

A empresa Jaguacy, pelo fornecimento de abacates;

Aos professores, funcionários e do Setor de Fitopatologia e da biblioteca da ESALQ, pelos ensinamentos;

A todos os amigos do Setor de Fitopatologia, em especial aos colegas do laboratório de micologia: Ananias, Carlos, Carolina, Isabela, Juliana, Maria Eugenia, Paulo, Sérgio e Wagner;

Aos amigos da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, em especial ao Vicente P. Martello, pelo grande incentivo;

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

Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE TABELAS 19
1 INTRODUÇÃO 21
2 DESENVOLVIMENTO 23
2.1 Revisão bibliográfica 23
2.1.1 Importância da abacaticultura 23
2.1.2 Aspectos gerais da antracnose.. 25
2.1.3 Métodos de identificação e caracterização utilizados na taxonomia de *Colletotrichum*..... 27
2.1.4 Aspectos epidemiológicos da antracnose 32
2.1.5 Controle da antracnose do abacateiro 35
2.2 Material e métodos 38
2.2.1 Identificação e quantificação de danos pós-colheita em abacates ‘Fuerte’ e ‘Hass’ em *packinghouse* 38
2.2.2 Caracterização, identificação e análise comparativa de isolados de *Colletotrichum* do abacateiro e outras frutíferas 39
2.2.2.1 Obtenção e preservação dos isolados 39
2.2.2.2 Caracterização cultural 42
2.2.2.3 Caracterização morfológica 43
2.2.2.4 Caracterização molecular 44
2.2.2.4.1 Extração de DNA 44
2.2.2.4.2 Identificação com oligonucleotídeos específicos 44
2.2.2.4.3 Análise da sequência de nucleotídeos das regiões ITS e β-tubulina 46
2.2.2.5 Caracterização patogênica 47
2.2.2.5.1 Agressividade no hospedeiro de origem 47
2.2.2.5.2 Patogenicidade cruzada 48
2.2.2.6 Caracterização enzimática 48
2.2.2.6.1 Atividade da amilase 49
2.2.2.6.2 Atividade da celulase 49

2.2.2.6.3 Atividade da lipase 49
2.2.2.6.4 Atividade da proteinase 50
2.2.2.6.5 Atividade da lacase 50
2.2.2.6.6 Atividade da pectinase 51
2.2.2.6.7 Atividade da catalase 51
2.2.2.6.8 Análises estatísticas 51
2.2.3 Efeito da temperatura e período de molhamento sobre a pré-penetração, infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates 'Hass' e 'Fuerte'. 51
2.2.3.1 Isolado utilizado.. 52
2.2.3.2 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. 52
2.2.3.3 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na infecção e colonização de *C. gloeosporioides* em abacates 'Hass' e 'Fuerte'. 53
2.2.4 Controle da antracnose em abacates com fungicidas e sanitizantes 54
2.3. Resultados e discussão 55
2.3.1 Identificação e quantificação de danos pós-colheita em abacates 'Fuerte' e 'Hass' em *packinghouse* 55
2.3.2 Caracterização, identificação e análise comparativa de isolados de *Colletotrichum* do abacate e outras frutíferas 59
2.3.2.1 Caracterização cultural 59
2.3.2.2 Caracterização morfológica 67
2.3.2.3 Caracterização molecular 74
2.3.2.3.1 Identificação com oligonucleotídeos específicos 74
2.3.2.3.2 Análise da sequência de nucleotídeos das regiões ITS e β-tubulina 78
2.3.2.4 Caracterização patogênica 83
2.3.2.4.1 Agressividade no hospedeiro de origem 83
2.3.2.4.2 Patogenicidade cruzada 86
2.3.2.5 Caracterização enzimática 90
2.3.3 Efeito da temperatura e período de molhamento sobre a pré-penetração infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates 'Hass' e 'Fuerte'.. 97
2.3.3.1 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* 97

2.3.3.2 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates ‘Hass’ e ‘Fuerte’..... 100
2.3.4 Controle da antracnose em abacates com fungicidas e sanitizantes 104
3 CONCLUSÕES 107
REFERÊNCIAS 108

RESUMO

Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico

O Brasil é um dos principais países produtores de abacate. A competitividade do país no comércio internacional desta fruta demanda a minimização de danos pós-colheita, especialmente os causados pela antracnose. Este trabalho objetivou: (i) identificar e quantificar os danos pós-colheita em abacates 'Fuerte' e 'Hass'; (ii) identificar e caracterizar isolados de *Colletotrichum* do abacateiro, comparando-os com isolados de outras frutíferas; (iii) avaliar o efeito de temperatura e período de molhamento sobre a germinação de conídios e formação de apressórios, bem como, sobre a infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates; (iv) avaliar o efeito de fungicidas e sanitizantes no controle da antracnose do abacateiro em pós-colheita. As incidências da antracnose e de outros danos pós-colheita foram avaliadas periodicamente em abacates amostrados em três etapas do beneficiamento em *packinghouse* e revelaram que a antracnose foi a principal doença pós-colheita, com incidências média de 45,7% para o abacate 'Fuerte' e 68,7% para 'Hass'. Identificação, caracterização e análise comparativa foram realizadas para 93 isolados obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego, por meio do aspecto da colônia e taxa de crescimento em diferentes temperaturas, formato e dimensões dos conídios, análise molecular (PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos e análise de sequências de nucleotídeos das regiões ITS e β-tubulina), patogenicidade e atividade enzimática (amilase, catalase, celulase, lacase, lípase, pectinase e proteinase). Todos os isolados de abacate e manga, e alguns isolados de pêssego e maracujá foram identificados como *C. gloeosporioides.* As espécies *C. acutatum* e *C. boninense* foram detectadas em pêssego e maracujá, respectivamente. A análise filogenética associada a algumas características morfo-culturais permitiu a separação das espécies e revelou diferenças intra-específicas entre os isolados de *C. gloeosporioides*, de acordo com o hospedeiro de origem. Os isolados de manga compuseram um grupo distinto dentro da espécie. Entretanto, independente do hospedeiro de origem, as três espécies de *Colletotrichum* promoveram infecções cruzadas nos quatro hospedeiros avaliados, indicando a ausência de especificidade patogênica. Para todas as características avaliadas houve alta variabilidade entre os isolados. Germinação de esporos e formação de apressórios de *C. gloeosporioides* sobre abacates 'Fuerte' incubados a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40ºC com período de molhamento de 3, 6, 12, 24h revelou que o fungo pode explorar ampla faixa de temperatura, germinando e formando apressórios entre 10 e 35ºC, com temperatura ótima de 23,4ºC e 24,0ºC, respectivamente. Aumento no período de molhamento promoveu maiores percentagens de esporos germinados e formação de apressórios. Os efeitos da temperatura (10, 15, 20, 25, 30ºC) e períodos de molhamento (6, 12, 24h) na infecção e colonização por esta espécie foram avaliados em frutos de 'Hass' e 'Fuerte', inoculados com ferimento. Exceto a 10ºC, houve manifestação de sintomas em todas as temperaturas, com maiores lesões e taxas de progresso da doença a 30ºC. Para controle das doenças testou-se tratamento dos frutos por imersão em calda contendo azoxistrobina, cloreto de benzalcônio, dióxido de cloro, Ecolife®, hipoclorito de sódio, imazalil, procloraz e tiabendazol. Dentre esses, procloraz e imazalil foram os mais eficientes.

Palavras-chaves*: Colletotrichum gloeosporioides; Colletotrichum acutatum; Colletotrichum boninense*; Pós-colheita; Abacate; Manga; Maracujá; Pêssego

ABSTRACT

Avocado anthracnose: post-harvest damages, characterization of the causal agent, quantification of prepenetration and monocyclic parameters and chemical control.

Brazil is one of the most important avocado producers in the world. However, to compete in the international avocado business it is necessary reduction of post-harvest damages, especially those caused by anthracnose. This work had the following objectives: (i) to identify and to quantify post-harvest damages in 'Fuerte' and 'Hass' avocados; (ii) to identify and to characterize the avocado isolates of *Colletotrichum*, comparing them with other fruit isolates; (iii) to evaluate the effect of temperature and wetness period in the conidia germination and appressoria formation, as well as in the infection and colonization of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado; (iv) to evaluate the post-harvest control of anthracnose in avocado using fungicides and sanitizers. Both the anthracnose incidence and other post-harvest damages were evaluated periodically using avocado samples collected at three steps in the packinghouse. It was revealed that anthracnose was the major factor of post-harvest damages, with average incidence of 45.7% in 'Fuerte' and 68.7% in 'Hass'. Identification, characterization and comparative analyses were performed with 93 isolates from avocado, mango, passion fruit and peach according to the colony aspect and growth rate in different temperatures, conidia shape and size, molecular analyses (species-specific PCR and sequencing of ITS and β-tubulin genes), pathogenicity and enzymatic activity (amylase, catalase, cellulase, laccase, lipase, pectinase and proteinase). All of the avocado and mango isolates and some isolates from peach and passion fruit were identified as *C. gloeosporioides*. The species *C. acutatum* and *C. boninense* also were indentified in peach and passion fruit, respectively. Phylogenetic analyses performed with some morphological data allowed species differentiation and revealed intra-specific differences between *C. gloeosporioies* according to the original host. Mango isolates were grouped together into the *C. gloesporioides* clade. However, independently of the original host, these three *Colletotrichum* species showed to cross-infect the four evaluated hosts, suggesting lack of pathogenical specificity. There was high variability for all evaluated characteristic. For *C. gloeosporioides*, spores germination and appressoria formation on the surface of 'Fuerte' avocado incubated under 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 ºC and wetness periods of 3, 6, 12 and 24 hours showed that this fungus could explore a wide range of temperature. Germination and appressoria formation were observed between 10 and 35 ºC, with optimal temperatures of 23.4 and 24.0 ºC, respectively. Both the germination and appressoria formation were higher with the increase in the wetness period. The effect of temperature (10, 15, 20, 25, 30 ºC) and the wetness period (6, 12, 24h) were evaluated on the infection and colonization of *C. gloeosporioides* in 'Fuerte' and 'Hass' avocado, which were wound-inoculated. Except at 10 ºC, all tested temperatures led to symptoms expression. The highest disease progress rate and lesion diameter were verified at 30 ºC. Fruit immersion on fungicides solution was tested to control post-harvest diseases using azoxystrobin, benzalkonium chloride, chlorine dioxide, Ecolife, sodium hypochloride, imazalil, procloraz and thiabendazol. Among these fungicides, prochloraz and imazalil were the most efficient in controlling post-harvest diseases in avocado.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides; Colletotrichum acutatum; Colletotrichum boninense*; Post-harvest; Avocado; Mango; Passion fruit; Peach

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomas da antracnose (a), podridão de lasiodiplodia (b), podridão de fusicocum (c) em abacate..... 58

Figura 2 - Progresso da incidência (%) de antracnose em abacates 'Fuerte' (a) e 'Hass' (b) durante 15 dias de armazenamento a 25ºC..... 58

Figura 3 - Aspectos de colônias de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp., cultivadas a 25ºC em meio batata-dextrose-ágar: Colônia branca acinzentada no centro com reverso salmão com massa conidial laranja no centro (a,d), colônia cinza clara com reverso castanho (b,e), colônia cinza com reverso cinza e massas conidiais laranja em anéis concêntricos (c,f)..... 62

Figura 4 - Taxa média de crescimento de colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego sob diferentes temperaturas em meio batata-dextrose-ágar sob fotoperíodo de 12 horas..... 66

Figura 5 - Formatos de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum*: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (4) reto, com constrição (TOZZE JÚNIOR, 2007)..... 67

Figura 6 - Conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum:* (a) retos, hialinos, unicelulares, fusiformes, com ápices afilados (PE-88); (b) retos, hialinos, unicelulares, oblongos e com ápices arredondados (AV-30)..... 70

Figura 7 - Fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos Cc1F1/Cc2R1 (*Colletotrichum* sp.), CaInt2/ITS4 (*C. acutatum*), Col1/ITS4 (desenvolvido para espécie de *Colletotrichum* não identificada que ocorre em frutíferas na Colômbia) e CgINT/ITS4 (*C. gloeosporioides*), observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: Marcador molecular; TUT-137: padrão de *C. acutatum*; Man-76: isolado de manga da Colômbia amplificado pelos oligonucleotídeos Col1/ITS4; AV-01 (abacate); MN-01 (manga); PS-64 e PS-66 (maracujá); PE-72 e PE-73 (pêssego)..... 76

Figura 8 - Árvore filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* utilizando sequências de genes das regiões ITS-5.8S rDNA e β-tubulina de isolados de *Colletotrichum* spp., analisados de forma concatenada. Utilizou-se o método *p-distance* para estimar as distâncias entre as sequências e "bootstrap" (10.000 replicações) para quantificar o erro padrão das estimativas de distância..... 81

Figura 9 - Estimativa da distância genética entre as sequências de genes das regiões ITS-5.8S rDNA e β-tubulina de isolados de *Colletotrichum* spp., analisados de forma concatenada, de acordo com modelo gerado no programa Mega 5.5. (TAMURA et al., 2011)..... 82

Figura 10 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate após sete dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade..... 84

Figura 11 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em manga após sete dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade..... 85

Figura 12 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em maracujá após dez dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade..... 85

Figura 13 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em pêssego após cinco dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade..... 85

Figura 14 - Sintomas causados por *Colletotrichum gloeosporioides* (AV-05), *C. acutatum* (PE-83) e *C. boninense* (PS-64) em abacate 'Fuerte'..... 88

Figura 15 - Decomposição do peróxido de hidrogênio em placas de Petri com colônias de *Colletotrichum* cultivadas em meio a 25 ºC, sob fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias em meio batata-dextrose-ágar: (a) baixa atividade da catalase (pouco borbulhamento de gás na solução, indicado pela seta); (b) alta atividade da catalase (borbulhamento de gás intenso na solução em toda a placa)..... 96

Figura 16 - Halos promovidos pela atividade *in vitro* da celulase (a), lípase (b), lacase (c), proteinase (d) e pectinase (e) de isolados de *Colletotrichum* spp. de frutíferas cultivados em substrato sólido específico..... 96

Figura 17 - Superfície de resposta da germinação (%) de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Fuerte', em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,001043)*((T-(4,11959)) ^ (2,54203)) * (((40,0006)-T) ^ (2,18824))) * ((0,117833) * (1-(2,90061) * EXP((0,39454)* M))), onde Z é a percentagem de conídios germinados, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento (experimentos realizados simultaneamente)..... 99

Figura 18 - Superfície de resposta de formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides* sobre abacate 'Fuerte' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação (ii) Z=((0,0000787)*((T-(4,16538))^(3,36691))*(((40,0)-T)^(2,70413)))*((0,032341)*(1-(2,38677) * EXP(-(0,292395)*M))) onde Z é a percentagem de conídios com apressórios, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento..... 99

Figura 19 - Incidência de antracnose em abacates 'Fuerte' (a) e 'Hass' (b) inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* e incubados sob diferentes temperaturas..... 102

Figura 20 - Superfície de resposta do diâmetro das lesões de antracnose após 12 dias da inoculação de um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Fuerte' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((1,36398)*((T-(9,9994))^(1,514))*(((35,5719)T)^(0,507149))) *((0,69494)*(1-(0,777153)*EXP(-(0,0000694)*M))) onde Z é o diâmetro da lesão, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento..... 102

Figura 21 - Superfície de resposta do diâmetro das lesões de antracnose após 12 dias da inoculação de um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Hass' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,274028)*((T-(9,9999))^(1,60253))*(((34,6397)-T)^(0,532106)))* ((0,511157)*(1-(0,262566)*EXP(-(0,924801)*M))) onde Z é o diâmetro das lesões, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento..... 103

Figura 22 - Superfície de resposta da taxa de progresso das lesões promovidas por *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Fuerte' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,54293)*((T-(9,99943))^(1,19829))*(((35,262)-T)^(0,357384)))*((0,20823)*(1-(0,02623) * EXP(-(0,899807)*M))) onde Z é a taxa de progresso da lesão, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento..... 103

Figura 23- Superfície de resposta da taxa de progresso das lesões promovidas por *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Hass' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,290072)*((T-(9,99926))^(1,23527))*(((34,7453)-T)^(0,371775)))*((0,29973)*(1-(0,38769) *EXP(-(1,59277)*M))) onde Z é a taxa de progresso da lesão, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Denominação, hospedeiro, variedade, município de origem e ano de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de antracnose..... 40

Tabela 2 - Incidência (%) de doenças pós-colheita em abacates 'Fuerte' e 'Hass' oriundos de diferentes etapas do beneficiamento em *packinghouse* após 15 dias de armazenamento a 25ºC..... 57

Tabela 3 - Incidência (%) de injúrias em abacates 'Fuerte' e 'Hass', antes e após o beneficiamento em *packinghouse*..... 59

Tabela 4 - Características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. de abacate, manga, maracujá e pêssego: Taxa de crescimento de colônias cultivadas em meio batata-dextrose-ágar sob fotoperíodo de 12 horas em diferentes temperaturas, cor predominante da colônia e presença de massas de conídios..... 63

Tabela 5 - Dimensões e formatos de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego..... 70

Tabela 6 - Dimensões médias de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego..... 73

Tabela 7 - Identificação de isolados de *Colletotrichum* obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego em reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos..... 77

Tabela 8 - Isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados para a análise filogenética..... 80

Tabela 9 - Diâmetro das lesões de antracnose em frutos feridos de diferentes hospedeiros após sete dias da inoculação com discos de batata-dextrose-ágar contendo estruturas de isolados de *Colletotrichum* spp..... 87

Tabela 10 - Diâmetro das lesões de antracnose em frutos feridos de diferentes hospedeiros após sete dias da inoculação com suspensão de conídios (10^5 conídios/mL) de isolados de *Colletotrichum* spp..... 88

Tabela 11 - Área do halo de degradação (cm^2) resultante da atividade das enzimas celulase, lacase, lipase, pectinase e proteinase e atividade da enzima catalase produzidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em meios de cultura específicos..... 93

Tabela 12 - Efeito de produtos na incidência (%) da antracnose em abacate 'Hass', após diferentes períodos do tratamento pós-colheita..... 106

1 INTRODUÇÃO

O abacate é amplamente consumido em todo mundo, sendo produzido em quase todas as regiões tropicais e subtropicais (TEIXEIRA, 1991). O Brasil é um dos maiores produtores desta fruta e São Paulo é o principal Estado produtor do país (FAO, 2011; IBGE, 2010).

As variedades preferidas para consumo no Brasil possuem frutos de tamanho grande e baixo teor de óleo. Para exportação, as principais variedades são 'Hass' e 'Fuerte', conhecidas popularmente como 'avocado', de tamanho pequeno e alto teor de óleo, que, em menor escala, também são consumidas no país (FRANCISCO; BAPTISTELLA, 2005).

A demanda por abacates no mercado externo tem crescido devido aos avanços nas tecnologias de pós-colheita, reduções de barreiras comerciais, elevação no consumo baseado na divulgação dos seus benefícios à saúde, entre outros motivos (EVANS; NALAMPANG, 2006; FNP, 2008). Desta forma, existe um grande potencial a ser explorado pelo Brasil para a exportação desta fruta. Para isso, há necessidade de investimentos, visando minimizar os danos pós-colheita, que representam um fator limitante à exportação. Esses danos podem ser de natureza física, fisiológica e patológica e se expressam desde a colheita até seu uso pelo consumidor (SNOWDON, 1990; KLUGE et al., 2001; MARTINS et al., 2006).

Entre os danos pós-colheita de natureza patológica, destacam-se aqueles causados pela antracnose, que ocorre em todos os países produtores de abacate, sendo considerada uma das mais importantes doenças da cultura (PRUSKY; KEEN; EAKS, 1983; PEGG et al., 2002; AVILA-QUEZADA; SILVA-ROJAS; TELIZ-ORTIZ, 2007). A antracnose afeta principalmente os frutos, com sintomas iniciando-se por pontuações de coloração escura e formato circular, que evoluem atingindo parte do fruto ou necrosando-o completamente, tornando-os impróprios para a comercialização (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

As únicas informações sobre a incidência da antracnose do abacateiro em pós-colheita no Brasil são reportadas por Silveira et al. (2001), que avaliaram abacates oriundos do mercado varejista de Recife, Pernambuco e constataram que 38,5% destes apresentaram doenças fúngicas, das quais 41,5% corresponderam à antracnose.

Embora apenas *C. gloeosporioides* seja citado como agente causal da antracnose do abacate no país (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005), as espécies *C. acutatum* (AVILA-QUEZADA; SILVA-ROJAS; TELIZ-ORTIZ, 2007) e *C. boninense* (SILVA-

ROJAS; AVILA-QUEZADA, 2011) também são relatadas associadas a esta doença no México.

Algumas espécies do gênero, tais como *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, possuem centenas de hospedeiros e são comuns relatos de infecções cruzada (ALAHAKOON; BROWN; SREENIVASAPRASAD, 1994; BERNSTEIN et al., 1995; PERES et al., 2002). Esse fato, aliado às diferenças de ordem patogênica e fisiológica entre espécies de *Colletotrichum* dificulta o controle da antracnose (VINNERE, 2004). Desta forma, é importante conhecer quais espécies ocorrem, quais predominam, qual a variabilidade intra e interespecífica e qual o nível de especificidade ao hospedeiro do patógeno.

O estudo da influência de fatores ambientais sobre o patógeno e sobre a doença também é importante para subsidiar procedimentos de manejo da doença, tanto no campo como em pós-colheita. Em condições de campo essas informações são valiosas no desenvolvimento de sistemas de previsão de doenças e podem contribuir para direcionar ações de controle (SOARES, 2008). Na pós-colheita, os conhecimentos dos fatores ambientais que favorecem a patogênese são importantes para subsidiar procedimentos operacionais durante o processamento, transporte e comércio da fruta. Embora alguns trabalhos tenham sido realizados em outros países visando determinar o efeito da temperatura sobre a antracnose do abacateiro (FITZELL; MUIRHEAD, 1983; HOPKIRK et al. 1994), não há estudos similares realizados no Brasil.

De modo semelhante, existem poucos estudos que tiveram como objetivo avaliar o efeito de produtos no controle químico da antracnose em pós-colheita no país, ainda que alguns autores recomendem a adoção deste tratamento devido à freqüente ineficácia do controle desta doença verificada em condições de campo (BLEINROTH; CASTRO, 1992; COATES et al., 2001).

Diante da necessidade de maiores informações sobre a antracnose do abacateiro no Brasil, este trabalho objetivou: (i) identificar e quantificar os danos pós-colheita em abacates ‘Fuerte’ e ‘Hass’ oriundos de *packinghouse*; (ii) caracterizar, identificar isolados de *Colletotrichum* do abacateiro e compará-los com isolados obtidos de manga, maracujá e pêssego; (iii) avaliar o efeito de temperatura e período de molhamento sobre eventos da pré-penetração, infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates; (iv) avaliar o efeito de fungicidas e sanitizantes no controle da antracnose em pós-colheita.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Importância da abacaticultura

O abacateiro é uma frutífera tropical originária do continente americano, tendo o México e a Guatemala como centros de diversidade (DONADIO, 1995). De acordo com a classificação proposta por Williams (1976), o abacateiro comercial pertence à Família Lauraceae, gênero *Persea*, sendo representado por duas espécies que caracterizam três raças, a mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), a antilhana (*P. americana* var. *americana*) e a guatemalense (*P. nubigena* var. *guatemalensis*).

O consumo mundial do abacate ocorre em praticamente todos os países, tanto na forma *in natura* como na industrializada, sendo motivado por suas ótimas características nutricionais (KOLLER, 2002; EVANS; NALAMPANG, 2006; DANIELI, 2006). Esta fruta é rica em vitaminas A, C, E e do complexo B e possui alto teor de proteínas, fibras e de gordura monoinsaturada, eficaz na redução do colesterol total, LDL colesterol (maléfico a saúde) e triacilgliceróis e no aumento do HDL colesterol (benéfico à saúde) (NAVEH et al., 2002; SALGADO, 2005; SALGADO; BIN; CORNÉLIO, 2005). Por conta de suas qualidades, o abacate é bastante valorizado em alguns mercados, como nos Estados Unidos e Europa, onde é considerada uma fruta nobre (LEITE; GARCIA, 1992).

No Brasil as variedades mais importantes visando o atendimento ao mercado interno são caracterizadas pelos frutos grandes, com baixo teor de óleo, preferidos pelos consumidores brasileiros, que utilizam esta fruta especialmente no preparo de pratos doces. Entre essas estão Simmonds, Barbieri, Collinson, Quintal, Fortuna, Breda, Reis, Solano, Imperador, Ouro Verde e Campinas (DAIUTO; VIEITES, 2008).

Quando o objetivo é produzir frutas para a exportação, as variedades mais importantes são aquelas que possuem frutos de tamanho pequeno e alto teor de óleo, características que atendem ao padrão de consumo da maioria dos países, onde são utilizados no preparo de pratos salgados e para a fabricação do “guacamole”. Entre essas, destacam-se ‘Hass’ e ‘Fuerte’, que também são comercializadas no mercado interno sob a denominação “Avocado” e por serem diferenciadas têm sido mais valorizadas (FRANCISCO; BAPTISTELLA, 2005).

Além da importância alimentar, há um grande potencial de exploração comercial do abacateiro para a produção de óleo, o qual atualmente é demandado principalmente por

indústrias farmacêuticas e de cosméticos (TANGO; TURATTI, 1992; BORGES; MELLO, 2011). O óleo do abacate possui características adequadas para uso na alimentação, fabricação de cosméticos e produção de biocombustíveis, podendo render até 2,2 toneladas de óleo por hectare, números superiores aos obtidos com outras oleaginosas, como a soja e amendoim (CANTO; SANTOS; TRAVAGLINI, 1980; TANGO; TURATTI, 1992; KOLLER, 2002; TAKAHASHI; ORTEGA, 2010).

A evolução desta cultura no cenário mundial tem sido intensa nos últimos anos. De acordo com a FAO (2011) em 2009 a produção mundial de abacates foi de 3,85 milhões de toneladas, ocupando uma área de 436 mil hectares. Os maiores produtores foram México, Indonésia, Estados Unidos, Colômbia, Chile e Brasil. Dados da mesma instituição demonstram que apenas no período compreendido entre 1999 a 2009 a produção de abacates cresceu 54% enquanto a área plantada aumentou aproximadamente 38%, embora a produção desta fruta no Brasil não tenha acompanhado o ritmo mundial.

Segundo Evans e Nalampang (2006), o crescimento na produção mundial de abacates está relacionado a vários fatores, entre os quais aos avanços nas tecnologias pós-colheita e no sistema de transporte marítimo, reduções contínuas de barreiras comerciais e forte consumo motivado pela melhor divulgação de suas qualidades nutricionais.

No Brasil, a abacaticultura teve grande desenvolvimento a partir da década de 1970 devido aos incentivos fiscais concedidos pelo Governo Federal dentro do programa de reflorestamento do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), que financiou pomares com características comerciais a partir de mudas enxertadas (CAMPOS, 1984). A produção nacional de abacates em 2009 foi de 139 mil toneladas, cultivados em uma área de 8,4 mil hectares (FAO, 2011).

O Estado de São Paulo é o principal produtor do Brasil e, em 2009, produziu 74,2 mil toneladas de abacates, em 3,2 mil hectares (IBGE, 2011). Neste Estado, o abacateiro é cultivado em praticamente todos os municípios, concentrando-se em pequenas ou médias propriedades, com área entre 10 e 100 ha, que utilizam predominantemente mão de obra permanente (FRANCISCO; BAPTISTELLA, 2005). De acordo com Donadio (1995) alguns pomares localizados no município paulista de Bauru, cuja produção é voltada para a exportação, chegam a produzir anualmente 15 toneladas de frutos por hectare, o que indica um bom nível tecnológico adotado nesta região.

O crescimento no consumo desta fruta no mercado internacional, aliado ao alto valor dos frutos de algumas variedades, a exemplo de ‘Hass’ e ‘Fuerte’ e as condições edafo-

climáticas adequadas ao cultivo de abacateiros, revelam que esta cultura pode ser mais bem explorada para fins de exportação no Brasil. Entretanto, para a competitividade do país neste segmento, são necessários estudos e investimentos que visem assegurar a qualidade dos frutos exigida por este mercado, os quais devem ser livres de defeitos que depreciam sua qualidade, como os resultantes de ataques de patógenos e pragas ou injúrias (DONADIO, 1995).

2.1.2 Aspectos gerais da antracnose

Durante as etapas de colheita até o consumo a fruta está propensa a diversos danos pós-colheita (redução na qualidade ou quantidade) de natureza física, fisiológica ou patológica (SNOWDON, 1990; KLUGE et al., 2001; MARTINS et al., 2006).

Os danos de natureza patológica em abacate podem ser ocasionados por vários microorganismos, tais como *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Dothiorella gregaria*, *Fusarium* spp., *Fusicoccum* spp., *Hersonia* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis versicolor*, *Phomopsis* spp. e *Rhizopus nigricans* (PEGG et al., 2002). Dentre estes, destacam-se os fungos do gênero *Colletotrichum*, responsáveis pela antracnose, doença amplamente disseminada por todas as regiões produtoras de abacate, de difícil controle e que pode ocasionar elevados danos na cultura (PRUSKY; KEEN; EAKS, 1983; PEGG et al., 2002; AVILA-QUEZADA; SILVA-ROJAS; TELIZ-ORTIZ, 2007).

Todas as variedades de abacate são suscetíveis à antracnose, em especial ‘Fuerte’ (KOTZÉ, 1978).

A antracnose afeta todos os órgãos aéreos do abacateiro. Nas folhas ocorrem lesões angulares de cor marrom a preta, nos ramos ocorrem necroses escuras e seca e nas flores ocorre seca e abscisão das mesmas. Os danos mais severos, entretanto, ocorrem nos frutos, cujos sintomas iniciam-se na casca como pontuações de coloração marrom a preta, com formato circular, que aumentam de tamanho, podendo necrosá-los completamente (PEGG et al., 2002; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

Os frutos podem ser infectados no pomar em qualquer estágio de desenvolvimento, porém, devido à ocorrência de infecções latentes, os sintomas geralmente se manifestam após a colheita (BINYAMINI; SCHIFFMANN-NADEL, 1972). Desta forma, os prejuízos podem ser ainda maiores, pois os sintomas podem ocorrer somente após o transporte, beneficiamento e armazenamento, quando os frutos possuem maior valor agregado.

A importância desta doença em pós-colheita tem sido demonstrada em vários países. No Brasil, Silveira et al. (2001) constataram que 38,5% dos abacates obtidos do mercado

varejista de Recife, Pernambuco, apresentaram podridões, das quais 41,5% corresponderam à antracnose. Na África do Sul, Bezuidenhout e Kuschke (1983) observaram uma incidência superior a 44% de abacates com podridões, sendo que 66% destas foram ocasionadas pela antracnose. Na Austrália, Willingham et al. (2006) constatou mais de 90% de abacates com antracnose quando estes foram cultivados sob condições favoráveis a doença, enquanto Ledger et al. (1993) demonstraram que 41% dos frutos apresentaram podridões em níveis inaceitáveis, sendo 25% destas decorrentes da antracnose. Assim como foi constatado nesses países, no México os danos ocasionados pela antracnose têm aumentado ano após ano, limitado severamente a produção do abacate no país (SILVA-ROJAS; AVILA-QUEZADA, 2011).

A espécie *C. gloeosporioides* é citada como sendo a única responsável pela antracnose do abacateiro no Brasil (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005). Além desta espécie, também existem relatos de *C. acutatum* e de *C. boninense* causando antracnose em abacates no México (AVILA-QUEZADA; SILVA-ROJAS; TELIZ-ORTIZ, 2007; SILVA-ROJAS; AVILA-QUEZADA, 2011).

A exemplo do que ocorre com o abacateiro, em alguns países a associação de mais de uma espécie de *Colletotrichum* causando antracnose também é relatada em manga e pêssego, hospedeiros tanto de *C. gloeosporioides* como de *C. acutatum* (FITZELL, 1979; MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992; PLOETZ, 1994; BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG; HARTIN, 1997; AFANADOR KAFURI et al., 2003) e em maracujá, hospedeiro destas duas espécies e de *C. boninense* (GUERBER; LIU; CORRELL, 2003; ALMEIDA; COÊLHO, 2007; TOZZE JÚNIOR et al., 2010).

A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro pode dificultar o controle da antracnose, tornando-a uma doença ainda mais importante. Este fato se deve ao comportamento diferenciado entre espécies, como já foi verificado para a antracnose do pimentão no Brasil, doença causada por *C. acutatum, C. boninense, C. capsici, C. coccodes* e *C. gloeosporioides,* as quais apresentam sensibilidade diferenciada aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (TOZZE JÚNIOR, 2007).

Outro fator que dificulta o controle da antracnose é a ausência de especificidade ao hospedeiro, de forma que muitas espécies de plantas, incluindo várias frutíferas tropicais, atuam como fontes de inóculo, aumentando o risco de danos ocasionados pela antracnose

quando esses hospedeiros são cultivados próximos (ALLEN, 1995; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; PERES et al. 2002). Este risco é ainda maior no caso da associação de culturas, sistema em que há utilização simultânea do solo com duas ou mais culturas e que tem sido recomendado para o abacateiro, que pode ser associado a maracujazeiros e outras frutíferas (KOLLER, 2002).

A falta de especificidade patogênica em fungos do gênero *Colletotrichum* foi demonstrada em vários trabalhos por meio de inoculações artificiais (ALAHAKOON; BROWN; SREENIVASAPRASAD, 1994; BERNSTEIN et al., 1995; PERES et al., 2002, SANDERS; KORSTEN, 2003b). Porém, existe a necessidade de estudos para confirmar quais espécies de plantas efetivamente são hospedeiras dos fungos causadores na antracnose do abacateiro, pois alguns trabalhos indicam a existência de especialização patogênica dentro de algumas espécies de *Colletotrichum*. Em Israel, por exemplo, embora o cultivo de abacateiros seja realizado muito próximo a culturas de amendoeiras e morangueiros, em regiões com a presença de espécies de *Colletotrichum* patogênicas aos três hospedeiros, a ocorrência natural de infecção cruzada não tem sido observada (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1996; FREEMAN; KATAN, 1997; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

Devido à importância da antracnose, pelos vários motivos apresentados, é necessário conhecer quais espécies ocorrem, qual a variabilidade da população do patógeno e qual o nível de especificidade do patógeno ao hospedeiro em cada região produtora. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento ou recomendação de medidas adequadas de manejo da doença, seja ela baseada em métodos culturais, genéticos ou químicos.

2.1.3 Métodos de identificação e caracterização utilizados na taxonomia de *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi estabelecido por Corda (1837), como um fungo caracterizado por apresentar conídios hialinos, curvos e fusiformes produzidos em um acérvulo setoso. Em 1957, Arx revisou o gênero *Colletotrichum* utilizando para fins de classificação principalmente critérios morfológicos e muitas espécies antes consideradas como pertencentes aos gêneros *Vermicularia* e *Gloesporioum* foram classificadas dentro de *Colletotrichum*. Com isso, o conceito genérico de *Colletotrichum* foi ampliado, porém o

número de espécies foi reduzido de 750 para apenas 11, sendo as formas especiais ou variedades denominadas com base no hospedeiro (MENEZES, 2006).

O número de espécies desde o trabalho de Arx aumentou lentamente à medida que os estudos sobre morfologia, características culturais e patogenicidade, foram aprofundados (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000). Na revisão do gênero realizada por Sutton (1980) 22 espécies foram propostas, passando para 39 espécies na atualização realizada pelo mesmo autor em 1992. Recentemente, Hyde et al. (2009), sugeriu 66 espécies de *Colletotrichum*, utilizando métodos tradicionais amparados por técnicas moleculares.

As espécies mais comumente associadas à antracnose em frutíferas são *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, ambas estão amplamente disseminadas em todo o mundo e possuem uma extensa gama de hospedeiros. O fungo *C. gloeosporioides* já foi relatado em mais de 470 gêneros de hospedeiros diferentes (SUTTON, 1980; DODD; ESTRADA; JEGER, 1992; CANNON; BUDDIE; BRIDGE, 2008), por sua vez, *C. acutatum* foi relatado em mais de 34 gêneros de plantas, de 22 famílias (WALKER; NIKANDROW; MILLAR, 1991). Essas duas espécies, como Sutton (1992) descreve, apresentam características morfológicas e culturais distintas, que tem sido úteis para a identificação das mesmas em alguns trabalhos.

Utilizando critérios morfo-culturais Bernstein et al. (1995) puderam distinguir setenta e dois isolados de *Colletotrichum* de abacate, maçã, morango, pecan e pêssego, entre outras culturas. Os isolados que apresentaram colônias de coloração rosada a alaranjada e conídios fusiformes com ápices afilados, foram identificados como *C. acutatum*, enquanto os isolados que produziram colônias de coloração acinzentada e conídios oblongos, com ápices arredondados foram identificados como *C. gloeosporioides*.

Similarmente, Peres et al. (2002) observou que isolados de abacate, manga, maracujá e mamão apresentaram colônias cinza com rápido crescimento e alta freqüência de conídios obclavados enquanto isolados de morango e goiaba apresentaram crescimento lento, colônia alaranjada e alta freqüência de conídios do tipo fusiforme. Posteriormente, por meio da análise molecular desses isolados confirmou-se que os isolados de abacate, manga, maracujá e mamão eram pertencentes à espécie *C. gloeosporioides* enquanto os isolados de morango e goiaba pertenciam à espécie *C. acutatum.*

Silva-Rojas e Ávila-Quezada (2011) também observaram diferenças mofo-culturais entre espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do abacate ‘Hass’ no México.

Segundo os autores, os isolados de *C. gloeosporioides* produziram colônias brancas a cinza escuro com massas de esporos laranja e conídios cilíndricos a elipsóides, os isolados de *C. acutatum* apresentaram colônias brancas ou laranja com massa de esporos rosa ou laranja e conídios oblongos com uma ou ambas as extremidades afiladas e os isolados de *C. boninense* produziram colônias creme a cinza com massa de esporos laranja e conídios cilíndricos a obvóides.

A taxa de desenvolvimento diferenciada de colônias de *Colletotrichum* spp. em diferentes temperaturas é outra característica utilizada por alguns autores para separação de espécies do gênero. De acordo com Vinnere (2004), *C. acutatum* apresenta temperatura ótima de crescimento da colônia compreendida entre 25,0 e 26,5 ºC, sendo inibida a partir de 33ºC, enquanto *C. gloeosporioides* apresenta temperatura ótima entre 26,0 e 28,5 ºC, desenvolvendo-se em temperaturas de até 35,5 ºC.

Por meio de avaliações do desenvolvimento de colônias em diferentes temperaturas, Adaskaveg e Hartin (1997) distinguiram *C. gloeosporioides* obtidos de plantas de citrus e mamão, que se desenvolveram melhor a 30ºC, de *C. acutatum* de pêssego, morango e amêndoa, cujo crescimento da colônia foi mais intenso a temperatura de 25ºC. Smith e Black (1990) também diferenciaram isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, pelo fato desta última espécie ter menor desenvolvimento sob a temperatura de 32ºC.

Aliado às características morfológicas e culturais, a produção de enzimas extracelulares pode ter grande valor na taxonomia química em fungos, pois as variações nos níveis de produção dessas enzimas podem ser utilizadas para diferenciar espécies fúngicas (PATERSON; BRIDGE, 1994; PEREIRA, 2009; ASSIS et al., 2010). Este fato foi constatado por Pereira (2009) que distinguiu *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* de goiabas com base na atividade celulolítica, que foi maior para os isolados de *C. acutatum.*

A atividade de enzimas como a amilase, lípase, proteinase e pectinase tem sido utilizada por vários autores também para estudar a variabilidade de fungos do gênero *Colletotrichum* (ASSIS, 2001; COUTO; MENEZES; COÊLHO, 2002; PEREIRA, 2009). Em alguns desses trabalhos, constatou-se uma alta correlação entre a atividade enzimática *in vitro* e a agressividade de *Colletotrichum* spp. em frutos. Em banana, por exemplo, o tamanho das lesões promovidas por *C. musae* teve alta correlação com a atividade amilolítica (COUTO; MENEZES, COÊLHO, 2002). No caso da antracnose da goiabeira, Pereira (2009) constatou que além da atividade amilolítica, as atividades lipolítica e pectiolítica de isolados de *C.*

gloeosporioides e *C. acutatum* também tiveram alta correlação com a agressividade desses isolados em frutos.

As características fenotípicas citadas são úteis para se conhecer a variabilidade inter e intra-específica de *Colletotrichum*. Além disso, critérios morfológicos e culturais são, e provavelmente continuarão sendo a base primária para a separação entre espécies ou grupos de espécies (KATAN, 2000). Entretanto, devido à plasticidade fenotípica apresentada pelas espécies do gênero *Colletotrichum*, a identificação e classificação tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos apresentam limitações. Para minimizar o problema, esforços devem ser aumentados para o uso integrado de métodos morfológicos e bioquímicos, visando estudos taxonômicos desse importante grupo de fungos (MENEZES, 2006).

Várias técnicas moleculares têm sido associadas aos estudos tradicionais, com objetivo de caracterizar e/ou identificar isolados de *Colletotrichum*, tais como a PCR ("polymerase chain reaction'), o RAPD ("random amplified polymorphic DNA"), o RFLP ("restriction fragment length polymorphism"), a "A+T-rich DNA" e a análise de seqüências de nucleotídeos (SREENIVASAPRASAD; BROWN; MILLS, 1992; CORRELL; RHOADS; GUERBER, 1993; BAILEY et al., 1996; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; JOHNSTON; JONES, 1997; PERES et al., 2002; GUERBER et al. 2003; DU et al., 2005; CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2005; LIU et al., 2007).

A técnica de PCR utilizando-se oligonucleotídeos espécie-específicos destaca-se pela simplicidade, sensibilidade e precisão. Os oligonucleotídeos CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4, desenvolvidos respectivamente para *C. acutatum* (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992) e *C. gloeosporioides* (SREENIVASAPRASAD et al., 1996) foram utilizados em trabalhos envolvendo identificação de isolados de *Colletotrichum* de várias frutíferas, como abacate, manga, maracujá, pêssego, citros, mamão, goiaba e morango (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; PERES et al., 2002; ADASKAVEG; HARTIN, 1997; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; ANDRADE et al., 2007).

O uso desta técnica tem permitido a identificação de isolados com características morfo-culturais atípicas das citadas para a espécie a que pertence. Este foi o caso do trabalho desenvolvido por Freeman et al. (2000), onde isolados de *Colletotrichum* de amendoeiras provenientes de Israel apresentavam características morfológicas similares a *C. gloeosporioides* mas reagiram com oligonucleotídeos específicos para *C. acutatum*. Fato semelhante ocorreu no Brasil em estudos realizados por Bueno (2005) e Tozze Júnior (2007),

para isolados de *Colletotrichum* obtidos de algumas solanáceas, que produziram conídios com formato típico ao que é descrito para *C. gloeosporioides* mas foram identificados por meio de PCR utilizando-se oligonucleotídeos espécie-específicos como sendo *C. acutatum.*

Por sua vez, a análise de seqüências de ácidos nucléicos é considerada a técnica mais confiável para a classificação *Colletotrichum* (CROUCH et al., 2009; DAMM et al., 2009;. PRIHASTUTI et al., 2009 ; CAI et al., 2009).

Dentre as regiões do genoma já estudadas para este gênero, a ITS é a que possui maior número de seqüências depositadas. A análise filogenética utilizando dados desta região é uma ferramenta útil para uma identificação preliminar da espécie de *Colletotrichum* ou para colocá-lo em um complexo de espécie (CAI et al. 2009). Através da análise de seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de isolados de *Colletotrichum* obtidos de macieira, goiaba serrana e citros, Ribeiro et al. (2009) distinguiram com clareza as espécies e relacionaram as mesmos com os respectivos hospedeiros.

Recentemente, várias regiões do genoma de fungos do gênero *Colletotrichum* têm sido analisadas em conjunto com o ITS, entre as quais a β-tubulina, Calmodulina, Glutamina sintetase, Actina e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (PRIHASTUTI et al.; 2009). A análise de seqüências de nucleotídeos das regiões ITS e β-tubulina foi útil no trabalho de Rampersad (2011), que distinguiram de maneira clara as espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do mamoeiro.

A análise filogenética baseada em sequências nucleotídicas concatenadas, isto é, que inclui duas ou mais regiões em estudo, aumenta o grau de certeza das inferências filogenéticas, estando este fato relacionado com o maior número de nucleotídeos analisados. Porém, apesar da vantagem da utilização de sequências concatenadas, é necessário que existam disponíveis nas bases de dados, sequências de genoma completo ou das regiões subgenômicas analisadas (CALADO, 2009).

A viabilidade desta técnica para estudos taxonômicos de fungos do gênero *Colletotrichum* foi recentemente confirmada por Choi et al. (2011). Esses autores, ao caracterizarem isolados de *C. panacicola* de ginseng na Coréia, concluíram que essa espécie não poderia ser distinguida de *C. higginsianum, C. destructivum* e *C. coccodes* por meio de características morfológicas, tampouco poderia ser distinguida de *C. higginsianum* e *C. destructivum* com análise das seqüências da região ITS. Porém, uma árvore filogenética baseada em seqüências combinadas de três genes (Actina, Glutamina sintetase e α-elongase)

proveu variabilidade suficiente para delimitar *C. panacicola* das demais espécies de *Colletotrichum*. A análise filogenética conjunta de sequências das regiões ITS e β-tubulina também demonstrou ser mais confiável que a análise separada desses genes em um estudo envolvendo espécies de *Colletotrichum* spp. associadas ao cafeeiro na Colômbia (GONZÁLEZ, 2007).

Com os avanços nos estudos moleculares associados aos métodos baseados em critérios fenotípicos, novas espécies de *Colletotrichum* tem sido descritas. Na edição de 2008 do *Dictionary of the Fungi* 60 espécies do gênero foram sugeridas (KIRK et al., 2008). Recentemente, Hyde et al. (2009) tendo como base critérios morfológicos associados à análise de seqüência de múltiplos genes sugeriu 66 espécies de *Colletotrichum*.

Os estudos de caracterização baseados na integração de métodos são fundamentais para a correta identificação e conhecimento da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

2.1.4 Aspectos epidemiológicos da antracnose

Os eventos que ocorrem desde o primeiro contato entre o patógeno e o hospedeiro até a morte da lesão constituem o ciclo de infecção (BERGAMIN; AMORIM, 1996). A antracnose é uma doença policíclica, ou seja, que se caracteriza por repetidos ciclos de novas infecções durante o cultivo.

As fases que compõe cada ciclo da antracnose geralmente compreendem: deposição do conídio na superfície da planta, adesão do conídio, germinação do conídio, elongação do tubo germinativo, formação do apressório, desenvolvimento do *peg* de penetração, penetração nas células epidérmicas, crescimento do patógeno, colonização do tecido vegetal e produção de acérvulos que dão origem aos conídios (JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999; PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN, 2000; PEGG et al., 2002; MORAES, 2009).

As fontes de inóculo de *C. gloeosporioides* do abacateiro são folhas mortas e galhos emaranhados na copa ou, ainda, frutos infectados que ficam aderidos nas plantas e que podem representar uma importante fonte de inóculo em algumas variedades, como ‘Fuerte’ (FITZELL, 1987; PEGG et al., 2002). A partir dessas fontes, os conídios são disseminados principalmente por meio da água, na forma de enxurradas ou respingos (PEGG et al., 2002).

Após a deposição dos conídios de *Colletotrichum* na superfície do hospedeiro a germinação inicia-se em até três horas (BAILEY; JEGER, 1992; LOPEZ, 2001; MORAES,

2009). Cada conídio germinado produz um tubo germinativo que alcança entre 10 e 20 µm e após 5 a 6 horas inicia-se a formação de um apressório terminal (PEGG et al., 2002). Neste processo, o ápice do tubo germinativo torna-se dilatado e ao atingir o tamanho máximo, a parede do apressório engrossa e escurece consideravelmente, desenvolvendo um poro germinativo central na parede ventral (PARBERY, 1981).

Nos frutos verdes de abacate os apressórios melanizados permanecem quiescentes e somente após a colheita e o amadurecimento dos frutos o processo de infecção continua (BINYAMINI; SCHIFFMANN-NADEL, 1972). Este fato está relacionado com a presença de concentrações elevadas do composto antifúngico pré-formado “dieno” (1-acetoxi-2-hidróxi-4-oxoheneicosa-12,15-dieno), presentes no pericarpo dos frutos imaturos (PEGG et al., 2002). Algumas vezes, entretanto, a infecção se completa e os sintomas se manifestam ainda no campo, fato que segundo Fitzell (1987) é favorecido por ferimentos causados por insetos ou mecanicamente, que atuam como via de penetração do fungo e induzem o amadurecimento da área afetada, com consequente declínio dos compostos antifúngicos.

Além da penetração por ferimentos, *C. gloeosporioides* também pode penetrar por aberturas naturais ou diretamente no hospedeiro. Este último processo envolve a formação do *peg* a partir do apressório que, por meio de força mecânica, da secreção de enzimas ou da combinação de ambos, atravessa a cutícula e epiderme do fruto, iniciando a colonização da casca e polpa (BAILEY et al., 1992; MORIN; DERBY; KOKKO, 1996).

Estabelecida a infecção, inicia-se a colonização dos tecidos do abacate, que de acordo com Coates et al. (1993), ocorre tanto por meio de hifas subcuticulares como por hifas intracelulares. Enquanto na colonização subcuticular o patógeno cresce necrotroficamente, na colonização intracelular inicialmente há uma fase biotrófica e após a colonização de uma ou duas células, o patógeno passa a colonizar o tecido de forma necrotrófica (BAILEY et al., 1992; MORAES, 2009). Com o progresso da colonização os sintomas visuais se manifestam, inicialmente como pequenas lesões circulares de cor marrom-clara, que progridem para lesões deprimidas no centro e mudam para marrom-escura ou preta, atingindo a polpa, que se torna escurecida. Na presença de umidade uma massa mucilaginosa salmão contendo os conídios é produzida no centro das lesões, em acérvulos (PEGG et al., 2002).

O desenvolvimento de uma doença é resultante da interação entre um hospedeiro suscetível, um agente patogênico e condições ambientais favoráveis. Os fatores ambientais, em especial a umidade e a temperatura, condicionam o progresso da doença, determinando não apenas o sucesso ou não das infecções mas também a duração e o número de ciclos de

infecção durante o ciclo do hospedeiro. Este fato se deve à influência desses fatores no metabolismo do patógeno e do hospedeiro, em processos como a germinação de esporos, formação de apressórios, infecção, períodos de incubação e latência, severidade da doença, entre outros (COLHOUN, 1973; ROTEM; COHEN; BASHI, 1978; BEDENDO, 1995; SOARES, 2008).

A quantificação da influência das condições climáticas no desenvolvimento de epidemias é feita comumente em experimentos conduzidos em câmaras de crescimento, que permitem isolar os efeitos de variáveis ambientais específicas, fornecendo dados que explicam o desenvolvimento da doença em campo. Desta forma, determinando-se o efeito do ambiente sobre os processos de infecção e colonização de uma doença pode-se inferir sobre o desenvolvimento de epidemias em campo (MONTEIRO, 2002).

A água constitui-se em fator vital para a germinação de esporos e penetração no hospedeiro (BEDENDO, 1995; MONTEIRO, 2002). Os conídios de *C. gloeosporioides* podem germinar com 95% de umidade relativa, porém a porcentagem de germinação dos conídios e formação dos apressórios é maior quando a umidade relativa se aproxima de 100% (MICHEREFF, 2007). Desta forma, a água livre sob a superfície do hospedeiro, sob a forma de orvalho, tem grande relevância no processo de infecção (MONTEIRO, 2002).

Com o acréscimo no período de molhamento ocorre um aumento na germinação de conídios até que um limite superior seja atingido, mesmo que o período de molhamento seja ainda mais prolongado (SOARES, 2008). Este fato foi demonstrado por Soares, Lourenço e Amorim (2008), que constataram um acréscimo significativo na germinação de conídios e formação de apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* quando o período de molhamento foi aumentado de 6 para 24 horas. Também foi demonstrado por Estrada, Dodd e Jeffries (2000), os quais constataram que a formação de apressórios de isolados de *C. gloeosporioides* de manga foi drasticamente inibida em curtos períodos de molhamento e aumentaram significativamente com o acréscimo no período de molhamento, de 12 para 24 horas.

No caso da temperatura, a germinação de conídios e formação de apressórios aumenta à medida que a temperatura é elevada, até um ponto máximo, quando então essas variáveis passam a sofrer drástica redução. Everett (2003) constatou que a temperatura mínima para isolados de *C. gloeosporioides* de abacate foi de 13,7 ºC enquanto para *C. acutatum* a inibição só ocorreu em temperaturas menores que 7,1 ºC. Para isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* de goiaba foi demonstrado que os conídios germinam e formaram apressórios entre

10 e 35ºC, atingindo um máximo na faixa entre 20 e 25ºC e sendo inibidas a 5ºC e 40ºC (SOARES, LOURENÇO, AMORIM, 2008; MORAES, 2009).

Além dos efeitos da temperatura e período de molhamento sobre os eventos de pré-penetração do patógeno, Soares (2008) constatou que os mesmos influenciaram o período de latência, taxa de progresso da doença e tamanho das lesões em frutos de goiabeira inoculados com *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. De acordo com o autor, temperaturas entre 20 e 30 ºC com período de molhamento de 24 horas foram favoráveis para essas variáveis.

O estudo da influência de fatores ambientais sobre as fases que compõe o ciclo da doença é importante para subsidiar procedimentos de controle da doença tanto no campo como em pós-colheita. Em condições de campo essas informações são úteis para melhor compreensão da epidemiologia da doença e para o desenvolvimento de sistemas de previsão da doença, a exemplo do que foi desenvolvido por Dodd et al. (1991) para a antracnose da manga.

Na pós-colheita, o conhecimento das variáveis ambientais que favorecem os processos de pré-penetração, infecção e colonização é importante para subsidiar procedimentos operacionais durante o processamento, transporte e comércio da fruta visando evitar as condições propícias para manifestação da doença, assim como, para atrasar a manifestação de sintomas e crescimento das lesões. Nesse sentido, alguns trabalhos foram desenvolvidos na Nova Zelândia visando determinar os efeitos da temperatura sobre a maturação de frutos e ocorrência de podridões em abacates ‘Fuerte’ (FITZELL; MUIRHEAD, 1983) e ‘Hass’ (HOPKIRK et al., 1994). Tais estudos revelam que a temperatura tem alta influência sobre o desenvolvimento da antracnose, havendo maiores danos em temperaturas entre 25 e 30ºC. Desta forma, os autores recomendam a manutenção dos frutos em temperaturas baixas, com intuito de minimizar esses danos.

2.1.5 Controle da antracnose do abacateiro

O manejo da antracnose requer o uso de diferentes métodos tanto durante a fase de cultivo como em pós-colheita de abacates, pelo fato das infecções normalmente ocorrerem no campo e os sintomas só se manifestarem após a colheita e amadurecimento dos frutos (PEGG et al., 2002; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

Em pré-colheita, recomenda-se que o manejo da antracnose seja realizado por meio do uso de fungicidas, que podem ser aplicados duas a três vezes no pomar no período compreendido entre o florescimento e a frutificação (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO,

2005). Associado ao controle químico, recomenda-se o manejo cultural, que envolve a adoção de adubações equilibradas, podas de limpeza, queima de material doente, cuidados durante as operações visando evitar ferimentos nos frutos, controle de insetos e de outras doenças, a exemplo da verrugose e a cercosporiose, que favorecem a penetração de *Colletotrichum* spp. (COATES et al., 2001; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005; PALMATEER; PLOETZ; HARMON, 2006).

Para o controle químico das doenças do abacateiro existem poucos fungicidas registrados no Brasil. A maioria destes é inorgânica, possuindo como ingredientes ativos oxicloreto de cobre, óxido cuproso, hidróxido de cobre ou enxofre. Além dos inorgânicos, também estão registrados para a cultura o tiabendazol (benzimidazol), difenoconazol(triazol) e mancozebe (alquilenobis(ditiocarbamato)) em mistura com oxicloreto de cobre (BRASIL, 2011).

Darvas (1981) avaliou o efeito de alguns fungicidas pulverizados em pré-colheita sobre abacate ‘Fuerte’ para o controle da antracnose em pós-colheita e constatou que hidróxido de cobre foi eficaz no controle desta doença. Porém, de acordo com Bleinroth e Castro (1992), o controle total das estruturas do patógeno durante a fase de cultivo do abacate por meio do uso de fungicidas, muitas vezes não ocorre, sendo necessário que as frutas sejam tratadas após a colheita, especialmente quando estas se destinam à exportação por via marítima ou quando são consumidas após 15 dias do seu tratamento. Compartilham desta opnião Coates et al. (2001), segundo os quais, a aplicação exclusiva de fungicidas cúpricos em pré-colheita geralmente é ineficaz para o controle da antracnose e a aplicação em pós-colheita de procloraz, que possui alguma ação curativa, pode auxiliar o controle de infecções que o tratamento pela pulverização com cúpricos não pode prevenir.

Muirhead et al. (1982) avaliaram o efeito de diferentes fungicidas aplicados em frutos verdes de abacate ‘Fuerte’ por meio de imersão em calda fungicida por 5 minutos e constataram que o procloraz (1 g i.a./L) aumentou as porcentagens de frutos livres de antracnose em até 90%, aumentando também as percentagens de frutos com níveis aceitáveis da doença.

O tratamento de abacates ‘Pinkerton’ imersos por 20 segundos em uma calda de fungicida contendo procloraz 0,2% ou benomil a 0,05% mais procloraz a 0,05% também se mostrou eficaz para o controle da antracnose em pós-colheita após 16 dias de armazenamento a 13ºC. Os autores utilizaram para avaliação uma escala de notas de 1 a 9, onde 1 representa a ausência de sintomas e 9 sintomas severos e constataram que no tratamento com procloraz os

frutos apresentaram nota média de 1,8, similar ao tratamento com este fungicida mais benomil, que apresentou nota média de 1,9 e inferior ao tratamento controle (sem fungicida) cuja nota foi 9 (MCMILLAN; NARAYANAN, 1990).

Assim como esses autores, Roux, Wentzel e Roose (1985) verificaram o controle significativo da antracnose em abacates tratados por imersão em calda contendo procloraz (0,06 g i.a/L) por quatro minutos. Após 36 dias do tratamento a incidência desta doença nos frutos tratados foi de 6,3%, diferindo significativamente do tratamento controle cujos frutos não foram tratados quimicamente, nos quais a incidência foi de 67,2%. Os autores também verificaram que quando este fungicida foi aplicado por pulverização em ultra baixo volume a uma concentração de 0,05 g i.a/L a incidência da doença foi reduzida de 84,4% para 26,4%.

A eficácia de procloraz no controle da antracnose em pós-colheita também foi demonstrada por Powell (1988) ao tratar abacates por imersão durante três minutos em calda contendo procloraz (0,06 g i.a./L).

Embora o procloraz seja o fungicida mais estudado no controle da antracnose do abacateiro, outros fungicidas também são utilizados em vários países, a exemplo das estrobilurinas e dos benzimidazóis.

Os efeitos de azoxistrobina sobre o controle da antracnose do abacate ‘Hass’ foram estudados por Coates et al. (2001), os quais verificaram que a severidade da antracnose foi significativamente reduzida nos frutos tratados, quando esse fungicida foi utilizado conjuntamente com um agente molhante.

A eficácia do tiabendazol (1,5 g/L) no controle da antracnose do abacate ‘Fuerte’ foi avaliada por Dyk, Villiers e Korsten (1997) e mostrou-se muito variável de acordo com a região de origem dos frutos, na África do Sul. Segundo os autores este fato poderia estar associado com níveis diferentes de resistência do patógeno a esse fungicida.

No Brasil, dos fungicidas citados apenas tiabendazol pode ser utilizado no tratamento de abacates em pós-colheita, desde que respeitado o período de carência do mesmo, pois muitos países produtores exigem ausência de resíduos desse produto para importarem os frutos (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

Além do controle químico, outros métodos têm se mostrado igualmente eficaz no controle da antracnose e de outras doenças pós-colheita do abacateiro, como o controle biológico com *Bacillus subtilis* (KORSTEN, 2004), o uso do antioxidante BHA (butlylated hydroxyanisole) (PRUSKY et al., 1995) e a adoção de atmosfera controlada (SPALDING; REEDER, 1975; PRUSKY et al., 1993).

Associado a esses métodos de controle, deve-se adotar procedimentos que minimizem as injúrias nas frutas e a exposição das mesmas a condições ambientais propícias para a manifestação das podridões (PEGG et al., 2002; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005; PALMATEER; PLOETZ; HARMON, 2006).

No Brasil, diante da escassez de informações sobre o controle da antracnose do abacateiro em pós-colheita, existe a necessidade da avaliação de diferentes métodos de controle desta doença, incluindo o controle químico.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Identificação e quantificação de danos pós-colheita em abacates 'Fuerte' e 'Hass' em *packinghouse*

Este experimento foi realizado em parceria com os pesquisadores Dr. Ivan Herman Fischer e Dra. Marília Celília Arruda da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, APTA Centro Oeste – Bauru, SP.

As amostragens dos frutos para identificação e quantificação dos danos pós-colheita foram realizadas em fevereiro e março de 2008 para o abacate 'Fuerte' e em junho e julho de 2008 para o abacate 'Hass', em *packinghouse* localizado em Bauru-SP, que exporta aproximadamente 80% do volume beneficiado para a Europa, Argentina e Canadá. As amostras de abacate 'Fuerte' foram procedentes de uma fazenda de Bauru-SP e as de abacate 'Hass' de Olímpia e Bernardino de Campos-SP.

Para cada variedade, foram realizadas duas amostragens, sendo, em cada amostragem, coletados 50 frutos em cada uma das seguintes etapas do beneficiamento em *packinghouse*: 1) chegada - nos engradados plásticos de chegada dos frutos; 2) palete - em caixas de papelão do palete, após tratamento por imersão com procloraz (1000 mg/L) (apenas abacate 'Fuerte'), aparação dos pedúnculos e seleção manual dos frutos injuriados, aplicação de cera e classificação automatizada por massa (g); e 3) câmara – frutos beneficiados (etapa 2), após o período de 30 dias de armazenamento refrigerado a 5ºC.

Visando favorecer a expressão de sintomas de doenças causadas por patógenos em estádio latente, os frutos foram individualizados e acondicionados em bandejas plásticas contendo papéis de filtro umedecidos com água destilada esterilizada em seu interior, as quais foram fechadas com sacos de polietileno, a fim de obter uma câmara úmida, onde os frutos foram mantidos por 24 horas, sob temperatura de 25±1ºC, no escuro. Posteriormente, os

frutos foram retirados da câmara úmida, permanecendo por mais 14 dias a 25ºC e 70-75% de umidade relativa, no escuro.

Avaliou-se a incidência de doenças e injúrias mecânicas pós-colheita visualmente, após a retirada da câmara úmida e a cada dois ou três dias. Os fungos isolados de frutos com podridões foram isolados e tiveram a patogenicidade confirmada por meio da inoculação com 40 μL de suspensão (10^5 esporos/mL), depositadas sobre a epiderme, na região mediana de frutos de abacate 'Fuerte' (desinfestados com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 0,5% por 1,5 minutos), onde posteriormente foi realizado ferimento com agulha histológica esterilizada. Os frutos foram incubados em câmara úmida sob temperatura de 25±1 ºC, por sete dias e os fungos que reproduziram os sintomas foram reisolados e identificados.

A incidência dos danos pós-colheita nas diferentes etapas do beneficiamento foi comparada por meio de teste não paramétrico de comparação de múltiplas proporções, ao nível de 5% de probabilidade (ZAR, 1999).

2.2.2 Caracterização, identificação e análise comparativa de isolados de *Colletotrichum* do abacateiro e outras frutíferas

2.2.2.1 Obtenção e preservação dos isolados

Para realização dos experimentos, utilizaram-se 93 isolados de *Colletotrichum* spp. de abacate, manga, maracujá e pêssego, provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo (Tabela 1). Além desses isolados, com objetivo de verificar a especificidade de oligonucleotídeos espécie-específicos, no experimento envolvendo a identificação molecular por oligonucleotídeos espécie-específicos foram utilizados DNAs de isolados reconhecidamente pertencentes às espécies *C. acutatum* (TUT-137A) e *C. gloeosporioides* (AVO-33-4B) (FREEMAN et al., 2000) e de um isolado de manga pertencente a uma espécie desconhecida de *Colletotrichum* que ocorre na Colômbia (Man-76), o qual reage com os oligonucleotídeos Col1/ITS4 (AFANADOR-KAFURI et al., 2003).

Esses isolados foram obtidos a partir de lesões típicas de antracnose em frutos. O isolamento foi realizado pela coleta de esporos presentes em uma única lesão, com uma agulha histológica esterilizada e transferência dos mesmos para meio batata-dextrose-ágar (BDA) Acumedia® (39g/L). As culturas monospóricas foram obtidas conforme descrito por Pereira (2009).

Todos os isolados monospóricos foram inoculados em frutos sadios de seus hospedeiros de origem e aqueles que se mostraram patogênicos foram reisolados e preservados sob refrigeração em tubos contendo meio BDA, sob óleo mineral, água e em papel-de-filtro.

A preservação em óleo foi realizada pela repicagem dos isolados para tubos de ensaio contendo meio BDA Acumedia® (39 g/L). Após o crescimento da colônia sobre toda a superfície do meio, 5 mL de óleo mineral esterilizado foram adicionados em cada tubo. A preservação em água foi realizada pela transferência de discos de micélio com 6 mm de diâmetro para tubos contendo 9 mL de água destilada esterilizada. Para a preservação pelo método de papel-de-filtro, cada isolado foi repicado sobre fragmentos de 4 cm^2 de papel-de-filtro esterilizado, depositados sobre a superfície do meio de aveia contido em placas de Petri. Após o desenvolvimento da colônia, cada fragmento de papel-de-filtro contendo as estruturas do isolado foi retirado da placa de origem, sem o meio de cultura, e transferido para uma placa de Petri esterilizada. Esta placa foi mantida em dessecador até a completa secagem do material. Após este processo, o papel-de-filtro contendo as estruturas do isolado foi transferido para um tubo para microcentrífuga autoclavado contendo sílica gel esterilizada. Os tubos com os isolados preservados em óleo e água foram armazenados sob refrigeração, à temperatura de aproximadamente 5 ºC, enquanto os tubos contendo os isolados preservados em papel-de-filtro foram armazenados em *freezer* sob temperatura de aproximadamente -20 ºC.

Tabela 1 - Denominação, hospedeiro, variedade, município de origem e ano de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de antracnose

(continua)

Denominação	Hospedeiro	Variedade	Município de origem	Ano de Coleta
AV-01	Abacate	Wislonson	Itapetininga, SP	2008
AV-02	Abacate	Collinson	Itapetininga, SP	2008
AV-03	Abacate	Hass	Olímpia, SP	2008
AV-04	Abacate	Fuerte	Piracicaba, SP	2008
AV-05	Abacate	Fuerte	Bauru, SP	2008
AV-06	Abacate	Hass	Bauru, SP	2008
AV-07	Abacate	Hass	Limeira, SP	2008
AV-08	Abacate	Collinson	Piracicaba, SP	2008
AV-09	Abacate	Hass	Olímpia, SP	2008
AV-10	Abacate	Hass	Bernardino de Campos, SP	2008
AV-11	Abacate	Hass	Bauru, SP	2008
AV-12	Abacate	Hass	Limeira, SP	2008
AV-13	Abacate	Hass	Bernardino de Campos, SP	2008
AV-14	Abacate	Fuerte	Bauru, SP	2008
AV-15	Abacate	Hass	Dois Córregos, SP	2008
AV-16	Abacate	Quintal	Itapetininga, SP	2008

Tabela 1 - Denominação, hospedeiro, variedade, município de origem e ano de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de antracnose

(continuação)

Denominação	Hospedeiro	Variedade	Município de origem	Ano de Coleta
AV-17	Abacate	Fuerte	Piracicaba, SP	2008
AV-18	Abacate	Simmonds	Piracicaba, SP	2008
AV-19	Abacate	Hass	Olímpia, SP	2008
AV-20	Abacate	Hass	Jardinópolis, SP	2008
AV-21	Abacate	Hass	Dois Córregos, SP	2008
AV-22	Abacate	Hass	Bernardino de Campos, SP	2008
AV-23	Abacate	Hass	Limeira, SP	2008
AV-24	Abacate	Hass	Bernardino de Campos, SP	2008
AV-25	Abacate	Hass	Bernardino de Campos, SP	2008
AV-26	Abacate	Hass	Dois Córregos, SP	2008
AV-27	Abacate	Hass	Jardinópolis, SP	2008
AV-28	Abacate	Hass	Olímpia, SP	2008
AV-29	Abacate	Quintal	Itapetininga, SP	2008
AV-30	Abacate	Hass	Jardinópolis, SP	2008
MN-31	Manga	Espada	Jaboticabal, SP	2009
MN-32	Manga	Tommy Atkins	Bauru, SP	2009
MN-33	Manga	Espada	Cabralia Paulista, SP	2009
MN-34	Manga	Tommy Atkins	Monte Alto, SP	2009
MN-35	Manga	Palmer	Magda, SP	2009
MN-36	Manga	Tommy Atkins	São José do Rio Preto, SP	2009
MN-37	Manga	Tommy Atkins	Borborema, SP	2009
MN-38	Manga	Tommy Atkins	Bauru, SP	2009
MN-39	Manga	Tommy Atkins	Monte Alto, SP	2009
MN-40	Manga	Espada	Cabralia Paulista, SP	2009
MN-41	Manga	Palmer	Magda, SP	2009
MN-42	Manga	Tommy Atkins	Jaú, SP	2009
MN-43	Manga	Tommy Atkins	Borborema, SP	2009
MN-45	Manga	Tommy Atkins	Catanduva, SP	2009
MN-46	Manga	Tommy Atkins	Monte Alto, SP	2009
MN-47	Manga	Tommy Atkins	São José do Rio Preto, SP	2009
MN-48	Manga	Tommy Atkins	Jaú, SP	2009
MN-49	Manga	Tommy Atkins	Borborema, SP	2009
MN-50	Manga	Tommy Atkins	Jaú, SP	2009
MN-51	Manga	Espada	Jaboticabal, SP	2009
MN-52	Manga	Tommy Atkins	Borborema, SP	2009
MN-53	Manga	Tommy Atkins	Bauru, SP	2009
MN-54	Manga	Tommy Atkins	Bauru, SP	2009
MN-55	Manga	Tommy Atkins	Monte Alto, SP	2009
MN-56	Manga	Palmer	Magda, SP	2009
MN-57	Manga	Espada	Cabralia Paulista, SP	2009
MN-58	Manga	Espada	Botucatu, SP	2009
PS-59	Maracujá	Não identificada	Adamantina, SP	2007
PS-60	Maracujá	Não identificada	Bauru, SP	2010
PS-61	Maracujá	Não identificada	Jaú, SP	2007
PS-62	Maracujá	Não identificada	Valinhos, SP	2007
PS-63	Maracujá	Não identificada	Bariri, SP	2007
PS-64	Maracujá	Não identificada	Campinas, SP	2007
PS-65	Maracujá	Não identificada	Campinas, SP	2007
PS-66	Maracujá	Não identificada	Irapuru, SP	2007

Tabela 1 - Denominação, hospedeiro, variedade, município de origem e ano de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de antracnose

(conclusão)

Denominação	Hospedeiro	Variedade	Município de origem	Ano de Coleta
PS-67	Maracujá	Não identificada	Valinhos, SP	2007
PS-68	Maracujá	Não identificada	Irapuru, SP	2007
PS-69	Maracujá	Não identificada	Adamantina, SP	2007
PS-70	Maracujá	Não identificada	Pacaembu, SP	2007
PS-71	Maracujá	Não identificada	Bauru, SP	2007
PE-72	Pêssego	Tropic Beauty	Paranapanema, SP	2010
PE-73	Pêssego	Tropic Beauty	Paranapanema, SP	2010
PE-74	Pêssego	Douradão	Botucatu, SP	2010
PE-75	Pêssego	Douradão	Botucatu, SP	2010
PE-76	Pêssego	Douradão	Botucatu, SP	2010
PE-77	Pêssego	Douradão	Botucatu, SP	2010
PE-78	Pêssego	Douradão	Marília, SP	2010
PE-79	Pêssego	Douradão	Marília, SP	2010
PE-80	Pêssego	Douradão	Marília, SP	2010
PE-81	Pêssego	IAC 282-24	Pindorama, SP	2010
PE-82	Pêssego	Aurora	Bauru, SP	2010
PE-83	Pêssego	Aurora	Bauru, SP	2010
PE-84	Pêssego	Tropic Beauty	Paranapanema, SP	2010
PE-85	Pêssego	Douradão	Paranapanema, SP	2010
PE-86	Pêssego	Tropic Beauty	Paranapanema, SP	2010
PE-87	Pêssego	IAC 680-13	Pindorama, SP	2010
PE-88	Pêssego	Aurora	Bauru, SP	2010
PE-89	Pêssego	IAC 282-24	Pindorama, SP	2010
PE-90	Pêssego	IAC 680-13	Pindorama, SP	2010
PE-91	Pêssego	Aurora	Bauru, SP	2010
PE-92	Pêssego	IAC 680-13	Paranapanema, SP	2010
PE-93	Pêssego	IAC 282-24	Pindorama, SP	2010
PE-94	Pêssego	Douradão	Paranapanema, SP	2010

2.2.2.2 Caracterização cultural

A caracterização cultural foi baseada na determinação da velocidade de crescimento da colônia em diferentes temperaturas e na observação das características morfológicas das colônias de cada isolado, cultivados em meio BDA.

Para cada isolado, discos de BDA Acumedia® com 6 mm de diâmetro, contendo estruturas do fungo, foram obtidos das bordas de uma colônia cultivada por cinco dias em meio de cultura BDA Acumedia® (39 g/L) e transferidos para o centro de placas de Petri contendo o mesmo tipo de meio. Após a repicagem, os isolados foram incubados na temperatura de 15, 20, 25, 30 e 35±1ºC, sob fotoperíodo de 12 horas, por um período de cinco dias.

A avaliação do experimento foi realizada diariamente, através da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia com auxílio de paquímetro. A velocidade média de crescimento da colônia, expressa em mm/dia, foi utilizada para as análises estatísticas. Ao quinto dia de cultivo, foram avaliadas as características morfológicas das colônias cultivadas a 25±1ºC, tais como coloração da colônia e presença de estruturas (escleródios, setas, massa de esporos).

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa. Os dados correspondentes à velocidade de crescimento da colônia dos isolados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (UFLA, Lavras).

2.2.2.3 Caracterização morfológica

Todos os isolados tiveram os formatos e dimensões médias de conídios (comprimento, largura e relação entre comprimento e largura) avaliados.

Para isso, foram preparadas lâminas semi-permanentes contendo conídios obtidos de colônias de cada isolado, cultivadas em meio de aveia (40 g de aveia, 15 g de agar, 1 litro de água destilada) por 7 dias, sob luz constante e temperatura de 25±1 ºC.

Para a avaliação do formato do conídio, realizou-se uma avaliação prévia visando à determinação dos formatos mais comuns encontrados. Cada formato recebeu uma identificação numérica, a qual foi utilizada para classificação. Posteriormente, a freqüência de cada formato foi avaliada entre 100 conídios de cada isolado.

O comprimento, largura e relação entre o comprimento e a largura dos conídios, foram determinados por meio da avaliação de 50 conídios de cada isolado, utilizando-se sistema de vídeo-câmara instalado em microscópio óptico Opton®, modelo TA-0124XS. A imagem foi transmitida para computador e analisada por meio do programa EDN-2. Para a calibração do equipamento utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (UFLA, Lavras).

Os resultados da classificação morfológica foram comparados com os descritos por Sutton (1992), para a identificação das espécies.

2.2.2.4 Caracterização molecular

2.2.2.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980), modificado. Macerou-se em cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, 0,1 g de massa micélio em 500 µl de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β-mercaptoetanol). Em seguida os tubos foram incubados a 65ºC por 30 minutos. Subseqüentemente, foi adicionado 500 µl clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) aos tubos e estes foram misturados manualmente, por agitação, durante 10 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos que continham isopropanol (v/v). A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e o precipitado obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70% e submetidos a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µl de água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 1:1000 (v/v), contendo 10 mg/mL RNAse A.

A concentração de DNA foi quantificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, comparando visualmente a intensidade das bandas formadas com um padrão de peso conhecido ("High DNA mass ladder" - Invitrogen®). As amostras foram então diluídas até a concentração de 10 ng DNA/µL de suspensão e armazenadas em *freezer* sob temperatura de aproximadamente -20 ºC.

2.2.2.4.2 Identificação com oligonucleotídeos específicos

Para a identificação molecular pela técnica de PCR, primeiramente utilizou-se oligonucleotídeos específicos para o gênero *Colletotrichum*, para confirmar se todos os isolados pertenciam a esse gênero. Em seguida, foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para *C. acutatum, C. gloeosporioides* e para uma espécie de *Colletotrichum* não identificada, que ocorre em frutíferas na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003).

A identificação do gênero *Colletotrichum* foi realizada utilizando-se os pares de oligonucleotídeos Cc1F1 (5'-ACC TAA CTG TTG CTT CGG CG-3') e Cc2R1 (5'-AAA TTT GGG GGT TTT ACG GC-3') (CULLEN et al., 2002). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,3 µM de cada um dos

oligonucleotídeos (Cc1F1 e Cc2R1) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O regime utilizado junto ao termociclador foi de um ciclo de 1 minuto a 94 ºC, 2 minutos a 65 ºC e 2 minutos a 72 ºC, seguido de um ciclo de 1 minuto a 94 ºC, 2 minutos a 63 ºC e 2 minutos a 72 ºC, finalizando com 33 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 2 minutos a 61 ºC e 2 minutos a 72 ºC.

A identificação de *C. acutatum* foi realizada com os oligonucleotídeos CaInt2 (5'-GGG GAA GCC TCT CGC GG-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC--3') (SREENIVASAPRASAD et al., 1996). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (CaInt2 e ITS4) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 ºC, 45 segundos a 62 ºC e 90 segundos a 72 ºC, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 ºC, 45 segundos a 60 ºC e 90 segundos a 72 ºC, finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 45 segundos a 58 ºC e 90 segundos a 72 ºC.

Para a detecção de *C. gloeosporioides* foi utilizado o oligonucleotídeo CgInt (5'-GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG-3'') em conjunto com ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por Mills, Sreenivasaprasad e Brown (1992). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (CgInt e ITS4) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 ºC, 45 segundos a 62 ºC e 90 segundos a 72 ºC, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 ºC, 45 segundos a 60 ºC e 90 segundos a 72 ºC, finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 45 segundos a 58 ºC e 90 segundos a 72 ºC.

Além dos oligonucleotídeos espécie-específicos descritos, também foi utilizado o par de oligonucleotídeo Col1 (5'-GCC GTC CCC TGA AAA G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), os quais foram desenvolvidos para uma espécie de *Colletotrichum* não identificada que ocorre em algumas frutíferas na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). A reação foi realizada com 20 µL de solução em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,0 µL do tampão 10X para PCR, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Col1 e ITS4) e 0,05 U Taq DNA

polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O regime utilizado junto ao termociclador foi de 40 ciclos de 30 segundos a 95 ºC, 30 segundos a 65 ºC e 90 segundos a 72 ºC.

Após a amplificação, os produtos das PCRs foram aplicados em gel de agarose 1% contendo 0,5 µL/mL de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada em corrente constante de 5 volts/cm por 1 h. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta e fotografadas.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se amostras de DNA de isolados padrões das espécies *C. acutatum* (TUT-137) (FREEMAN et al., 2000), *C. gloeosporioides* (AVO-33-4B) (FREEMAN et al., 2000) e *Colletotrichum* sp. (Man-76) , o qual reage com os oligonucleotídeos Col1/ITS4 (AFANADOR-KAFURI et al., 2003).

2.2.2.4.3 Análise das sequências de nucleotídeos das regiões ITS e β-tubulina

Neste experimento foram analisadas as seqüências de nucleotídeos das regiões ITS-5.8S rDNA e β-tubulina.

A região ITS-5.8S rDNA foi amplificada com os pares de oligonucleotídeos ITS 1 (5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3´) e ITS 4 (5´ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´), que geram um fragmento de aproximadamente 750 pb. Para a PCR, empregaram-se 3 µl de DNA total extraído (30ng), tampão 1X da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl2, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo na concentração e 1,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 µl com água tratada com DEPC. O regime de programa utilizado no termociclador foi: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 35 segundos, 52ºC por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, finalizando-se o processo com 72°C por 15 minutos.

A região do gene da β-tubulina foi amplificada com os oligonucleotídeos Bt2-F (5´GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3´) e Bt2-R (5´ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3´), gerando um fragmento de aproximadamente 510 pb. Para a realização da PCR foram empregados as mesmas concentrações de reagentes que foram utilizadas para amplificação da região ITS-5.8S rDNA. Porém, o regime de programa utilizado no termociclador foi: 94ºC por 2 minutos, 35 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 54,3ºC por 1 minuto, 72ºC por 1 minuto, finalizando-se o processo com 72ºC por 10 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta. Para seqüenciamento dos fragmentos

amplificados, 100 µl do produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®). O seqüenciamento foi realizado conforme protocolo descrito pela empresa Macrogen, Seul, Coréia do Sul, utilizando-se o kit BigDye™ Terminator Cycling, em seqüenciador automático 3730xl. As sequências obtidas foram editadas e concatenadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005).

As seqüências obtidas foram alinhadas e processadas com o programa Mega 5.05 para construção da árvore filogenética dos isolados estudados, utilizando o método "p-distance" (NEI; KUMAR, 2000) para a construção da matriz de distâncias, pelo método de Neighbor-Joining. Foi realizado um "bootstrap" com 10.000 replicações.

2.2.2.5 Caracterização patogênica

2.2.2.5.1 Agressividade no hospedeiro de origem

Neste experimento avaliou-se a agressividade do isolado em seu hospedeiro de origem.

Para isso foram inoculados abacates 'Fuerte', mangas 'Palmer', maracujás 'Afruvec' e pêssegos 'Douradão'. Utilizou-se como inóculo disco de meio BDA com 6 mm de diâmetro contendo estruturas do fungo proveniente das extremidades de colônias cultivadas por 5 dias sob luz contínua a 25±1 ºC. A inoculação foi realizada pela deposição de um disco no centro de frutos previamente desinfestados com álcool (70%) e hipoclorito de sódio (0,5%), após realização de ferimentos com furador de 6 mm esterilizado, sendo o ferimento caracterizado pela retirada da epiderme do fruto na área abrangida pelo furador. Frutos inoculados apenas com disco de meio BDA não colonizado, conforme o método descrito anteriormente, foram utilizados como controle.

Os frutos inoculados foram incubados no escuro, a 25±1 ºC por 24 horas em bandejas plásticas contendo papéis de filtro umedecidos com água destilada esterilizada em seu interior, sendo estas fechadas com sacos de polietileno. Posteriormente, os frutos foram retirados das câmaras úmidas e mantidos no escuro, a 25±1 ºC, por mais seis dias (abacate e manga), quatro dias (pêssego) ou nove dias (maracujá). Ao final do experimento diâmetros perpendiculares das lesões foram mensurados com paquímetro.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por um fruto inoculado. Os resultados foram analisados por meio da aplicação do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (UFLA, Lavras).

2.2.2.5.2 Patogenicidade cruzada

Com base nos resultados do item 2.2.2.5.1, isolados pertencentes a cada espécie e agressivos em seus hospedeiros, foram inoculados em abacate (‘Fuerte’), manga (‘Palmer’), maracujá (‘Afruvec’) e pêssego (‘Douradão’).

A inoculação foi realizada utilizando-se dois métodos: (i) disco contendo estruturas do fungo em frutos feridos; (ii) suspensão de esporo (10^5 conídios/mL) em frutos feridos com agulha histológica.

Para o método “i” utilizou-se protocolo descrito no item 2.2.2.5.1. Para o método “ii”, gotas contendo 40 µL de suspensão com 10^5 esporos/mL foram depositadas sobre a epiderme, na região mediana dos frutos (previamente desinfestados com álcool (70%) por 1 minuto e hipoclorito de sódio (0,5%) por 1,5 minutos), posteriormente estes foram feridos com agulha histológica esterilizada na região de deposição da gota. Frutos inoculados utilizando o mesmo protocolo, porém apenas com disco de BDA não colonizado ou com água destilada esterilizada, foram utilizados como controle.

Os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas desinfestadas contendo papéis de filtro umedecidos com água destilada esterelizada, devidamente fechadas com sacos de polietileno e incubadas no escuro, sob temperatura de 25±1ºC, por 24 horas. Passado este período os frutos foram retirados das câmaras úmidas, permanecendo no escuro a 25±1ºC por mais seis dias. Decorrido este período as lesões tiveram diâmetros perpendiculares mensurados, com auxílio de um paquímetro.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por um fruto inoculado. Os resultados foram analisados por meio da aplicação do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (UFLA, Lavras).

2.2.2.6 Caracterização enzimática

Discos com (5 mm de diâmetro) de BDA Acumedia® contendo estruturas do fungo foram retirados do bordo de colônias cultivadas por 5 dias no escuro sob temperatura de 25ºC±1 e repicados individualmente para o centro de placas de Petri, contendo cada um dos meios descritos nos itens abaixo, com objetivo de avaliar a atividade das enzimas amilase, celulase, lípase, proteinase, lacase, pectinase e catalase.

2.2.2.6.1 Atividade da amilase

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 $MgSO_4.{}_7H_2O$, 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 25º C sob fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias de cultivo foi aplicado em cada placa 2 mL de solução lugol (5 g de Kl, 1 g de iodo, 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 oriundo da 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-se as respectivas áreas. A área do halo de degradação oriundo da atividade da enzima foi obtida subtraindo a área da colônia (PEREIRA, 2009).

2.2.2.6.2 Atividade da celulase

Os isolados foram cultivados em ágar carboximetilcelulose (1 g de KH_2PO_4, 0,5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g de asparagina, 0,5 g de KCl, 0,2 g de $MgSO_4$.7H2O, 0,1 g de $CaCl_2$, 0,5 g de extrato de leveduras, 10 g de carboximetilcelulose, 20 g de ágar, 1 L de água destilada). As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 ºC no escuro e em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50 ºC. 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, visando 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 no item 2.2.2.6.1.

2.2.2.6.3 Atividade da lipase

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 $CaCl_2.2H_20$, 20 g

de ágar, 0,01 g de rodamina, 10 mL de Tween 20 (esterilizado separadamente), 1 L água destilada, pH 6,0).

As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 ºC no escuro e em seguida incubadas a 4ºC por 48h. 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 lípolítica foi realizada de acordo com o item 2.2.2.6.1.

2.2.2.6.4 Atividade da proteinase

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

Para isso, os isolados foram cutivados em placas de petri contendo meio solidificado composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g NaCl, 15 g de ágar, 0,4 g gelatina e 1 L de água, em pH 6,0. A gelatina foi autoclavada separadamente e misturada ao meio antes de verte-lo para as placas.

As colônias foram incubadas por 48 horas a 25 ºC no escuro. Após este período o halo, caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia contrastante 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 de acordo com o item 2.2.2.6.1.

2.2.2.6.5 Atividade da lacase

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 verte-lo para as placas. As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 ºC 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 da lacase foi avaliada conforme descrito no item 2.2.2.6.1.

2.2.2.6.6 Atividade da pectinase

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

Para isso, os isolados foram cultivados em meio de cultura sólido composto de 500 mL de solução mineral (2 g de $(NH_4)_2S0_4$, 4 g de KH_2PO_4, 6 g de Na_2HPO_4, 0,2 g de $FeSO_4.7H_20$, 1 mg de $CaCI_2$, 10 µg de H_3BO_3, 10 µg de $MnSO_4$, 70 µg de $ZnSO_4$, 50 pkg de $CuSO_4$, 10 µg de MoO_3) + 500 mL de solução de pectina (1 g de extrato de levedura, 15 gramas de ágar, 5 gramas de pectina cítrica). O meio foi ajustado para pH 7,0.

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

A área do halo decorrente da atividade da pectinase foi determinada conforme o item 2.2.2.6.1.

2.2.2.6.7 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi avaliada segundo Santos (2007).

As colônias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio BDA a 25 ºC, sob fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Decorrido este período aplicou-se 10 mL de H_2O_2 (10%) em cada placa. Observou-se a ocorrência de produção de gás (borbulhamento na solução aplicada) após 30 segundos, o que indicou o resultado positivo, isto é, a produção da enzima catalase pelo fungo, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio.

2.2.2.6.8 Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado, em todos os experimentos da caracterização enzimática, foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a parcela experimental representada por uma placa de Petri contendo um isolado.

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 Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se para as análises o programa estatístico Sisvar (UFLA, Lavras).

2.2.3 Efeito da temperatura e período de molhamento sobre a pré-penetração infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates 'Hass' e 'Fuerte'.

2.2.3.1 Isolado utilizado

Para todos os experimentos utilizou-se o isolado monospórico “AV-05”, obtido de abacate ‘Fuerte’, oriundo de Bauru-SP e identificado como sendo *C. gloeosporioides* por meio de características morfo-culturais e moleculares.

Este isolado foi escolhido por suas boas características de esporulação e germinação de conídios após a realização de testes preliminares.

2.2.3.2 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*

Neste experimento foram utilizados abacates ‘Fuerte’, provenientes da fazenda Jaguacy, localizada em Bauru, SP. Estes frutos foram previamente desinfestados por imersão em álcool 70% por 1 minuto e em seguida por imersão em hipoclorito de sódio 0,5%, por 2 minutos, sendo posteriormente lavados com água destilada esterilizada e secos a temperatura ambiente por 4 horas.

Os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas desinfestadas contendo papéis de filtro umedecidos com água destilada esterelizada. A inoculação foi realizada por meio da deposição de gotas contendo 40 µL de suspensão com conídios com 10^5 conídios/mL. Posteriormente, as bandejas foram fechadas com plástico e acondicionadas em câmara de crescimento, no escuro, sob as temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40±1ºC. Decorrido os períodos de molhamento 3, 6, 12 e 24 horas, os frutos foram retirados da câmara úmida e secos. Em seguida, na área de tecido vegetal inoculada, foi aplicada uma película de esmalte transparente. Após uma hora, a película foi cuidadosamente retirada, colocada sobre lâmina de vidro contendo 5 µL de lactoglicerol e visualizada ao microscópio óptico sob aumento de 400 vezes (AGOSTINI; TIMMER, 1994; MORAES, 2009).

Foram avaliados 100 conídios em cada repetição, sendo quantificadas as porcentagens de conídios germinados e de conídios com apressórios formados. Foi considerado germinado, o conídio que apresentou tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento do mesmo, ou aquele que mesmo apresentando tubo germinativo menor, formou apressório (SOARES, 2008).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo realizado duas vezes, simultaneamente.

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de regressões não-lineares, utilizando o software STATISTICA 6.0 (Statsoft, Tulsa). Os dados da germinação de conídios

e formação de apressórios em função da temperatura e período de molhamento foram analisados por meio de regressões não-lineares, através do modelo beta-monomolecular (HAU; KRANZ, 1990), descrito pela equação Z=[B1*((T-B2)B3)*((B4-T)B5)]*[B6*(1-B7*exp(-B8*M))] em que, Z corresponde a taxa de germinação de conídios ou de formação de apressórios, T representa a temperatura (°C), M corresponde ao período de molhamento (horas), B2 e B4 representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B5 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica, B8 está relacionado à velocidade de aumento da variável dependente em função do molhamento e B1, B3, B6 e B7 são parâmetros do modelo.

2.2.3.3 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na infecção e colonização de *C. gloeosporioides* em abacates 'Hass' e 'Fuerte'

Para os experimentos foram utilizados abacates das variedades 'Hass' e 'Fuerte' provenientes do *packinghouse* da empresa Jaguacy, localizado em Bauru, SP e do CEASA de Campinas, SP.

Os frutos foram lavados com detergente neutro e desinfestados pela imersão em álcool 70% durante 1 minuto e em hipoclorito de sódio 0,5% por 2 minutos, sendo posteriormente lavados com água destilada esterilizada e secos a temperatura ambiente por 4 horas. Em seguida, foram acondicionados em bandejas plásticas previamente desinfestadas, contendo papéis de filtro umedecidos com água destilada esterelizada.

A inoculação foi realizada por meio da deposição de 40 µL de suspensão contendo 10^5 conídios/mL no centro de cada fruto, sendo, posteriormente, realizado um ferimento com agulha histológica esterilizada na epiderme do fruto, a profundidade de aproximadamente 3 mm, na região de deposição da suspensão de conídios. Frutos inoculados apenas com água destilada esterilizada, seguindo o mesmo protocolo, foram utilizados como controle.

Após a inoculação, as bandejas contendo os frutos foram fechadas com sacos plásticos e incubadas em câmaras de crescimento sob temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30±1ºC e períodos contínuos de molhamento de 6, 12 e 24 horas, no escuro.

Avaliaram-se diariamente, os períodos de incubação e de latência, a incidência de frutos com antracnose e o diâmetro médio de cada lesão, sendo obtida a taxa de progresso da lesão em um período de 12 dias após a inoculação.

O experimento foi realizado duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental representada por um fruto inoculado.

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de regressões não-lineares, utilizando o software STATISTICA 6.0 (Statsoft, Tulsa). A taxa de progresso da lesão e diâmetro da lesão em função da temperatura e período de molhamento foram analisados por meio de regressões não-lineares, através do modelo beta-monomolecular (HAU; KRANZ, 1990), descrito pela equação Z=[B1*((T-B2)B3)*((B4-T)B5)]*[B6*(1-B7*exp(-B8*M))] em que, Z corresponde a taxa de progresso da lesão (mm/dia) ou diâmetro da lesão (mm); T representa a temperatura (°C), M corresponde ao período de molhamento (horas), B2 e B4 representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B5 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica, B8 está relacionado à velocidade de aumento da variável dependente em função do molhamento e B1, B3, B6 e B7 são parâmetros do modelo.

2.2.4 Controle da antracnose em abacates com fungicidas e sanitizantes

Abacates 'Hass' obtidos em agosto e setembro de 2008, procedentes de Bernardino de Campos, SP, foram uniformizados quanto à ausência de defeitos, lavados com detergente neutro e imersos por 30 segundos em suspensão contendo os seguintes defensivos ou sanitizantes (doses em mg ou µL/L): água (testemunha), azoxistrobina (75), cloreto de benzalcônio (1000), dióxido de cloro (150 de cloro ativo), Ecolife® (4000), hipoclorito de sódio (150 de cloro ativo), imazalil (1000), procloraz (1000) e tiabendazol (1000).

Após a aplicação dos tratamentos e secagem dos frutos, estes foram mantidos por 24 horas, a 25°C, no escuro, em bandejas plásticas, previamente desinfestadas, contendo papéis de filtro umedecidos com água destilada esterelizada e fechadas com sacos de polietileno. Posteriormetne, os frutos foram retirados da câmara úmida e mantidos por mais 13 dias em condições similares, sendo avaliados quanto à incidência de sintomas das doenças pós-colheita a cada dois dias.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com nove tratamentos e 20 frutos por tratamento.

O experimento foi realizado duas vezes. Diferenças entre os tratamentos foram verificadas pelo teste não paramétrico de comparação de múltiplas proporções, em nível de 5% (ZAR, 1999).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Identificação e quantificação de danos pós-colheita em abacates 'Fuerte' e 'Hass' em *packinghouse*

As amostragens de abacates das variedaddes 'Fuerte' e 'Hass' realizadas em *packinghouse* localizado no município de Bauru, Estado de São Paulo, revelaram a ocorrência de três doenças fúngicas em pós-colheita: antracnose, podridão de fusicocum e podridão de lasiodiplodia (Tabela 2).

Os sintomas da antracnose nos frutos foram caracterizados pela presença de lesões necróticas, recobertas por massas de esporos de coloração alaranjada na superfície do fruto, em contraste com as lesões cobertas com micélio cinza de *Fusicoccum* spp. e *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 1).

A antracnose foi a principal doença pós-colheita nas duas variedades. A incidência média da doença após 15 dias de armazenamento a 25°C foi de 45,7% para o abacate 'Fuerte' e de 68,7% para o abacate 'Hass' (Tabela 2).

De maneira semelhante ao que foi observado neste trabalho, altas incidências da antracnose foram constatadas no mercado varejista de Recife, Estado de Pernambuco, onde 38,5% dos abacates amostrados apresentaram podridões, sendo que 41,5% destas corresponderam à antracnose (SILVEIRA et al., 2001). Esta doença também se mostrou importante na África do Sul e na Austrália, onde foram constatadas incidências próximas a 30% (BEZUIDENHOUT; KUSCHKE, 1983) e 90% (WILLINGHAM et al., 2006), respectivamente.

As incidências da podridão de lasiodiplodia e da podridão de fusicocum foram significativamente menores que da antracnose (Tabela 2). A podridão de lasiodiplodia ocorreu em 4% dos frutos de ambas as variedades, enquanto a podridão de fusicocum afetou 7% dos abacates 'Fuerte' e 3% dos abacates 'Hass'. A ocorrência dessas duas doenças, segundo Pegg et al. (2002), é comum na maioria das regiões produtoras de abacate, mas estas são geralmente menos importantes que a antracnose, fato que corresponde às observações realizadas no presente trabalho.

As incidências totais de podridões em abacates 'Fuerte' e 'Hass' diferiram estatisticamente entre as etapas de beneficiamento em *packinghouse*, ao final dos 15 dias de armazenamento a 25ºC e 70-75% de umidade relativa do ar. Observou-se redução da incidência total de podridões nos frutos amostrados no palete em relação aos da chegada e

aumento da incidência nos frutos beneficiados que permaneceram na câmara a 5ºC por 30 dias.

Diferenças na incidência de antracnose entre as etapas de beneficiamento foram verificadas a partir do quarto dia de armazenamento a 25ºC, com maior incidência nos frutos previamente armazenados em câmara fria (Figura 2). A maior incidência de antracnose nos frutos da chegada em relação aos do palete também foi observada a partir do 11º dia de armazenamento para 'Hass' e 13º dia para 'Fuerte'

A menor ocorrência de podridões nos abacates amostrados no palete está possivelmente relacionada com a aplicação de cera de carnaúba, que confere proteção aos frutos e retarda o processo de amadurecimento (DARVAS; KOTZE; WEHNER, 1990), conseqüentemente atrasando o desenvolvimento dos patógenos quiescentes. No caso do abacate 'Fuerte', pode também ter havido efeito do procloraz no controle do fungo. Este fato já foi constatado por Powell (1988), o qual observou que o tratamento de abacates com cera reduziu severamente a antracnose, principalmente quando essa foi associada ao fungicida procloraz.

Outro fator a ser considerado na redução da antracnose com o beneficiamento foi a retirada de frutos com verrugose pelo processo de seleção manual (Tabela 3), doença que, segundo Palmateer, Ploetz e Harmon (2006) favorece a infecção dos frutos por *Colletotrichum* spp.

Por sua vez, a maior incidência de podridões em frutos previamente armazenados em câmara fria pode ter sido favorecida por alterações fisiológicas nos mesmos. De acordo com Hopkirk, White e Beever (1994), após o armazenamento refrigerado o abacate 'Hass' deve ser amadurecido a 15ºC, pois a 25ºC, como empregado neste trabalho, a qualidade do fruto é afetada.

As injúrias de batida e lesão não cicatrizadas foram crescentes com o beneficiamento dos abacates 'Fuerte' e 'Hass' (Tabela 3). Do total de aumento das injúrias não cicatrizadas observadas em abacates 'Fuerte' e 'Hass', amostrados no palete, 52,2 e 74,4%, respectivamente, foram decorrentes do processo de aparação manual do pedúnculo, com tesoura. Lesões cicatrizadas, decorrentes do atrito das folhas com os frutos foram decrescentes nas duas variedades, assim como lesões de verrugose (*Sphaceloma persea*) em abacate 'Fuerte', evidenciando rigorosa seleção manual para estes defeitos que depreciam a aparência dos frutos. Sintomas de cercosporiose (*Cercospora purpurea*) ocorreram em menor

freqüência nos frutos (2-5%), não havendo diferenças significativas entre as etapas amostradas.

O aumento na incidência de injúrias mecânicas (batida e lesão não cicatrizada) com o beneficiamento não influenciou a ocorrência da antracnose, sendo, entretanto, observada diminuição no total desta doença nos frutos do palete, resultado que diverge do constatado por Palmateer, Ploetz e Harmon (2006) que atribuem aos ferimentos a favorabilidade do processo infectivo de *Colletotrichum* em abacate.

O fato da infecção iniciar ainda no campo e permanecer quiescente durante a pós-colheita (PRUSKY; KEEN; EAKS, 1983) ajuda a explicar a ausência de correlação entre as podridões e injúrias mecânicas ocorridas durante o beneficiamento. Assim, possivelmente os sintomas observados em pós-colheita foram predominantemente decorrentes de infecções quiescentes, iniciadas durante a fase de cultivo.

Tabela 2 - Incidência (%)[1] de doenças pós-colheita em abacates 'Fuerte' e 'Hass' oriundos de diferentes etapas do beneficiamento em *packinghouse* após 15 dias de armazenamento a 25ºC

Doenças	Abacate 'Fuerte'				Abacate 'Hass'			
	Etapas do beneficiamento				Etapas do beneficiamento			
	Chegada[3]	Palete[4]	Câmara[5]	Média	Chegada[3]	Palete[4]	Câmara[5]	Média
Antracnose	42,0 bA[2]	25,0 cA	70,0 aA	45,7 A	85,0 aA	31,0 bA	90,0 aA	68,7 A
Podridão de fusicocum	8,0 aB	3,0 aB	10,0 aB	7,0 B	1,0 bB	6,0 aB	2,0 abB	3,0 B
Podridão de lasiodiplodia	3,0 aB	2,0 aB	7,0 aB	4,0 B	1,0 bB	10,0 aB	1,0 bB	4,0 B
Total	53,0 b	30,0 c	87,0 a	56,7	87,0 a	47,0 b	93,0 a	75,7

[1] Média de duas amostragens de 50 frutos, procedentes de Bauru ('Fuerte'), Olímpia ('Hass') e Bernardino de Campos, SP ('Hass')

[2] Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si para cada variedade, em nível de 5% pelo teste não paramétrico de comparação de múltiplas proporções

[3] Chegada: frutos coletados nos engradados plásticos transporte, no momento da chegada ao *packinhouse*

[4] Palete: frutos coletados em caixas de papelão do palete, após tratamento por imersão em procloraz (1000 mg L^{-1}) (apenas abacate 'Fuerte'), aparação dos pedúnculos e seleção manual dos frutos injuriados, aplicação de cera e classificação automatizada por massa

[5] Câmara: frutos beneficiados, coletados após 30 dias de armazenamento refrigerado a 5ºC.

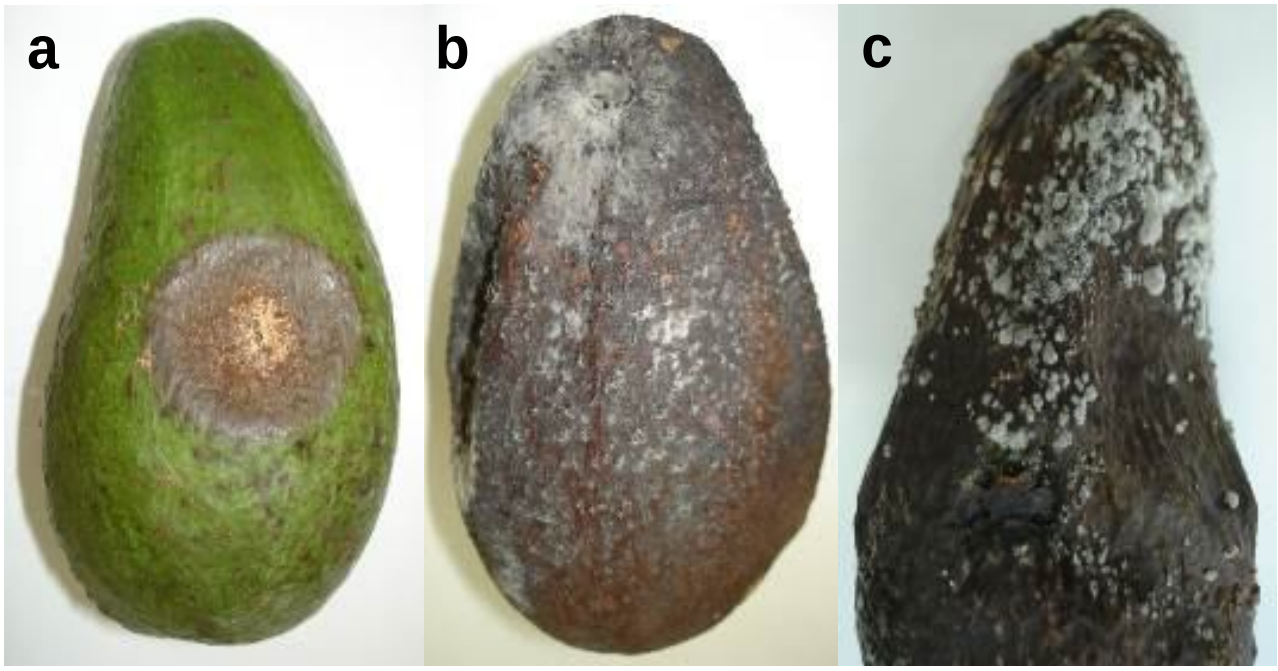

Figura 1 - Sintomas da antracnose (a), podridão de lasiodiplodia (b) e podridão de fusicocum (c) em abacate

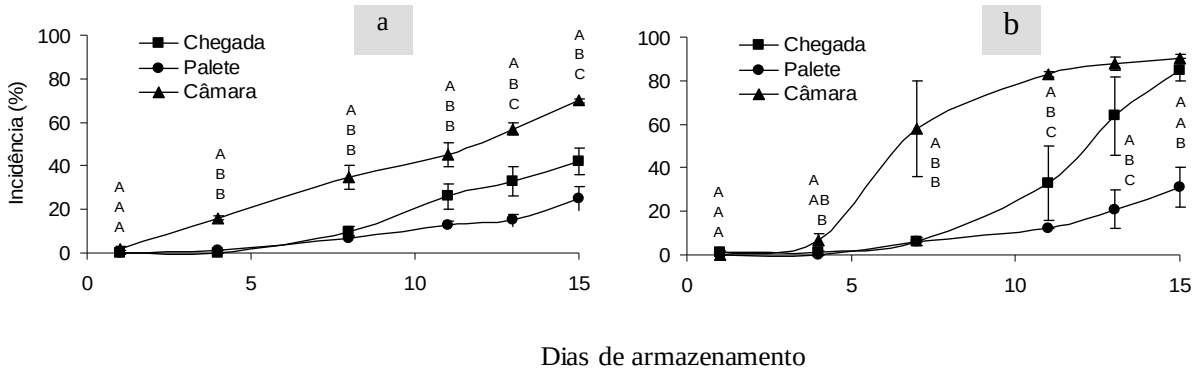

Figura 2 - Progresso da incidência (%) de antracnose em abacates 'Fuerte' (a) e 'Hass' (b) durante 15 dias de armazenamento a 25ºC. Chegada: frutos coletados nos engradados plásticos transporte, no momento da chegada ao *packinhouse*; Palete: frutos coletados em caixas de papelão do palete, após tratamento por imersão em procloraz (1000 mg L^{-1}) (apenas abacate 'Fuerte'), aparação dos pedúnculos e seleção manual dos frutos injuriados, aplicação de cera e classificação automatizada por massa; Câmara: frutos beneficiados, coletados após 30 dias de armazenamento refrigerado a 5ºC. Valores seguidos pela mesma letra na vertical não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste não paramétrico de comparação de múltiplas proporções. Barras verticais representam o erro padrão

Tabela 3 - Incidência (%)[1] de injúrias em abacates 'Fuerte' e 'Hass', antes e após o beneficiamento em *packinghouse*

Injúrias	Etapas do beneficiamento-Fuerte		Etapas do beneficiamento-Hass	
	Chegada[3]	Palete[4]	Chegada	Palete
Batida	9 b[2]	52 a	6 b	24 a
Lesão não cicatrizada	20 b	43 a	19 b	58 a
Lesão cicatriz. (>1<2cm^2)	49 a	20 b	28 a	32 a
Lesão cicatrizada (>2cm^2)	5 a	0 b	9 a	2 b
Verrugose	60 a	32 b	28 a	20 a
Cercosporiose	4 a	2 a	5 a	2 a

[1] Média de duas amostragens de 50 frutos, procedentes de Bauru ('Fuerte'), Olímpia ('Hass') e Bernardino de Campos-SP ('Hass')

[2] Valores seguidos pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si para cada variedade, em nível de 5% pelo teste não paramétrico de comparação de múltiplas proporções

[3] Chegada: frutos coletados nos engradados plásticos transporte, no momento da chegada ao *packinhouse*

[4] Palete: frutos coletados em caixas de papelão do palete, após tratamento por imersão em procloraz (1000 mg L^{-1}) (apenas abacate 'Fuerte'), aparação dos pedúnculos e seleção manual dos frutos injuriados, aplicação de cera e classificação automatizada por massa

2.3.2 Caracterização, identificação e análise comparativa de isolados de *Colletotrichum* do abacateiro e outras frutíferas

2.3.2.1 Caracterização cultural

As colônias, após cinco dias de cultivo à 25ºC sob fotoperíodo de 12 horas, apresentaram crescimento denso e cotonoso. Para 60,2% dos isolados a cor da parte superior da colônia foi predominantemente branca-acizentada enquanto os demais isolados tiveram colônias cinzas (Figura 3). O reverso da colônia foi predominantemente castanho para 86,1 % dos isolados, salmão para 12,9% dos isolados e apenas um isolado (AV-22) teve reverso da colônia predominantemente cinza. Não houve produção de escleródios e setas para nenhum isolado e apenas 29% deles produziram massas conidiais de cor laranja (Tabela 4).

Comparando-se os resultados da Tabela 4 com as descrições de Sutton (1992) para espécies de *Colletotrichum,* observa-se a maior semelhança dos isolados avaliados com duas espécies: *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Segundo o autor, *C. acutatum* produz colônias brancas tornando-se cinza a castanho acinzentado, com reverso rosa ou carmim, sem escleródios e com massa de conídios rosa, salmão ou laranja. Por sua vez, *C. gloeosporioides*

produz colônia branca acinzentada a cinza escuro, com reverso branco a cinza escuro, sem escleródios, podendo ou não produzir setas e conídios em massas de cor salmão pálida.

De acordo com as descrições deste autor, todos os isolados assemelham-se tanto à *C. gloeosporioides* como a *C. acutatum* em relação à coloração superior da colônia e a ausência de escleródios e setas. Ao considerarmos a cor do reverso da colônia, entretanto, observamos que, com exceção de AV-22, que apresentou reverso cinza, os isolados não se enquadraram nas descrições de Sutton (1992) para nenhuma dessas duas espécies. Apesar disto, colônias com reverso castanho ou salmão, similares as que foram constatadas neste trabalho, já foram observadas tanto para *C. gloeosporioides* quanto para *C. acutatum* (TOZZE JÚNIOR, 2007; ANDRADE et al., 2007; PEREIRA, 2009; PIMENTA, 2009), demonstrando que a variação intraespecífica da cor do reverso da colônia é maior do que Sutton (1992) cita para essas espécies.

Em relação à cor laranja das massas conídiais, notou-se que esta foi compatível com as descrições de Sutton (1992) apenas para *C. acutatum*. Contudo, alguns trabalhos não corroboram as informações deste autor e relatam a existência de massas conidiais laranja também para *C. gloeosporioides*, fato já constatado inclusive para isolados obtidos de abacate (SILVA-ROJAS; ÁVILA-QUEZADA, 2011) e manga (PIMENTA, 2009). Portanto, assim como a coloração do reverso da colônia, a cor da massa de conídios parece não ter valor relevante na taxonomia de *Colletotrichum*. Constatação similar foi feita por Smith e Black (1990), os quais concluíram que a cor da massa de conídios não poderia servir como um critério de separação de espécies de *Colletotrichum* associadas ao morangueiro estudadas pelo autor, devido à sobreposição desta característica entre isolados.

Considerando o crescimento das colônias sob as diferentes temperaturas, nota-se que todos os isolados, independente do hospedeiro ou região de origem, desenvolveram-se melhor entre 20 e 30ºC, faixa considerada adequada para o desenvolvimento de isolados de *C. gloeosporioides* (SANGEETHA; RAWAL, 2009; QUIMIO; QUIMIO, 1975; AHMED, 1985). Esses resultados correspondem às temperaturas médias comumente constatadas nos municípios de origem desses isolados (MIRANDA et al., 2011).

Para todos os isolados houve maior desenvolvimento de colônias a 25ºC, com exceção de AV-09, que se desenvolveu melhor a 30ºC. De acordo com Adaskaveg e Hartin (1997), *C. acutatum* desenvolve-se melhor a 25ºC enquanto *C. gloeosporioides* apresenta maior crescimento de colônias quando incubado a 30ºC. Por outro lado, alguns trabalhos citam

isolados de *C. gloeosporioides* cujo crescimento de colônias é mais intenso a 25ºC (RAJAK, 1983; PIMENTA, 2009; TOZZE JÚNIOR, MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

Em todas as temperaturas, observou-se grande variabilidade entre isolados, independente do hospedeiro de origem. A 25ºC, os isolados foram classificados em 13 grupos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 4). Nesta temperatura, a amplitude desta variável foi de 8,2 a 12,8 mm/dia entre os isolado de abacate, 7,0 a 12,6 mm/dia entre os isolados de manga, 6,5 a 12,5 mm/dia entre os isolados de maracujá e entre 6,4 e 12,1 mm/dia para os isolados de pêssego.

A taxa de crescimento de colônias tem sido utilizada na taxonomia de *Colletotrichum* para distinção de espécies e é considerada por Vinnere (2004) uma característica estável e útil para distinção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides,* sendo que a primeira espécie é relatada como tendo menor crescimento do que a segunda (SUTTON, 1992). Este fato foi confirmado no trabalho de Adaskaveg e Hartin (1997), os quais constataram que isolados de *C. acutatum* de morango, amêndoa, pêssego apresentaram taxa de crescimento inferior a 10 mm/dia, enquanto que isolados de *C. gloeosporioides* de citros e mamão apresentaram taxa de crescimento maior que 10 mm/dia, quando cultivados a 25ºC. Resultados similares foram constatados para isolados obtidos de pimentão, cultivados em BDA a 25ºC, onde aqueles pertencentes à espécie *C. gloeosporioides* apresentaram colônias com taxa de desenvolvimento superior a 10 mm/dia, enquanto os pertencentes à espécie *C. acutatum* tiveram menor taxa de desenvolvimento, mais próxima a 8 mm/dia (TOZZE JÚNIOR; 2007).

No presente trabalho, 60,2% dos isolados apresentaram colônias com crescimento superior a 10 mm/dia quando incubados a 25ºC (Tabela 4), o que corresponde aos resultados observados pelos autores acima citados para a espécie *C. gloeosporioides,* enquanto alguns isolados apresentaram crescimento mais próximo ao que Tozze Júnior (2007) constatou para isolados de *C. acutatum* de pimentão.

Apesar da taxa de crescimento ser comumente utilizada para distinção das espécies citadas, Freeman, Katan e Shabi (1998) observaram que as colônias de isolados de *C. gloeosporioides* de amendoeira tiveram menor crescimento que os isolados dessa mesma espécie obtidos de abacate e não diferiram estatisticamente de isolados de *C. acutatum* de morangueiro. Desta forma, o uso desta característica para distinção de espécies também pode levar a resultados equivocados e deve ser utilizado com cautela.

Nas análises realizadas com base no crescimento médio das colônias nas diferentes temperaturas (Figura 4), foi observada a existência de padrões distintos entre hospedeiros.

Este fato fica ainda mais evidente quando se compara a taxa de crescimento das colônias de um mesmo isolado quando cultivadas à 35ºC com as cultivadas à 25ºC.

Para todos os isolados houve uma grande redução no desenvolvimento das colônias incubadas a 35ºC, porém observou-se maior redução para os isolados de manga, que em média cresceram 78,9% a menos quando a temperatura de incubação passou de 25 ºC para 35ºC.

Entre os isolados de maracujá e pêssego, houve uma grande variabilidade entre os isolados, alguns sofreram uma drástica redução na taxa de desenvolvimento enquanto outros foram poucos inibidos quando cultivados à 35ºC. Em média, a redução do crescimento das colônias foi de 62,4% entre os isolados de maracujá e de 45,4% entre os isolados de pêssego. Para os isolados de abacate houve menor variação e a redução média no crescimento das colônias incubadas a 35ºC foi de 52,9%, quando comparadas às colônias incubadas a 25ºC.

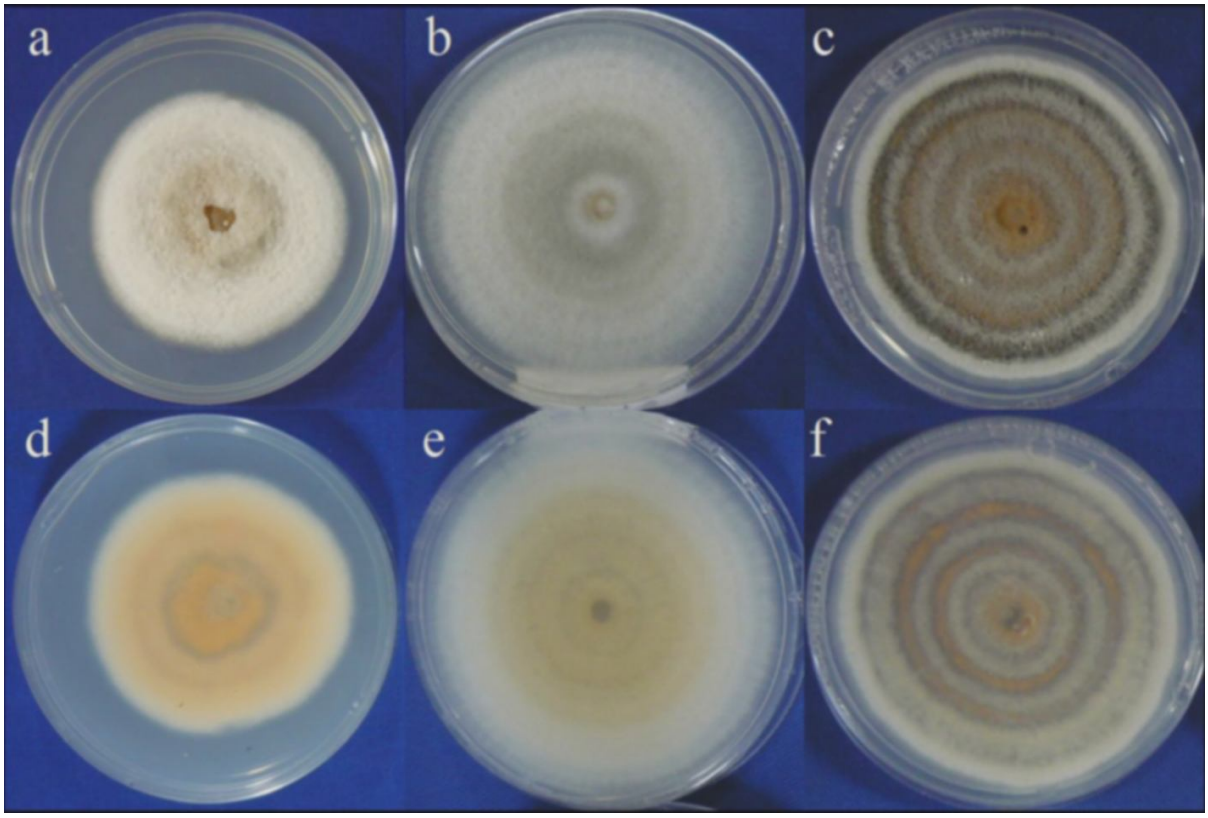

Figura 3 – Aspectos de colônias de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp., cultivadas a 25ºC em meio batata-dextrose-ágar: Colônia branca acinzentada no centro com reverso salmão com massa conidial laranja no centro (a,d), colônia cinza clara com reverso castanho (b,e), colônia cinza com reverso cinza e massas conidiais laranja em anéis concêntricos (c,f)

Tabela 4 – Características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. de abacate, manga, maracujá e pêssego: Taxa de crescimento de colônias cultivadas em meio batata-dextrose-ágar sob fotoperíodo de 12 horas em diferentes temperaturas, cor predominante da colônia e presença de massas de conídios

(continua)

Isolado	Taxa de crescimento da colônia (mm/dia)					Cor predominante da colônia[2]	Massa
	15ºC	20ºC	25ºC	30ºC	35ºC	(parte superior / reverso)	conidial[2,3]
AV-01	6,4 a[1]	8,5 b	9,4 h	9,1 e	5,7 e	Branca acinzentada / castanho	-
AV-02	4,5 f	8,1 c	12,3 b	9,8 c	5,1 f	Branca acinzentada / castanho	-
AV-03	5,3 c	8,5 b	9,4 h	8,6 f	5,3 f	Cinza / castanho à cinza	+
AV-04	4,7 e	6,9 f	10,2 g	7,9 h	7,8 b	Branca acinzentada / castanho	-
AV-05	4,9 e	6,9 f	12,3 b	9,5 d	7,9 b	Cinza claro / castanho à cinza	+
AV-06	5,3 c	8,3 c	10,8 e	8,9 e	5,3 f	Branca acinzentada / castanho	-
AV-07	5,7 b	7,9 d	12,2 b	9,8 c	5,0 f	Branca acinzentada / castanho	-
AV-08	5,8 b	7,8 d	10,4 f	7,8 h	3,6 h	Branca acinzentada / Branca a salmão	+
AV-09	6,7 a	8,7 b	9,4 h	9,8 c	6,6 c	Branca acinzentada / castanho	-
AV-10	4,3 f	8,5 b	10,1 g	8,6 f	4,0 h	Branca acinzentada / castanho	-
AV-11	5,8 b	8,0 c	10,8 e	8,6 f	2,6 i	Branca acinzentada / castanho	-
AV-12	4,2 f	7,7 d	10,2 g	8,4 f	3,5 h	Cinza claro / castanho à cinza	-
AV-13	4,5 f	8,1 c	12,6 a	9,6 c	3,2 i	Cinza claro / castanho à cinza	+
AV-14	5,7 b	8,5 b	9,7 h	8,5 f	6,0 d	Branca acinzentada / salmão	+
AV-15	4,9 d	7,8 d	11,5 c	10,1 a	5,0 f	Branca acinzentada / castanho	-
AV-16	5,1 d	9,1 a	11,6 c	10,1 a	4,1 h	Cinza claro / castanho à cinza	+
AV-17	3,5 i	6,0 h	8,2 j	6,5 k	6,9 c	Cinza claro / salmão	+
AV-18	4,5 f	8,8 a	11,6 c	9,3 d	2,0 j	Branca acinzentada / castanho	-
AV-19	3,7 h	4,4 k	10,4 f	9,9 b	6,2 d	Branca acinzentada / castanho	-
AV-20	4,5 f	8,0 c	11,6 c	9,3 d	5,8 e	Branca acinzentada / castanho	-
AV-21	5,6 b	8,2 c	12,2 b	10,2 a	7,0 c	Cinza claro / castanho à cinza	+
AV-22	4,6 f	7,3 e	11,2 d	10,0 b	5,6 e	Cinza / cinza	+
AV-23	5,2 c	8,5 b	12,3 b	8,3 g	5,1 f	Cinza / castanho à cinza	-
AV-24	3,7 h	6,0 h	8,2 j	8,1 g	3,4 h	Branca acinzentada / castanho	-
AV-25	4,2 f	7,1 e	10,2 g	9,4 d	5,3 f	Branca acinzentada / castanho	-
AV-26	5,0 d	8,9 a	12,8 a	10,3 a	4,5 g	Branca acinzentada / castanho	-
AV-27	5,9 b	8,5 b	11,1 d	8,6 f	6,2 d	Branca acinzentada / castanho	-
AV-28	5,4 c	8,0 c	12,7 a	9,5 d	7,1 c	Branca acinzentada / castanho	-
AV-29	3,7 h	6,5 g	9,3 h	7,0 i	5,6 e	Branca acinzentada / salmão	+
AV-30	5,1 d	7,5 e	11,3 d	10,3 a	2,2 j	Cinza / castanho à cinza	-
MN-31	4,8 e	7,8 d	9,0 i	7,1 i	1,8 j	Branca acinzentada / castanho	-

Tabela 4 – Características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. de abacate, manga, maracujá e pêssego: Taxa de crescimento de colônias cultivadas em meio batata-dextrose-ágar sob fotoperíodo de 12 horas em diferentes temperaturas, cor predominante da colônia e presença de massas de conídios (continuação)

Isolado	Taxa de crescimento da colônia (mm/dia)					Cor predominante da colônia[2] (parte superior / reverso)	Massa conidial[2,3]
	15ºC	20ºC	25ºC	30ºC	35ºC		
MN-32	3,6 i	6,8 f	9,6 h	8,6 f	1,6 k	Cinza claro / castanho à cinza	-
MN-33	3,4 i	7,2 e	11,4 d	8,0 g	1,8 j	Branca acinzentada / castanho	-
MN-34	3,3 i	5,4 i	7,0 l	6,1 l	1,7 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-35	5,1 d	8,0 c	12,4 b	8,1 g	1,6 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-36	4,1 g	6,6 g	10,2 g	8,1 g	1,6 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-37	2,8 j	6,4 g	10,0 g	7,1 i	1,5 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-38	3,1 j	7,4 e	10,0 g	8,5 f	2,2 j	Cinza claro / castanho à cinza	-
MN-39	4,1 g	8,0 c	9,8 h	7,0 i	1,8 j	Branca acinzentada / castanho	-
MN-40	4,7 e	7,1 e	9,4 h	8,7 f	2,0 j	Cinza claro / castanho à cinza	-
MN-41	3,9 g	8,4 b	12,6 a	7,9 h	1,4 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-42	3,9 g	7,1 e	11,2 d	7,1 i	1,8 j	Branca acinzentada / castanho	+
MN-43	4,1 g	6,5 g	10,0 g	6,7 k	1,7 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-45	3,3 i	4,7 j	9,0 i	6,2 l	1,6 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-46	2,8 j	5,9 h	8,3 j	6,4 k	1,7 k	Cinza claro / castanho à cinza	+
MN-47	2,9 j	5,4 i	9,1 i	5,3 n	1,7 k	Cinza claro / castanho à cinza	-
MN-48	3,7 h	6,9 f	9,4 h	6,8 j	1,4 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-49	3,9 g	7,3 e	9,7 h	6,0 m	1,2 k	Branca acinzentada / castanho	-
MN-50	4,0 g	6,3 h	10,1 g	8,5 f	1,9 j	Cinza claro / castanho à cinza	-
MN-51	4,4 f	8,1 c	11,3 d	5,8 m	2,5 i	Branca acinzentada / castanho	-
MN-52	3,7 h	6,9 f	11,2 d	8,2 g	6,1 d	Cinza claro / castanho à cinza	-
MN-53	4,3 f	7,5 e	10,4 f	8,0 g	2,2 j	Branca acinzentada / castanho	-
MN-54	4,2 f	7,4 e	10,8 e	9,6 c	2,3 j	Cinza claro / castanho à cinza	-
MN-55	5,6 b	6,9 f	10,6 f	8,9 e	4,7 g	Branca acinzentada / castanho	-
MN-56	4,4 f	8,3 b	10,1 g	7,2 i	3,2 i	Branca acinzentada / castanho	-
MN-57	3,7 i	6,5 g	7,9 k	6,2 l	1,9 j	Cinza / castanho à cinza	+
MN-58	3,1 j	7,5 e	10,0 g	6,5 k	2,1 j	Branca acinzentada / castanho	-
PS-59	3,2 j	4,2 k	6,5 m	4,6 p	1,3 k	Branca acinzentada / salmão	-
PS-60	4,5 f	4,7 j	8,2 j	6,8 j	3,0 i	Cinza claro / castanho à cinza	-
PS-61	3,0 j	4,7 j	6,5 m	5,2 o	2,7 i	Branca acinzentada / salmão	-
PS-62	4,0 g	7,6 e	11,9 c	10,0 b	4,6 g	Cinza claro / castanho à cinza	-

Tabela 4 – Características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. de abacate, manga, maracujá e pêssego: Taxa de crescimento de colônias cultivadas em meio batata-dextrose-ágar sob fotoperíodo de 12 horas em diferentes temperaturas, cor predominante da colônia e presença de massas de conídios (continuação)

Isolado	Taxa de crescimento da colônia (mm/dia)					Cor predominante da colônia[2]	Massa
	15ºC	20ºC	25ºC	30ºC	35ºC	(parte superior / reverso)	conidial[2,3]
PS-63	3,8 h	4,9 j	6,9 l	5,4 n	2,8 i	Branca acinzentada / salmão	-
PS-64	4,3 f	6,6 g	11,0 e	7,6 h	2,7 i	Branca acinzentada / salmão	-
PS-65	3,0 j	4,5 j	7,2 l	6,6 k	1,5 k	Branca acinzentada / castanho	-
PS-66	4,4 f	7,4 e	12,5 a	10,2 a	7,3 c	Cinza claro / castanho à cinza	-
PS-67	3,9 g	5,6 i	7,9 k	6,0 m	3,0 i	Branca acinzentada / salmão	-
PS-68	3,4 i	6,4 g	12,3 b	9,7 c	5,5 e	Cinza claro / castanho à cinza	-
PS-69	3,5 i	4,9 j	7,3 l	5,5 n	1,7 k	Branca acinzentada / salmão	-
PS-70	3,6 i	4,9 j	7,0 l	5,0 o	2,8 i	Branca acinzentada / salmão	-
PS-71	3,6 i	5,6 i	7,7 k	7,7 h	3,6 h	Cinza claro / castanho à cinza	-
PE-72	4,7 e	7,7 d	10,7 e	9,8 c	7,0 c	Cinza / castanho à cinza	+
PE-73	2,8 j	5,8 h	6,8 m	5,9 m	2,3 j	Branca acinzentada a rosa / salmão	+
PE-74	2,0 k	3,8 l	7,2 l	5,9 m	1,4 k	Branca acinzentada / castanho	+
PE-75	1,9 k	3,8 l	6,4 m	4,7 p	1,4 k	Cinza / castanho à cinza	+
PE-76	2,0 k	3,9 l	7,2 l	5,6 n	1,5 k	Branca acinzentada / castanho	+
PE-77	2,0 k	4,0 l	7,3 l	5,8 m	1,7 k	Branca acinzentada / castanho	+
PE-78	2,9 j	5,3 i	11,0 e	8,8 e	7,4 c	Branca acinzentada / castanho	-
PE-79	3,3 i	5,6 i	10,4 f	8,5 f	7,8 b	Cinza clara / castanho à cinza	+
PE-80	3,1 j	5,5 i	11,0 e	9,6 c	8,0 b	Branca acinzentada / castanho	-
PE-81	2,3 k	5,0 j	11,8 c	7,3 i	8,7 a	Cinza / castanho à cinza	+
PE-82	3,3 i	4,9 j	8,1 j	5,4 n	1,1 k	Cinza / castanho à cinza	+
PE-83	3,5 i	4,7 j	7,4 l	5,4 n	1,3 k	Cinza clara / castanho à cinza	+
PE-84	3,8 h	6,5 g	10,6 f	8,3 g	7,8 b	Cinza / castanho à cinza	-
PE-85	4,2 f	6,5 g	11,9 b	9,7 c	7,2 c	Cinza clara / castanho à cinza	-
PE-86	4,3 f	5,9 h	11,0 e	9,2 d	7,4 c	Branca acinzentada / castanho	-
PE-87	5,1 d	7,2 e	11,0 e	10,2 a	7,2 c	Branca acinzentada / castanho	-
PE-88	3,3 i	4,9 j	6,8 m	5,0 o	1,0 k	Cinza / castanho à cinza	+
PE-89	2,9 j	7,6 e	10,8 e	8,6 f	9,2 a	Branca acinzentada / castanho	+
PE-90	3,0 j	6,1 h	11,7 c	9,7 c	9,2 a	Cinza clara / castanho à cinza	+
PE-91	3,5 i	5,2 i	6,9 l	4,2 p	1,1 k	Cinza / castanho à cinza	+
PE-92	3,5 i	6,7 g	9,4 h	9,3 d	6,4 d	Branca acinzentada / castanho	-
PE-93	4,0 g	5,6 i	11,0 e	8,6 f	7,5 b	Cinza clara / castanho à cinza	-

Tabela 4 – Características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. de abacate, manga, maracujá e pêssego: Taxa de crescimento de colônias cultivadas em meio batata-dextrose-ágar sob fotoperíodo de 12 horas em diferentes temperaturas, cor predominante da colônia e presença de massas de conídios

(conclusão)

Isolado	Taxa de crescimento da colônia (mm/dia)					Cor predominante da colônia[2]	Massa
	15ºC	20ºC	25ºC	30ºC	35ºC	(parte superior / reverso)	conidial[2,3]
PE-94	4,3 f	6,7 g	12,1 b	9,1 e	5,7 e	Cinza clara / castanho à cinza	-
C.V.(%)[4]	5,6	4,0	3,9	3,5	11,1		

[1] Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.
[2] Características avaliadas em colônias cultivadas a 25ºC após cinco dias de cultivo.
[3](+) estrutura presente, (-) estrutura ausente.
[4]Coeficiente de variação.

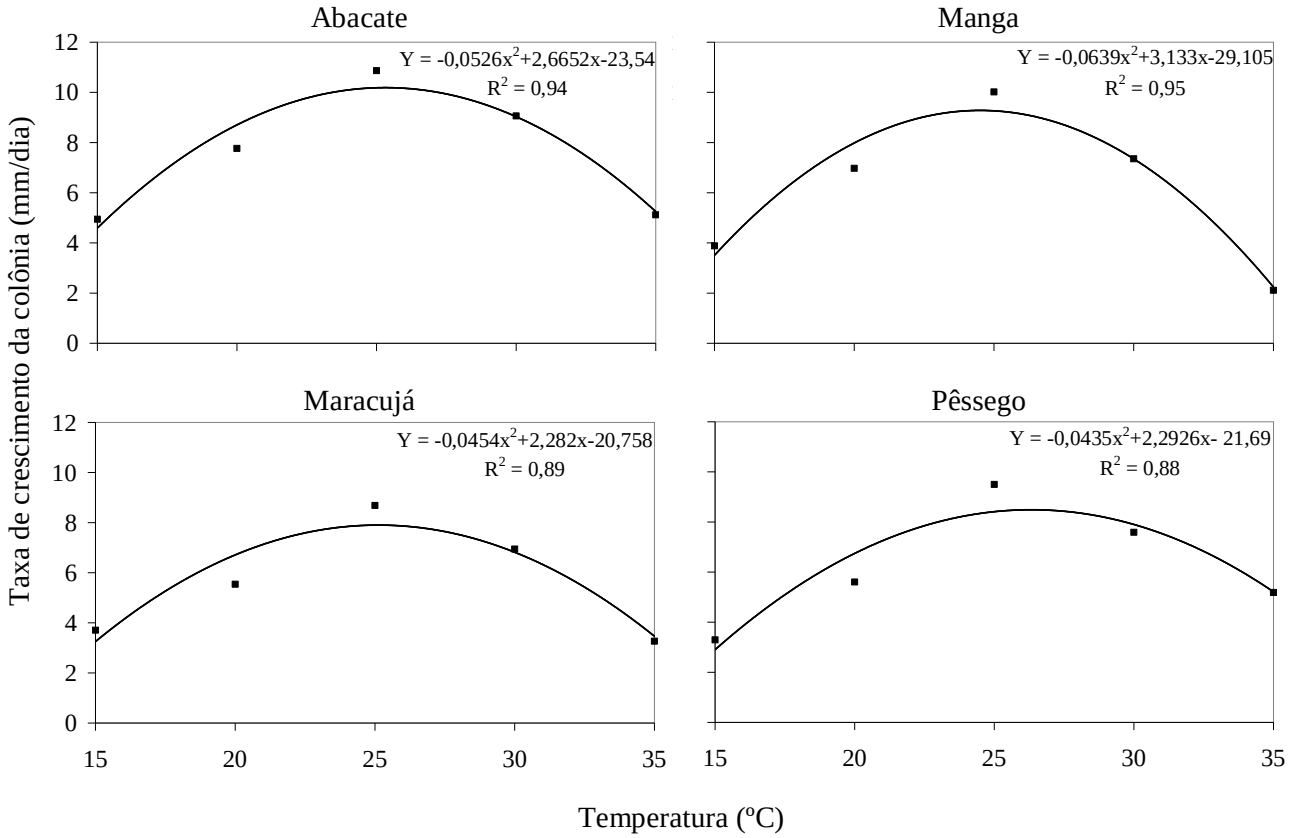

Figura 4 – Taxa média de crescimento de colônias de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego sob diferentes temperaturas em meio batata-dextrose-ágar sob fotoperíodo de 12 horas

2.3.2.2 Caracterização morfológica

As análises microscópicas revelaram a presença de conídios retos, hialinos, unicelulares, com quatro tipos distintos de formato: (1) fusiforme, com ápices afilados; (2) oblongo, com ápices arredondados; (3) clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (4) oblongo, com constrição (Figura 5).

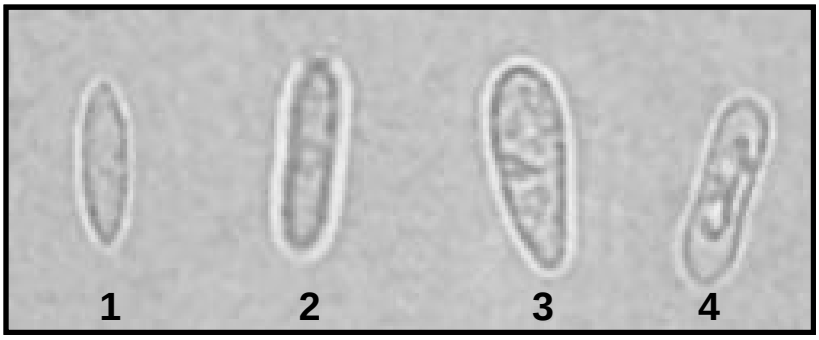

Figura 5 - Formatos de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum*: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (4) reto, com constrição (TOZZE JÚNIOR, 2007).

Todos os isolados de abacate, manga e maracujá apresentaram predominância de conídios retos, hialinos, unicelulares, oblongos e com ápices arredondados (Tabela 5, Figura 6). A amplitude do comprimento médio de conídios foi de 11,7 a 15,7 µm entre os isolados de abacate, 11,4 a 15,1 µm entre os isolados de manga e de 12,2 a 14,8 µm entre os isolados de maracujá. A largura média de conídios variou entre 3,3 e 4,0 µm para os isolados de abacate, 3,0 e 4,1 µm para os isolados de manga e entre 3,7 e 4,7 µm para os isolados de maracujá. Quanto às relações entre o comprimento e a largura dos conídios, constataram-se valores entre 3,3 e 4,3 para isolados de abacate, 3,2 e 4,7 para os isolados de manga e de 2,9 a 3,7 para os isolados de maracujá

Para os isolados de pêssego dois grupos de isolados foram constatados quanto ao formato dos conídios. O primeiro deles com predominância de conídios retos, hialinos, unicelulares, oblongos e com ápices arredondados, formado por 14 isolados (PE-72, PE-78, PE-79, PE-80, PE-81, PE-84, PE-85, PE-86, PE-87, PE-89, PE-90, PE-92, PE-93, PE-94) e o segundo com predominância de conídios retos, hialinos, unicelulares, fusiformes, com ápices afilados, composto por nove isolados (PE-73, PE-74, PE-75, PE-76, PE-77, PE-82, PE-83 PE-88 e PE-91) (Tabela 5, Figura 6). O comprimento médio dos conídios foi de 10,5 e 13,1 µm para os isolados do primeiro grupo e de 10,0 a 13,7 µm para os isolados do segundo grupo. A largura média dos conídios ficou compreendida entre 2,9 e 4,1 µm para os isolados do primeiro grupo e de 3,6 a 4,2 µm para os isolados do segundo grupo. Por sua vez, a relação

entre o comprimento e largura foi de 3,1 a 4,5 µm para os isolados do primeiro grupo e de 2,8 e 3,8 para os isolados do segundo grupo.

Baseando-se nestas características morfométricas pode-se afirmar que a variabilidade entre os isolados de um mesmo hospedeiro foi alta, mas que houve proximidade na amplitude das dimensões médias de conídios entre hospedeiros.

Ao compararmos as características morfológicas apresentadas pelos isolados de todos os hospedeiros com as descrições de Sutton (1992) para espécies de *Colletotrichum*, verificamos a maior similaridade dos mesmos com *C. acutatum* ou com *C. gloeosporioides*. De acordo com esse autor, *C. gloeosporioides* possui conídios retos, oblongos com ápices arredondados, com dimensões entre 12 a 17 µm de comprimento por 3,5 a 6 µm de largura enquanto os conídios de *C. acutatum* são retos, fusiformes, com ápices afilados, possuindo entre 8,5 e 16,5 µm de comprimento por 2,5 a 4 µm de largura. Desta forma, o formato predominante dos esporos permite classificar todos os isolados de abacate, manga e maracujá, além dos isolados de pêssego do primeiro grupo, como *C. gloeosporioides*, enquanto os isolados de pêssego do segundo grupo seriam classificados como *C. acutatum*. Entretanto, as dimensões médias dos conídios, em geral, não permitiram uma clara classificação dos isolados.

Para 13 isolados (AV-02, AV-11, AV-17, MN-46, MN-51, MN-54, MN-55, MN-56, MN-57, PE-72, PE-85, PE-90, PE-93) o formato dos conídios foi similar ao que Sutton (1992) descreve para *C. gloeosporioides*, mas o comprimento médio dos mesmos foi inferior à faixa descrita para esta espécie, enquadrando-se na faixa citada para *C. acutatum*. Os demais isolados tiveram conídios com comprimento médio compreendido dentro da faixa em que há sobreposição entre *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Além disso, para 21 isolados (AV-07, AV-20, AV-26, MN-37, MN-40, MN-43, MN-45, MN-46, MN-48, MN-49, MN-50, MN-54, MN-56, MN-57, MN-58, PE-72, PE-79, PE-80, PE-84, PE-85 e PE-93) que produziram conídios com formato semelhante ao que Sutton (1992) descreve para *C. gloeosporioides*, a largura média dos conídios foi inferior a faixa mencionada para esta espécie. Para três isolados de pêssego (PE-76, PE-77 e PE-82) os conídios apresentam formato típico ao que é descrito para *C. acutatum*, mas com largura média superior a faixa citada para esta espécie. Foram constatados, ainda, 57 isolados com largura média dos conídios dentro da faixa citada tanto para *C. acutatum* quanto para *C. gloeosporioides*.

Assim como foi verificado neste trabalho, as dimensões dos conídios também não contribuíram de maneira consistente para a identificação de isolados de *Colletotrichum* nos

trabalho desenvolvidos por Andrade et al. (2007) e Pereira (2009), pois a maioria dos isolados estudados por esses autores apresentaram dimensões dentro da faixa em que há sobreposição para as espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

A ocorrência de isolados com formato de conídios similar ao que é descrito para uma determinada espécie mas com dimensões fora da faixa descrita para a mesma, pode ter sido resultante de variações fenotípicas, comuns para fungos do gênero *Colletotrichum* (MENEZES, 2002). Este fato foi constatado por Sanders e Korsten (2003a), que encontraram uma grande variabilidade entre 309 isolados de *C. gloeosporioides* de abacate e manga na África do Sul, sobretudo quanto ao comprimento de conídios.

Há que se considerar, ainda, que 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 forma dos conídios.

Adaskaveg e Hartin (1997) observaram que a morfologia de conídios produzidos por um mesmo isolado de *Colletotrichum* variou em função do substrato utilizado para a produção dos mesmos. Resultados similares foram obtidos por Bueno et al. (2005) e Bueno, Tozze Júnior e Massola Júnior (2005), que estudando a variabilidade morfológica de conídios de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* demonstraram haver diferenças significativas nas dimensões e formato de conídios produzidos por um mesmo isolado em função das condições de cultivo, como substrato, temperatura e fonte de luz. Esses autores verificaram que determinadas mudanças nas variáveis ambientais estudadas foram suficientes para que um isolado identificado por técnicas moleculares como sendo *C. acutatum* apresentasse morfometria mais próxima de *C. gloeosporioides* e vice e versa.

A análise das dimensões médias de conídios entre grupos de isolados associados a cada hospedeiro não revelou diferenças quanto à procedência dos isolados, entretanto, ao considerarmos o hospedeiro de origem, foi possível constatar diferenças estatísticas significativas para essas variáveis (Tabela 6).

O comprimento dos conídios, em média, foi maior para os isolados de maracujá e menor para os de pêssego, enquanto a largura média dos conídios foi superior para os isolados de maracujá e inferior para os de manga. Por sua vez, a relação entre o comprimento e a largura dos conídios, em média, foi maior entre os isolados de manga e menor entre os isolados de maracujá. O menor quociente da relação entre o comprimento e a largura (C/L) indica que os conídios são mais estreitos e compridos, enquanto a maior relação C/L indica que os conídios

são mais oblongos (VERAS, GASPAROTTO, MENEZES, 1997; FURTADO et al., 1999; PEREIRA; 2009).

Portanto, assim como observado por meio da caracterização cultural, a análise morfométrica também indica que as populações associadas a cada hospedeiro são distintas.

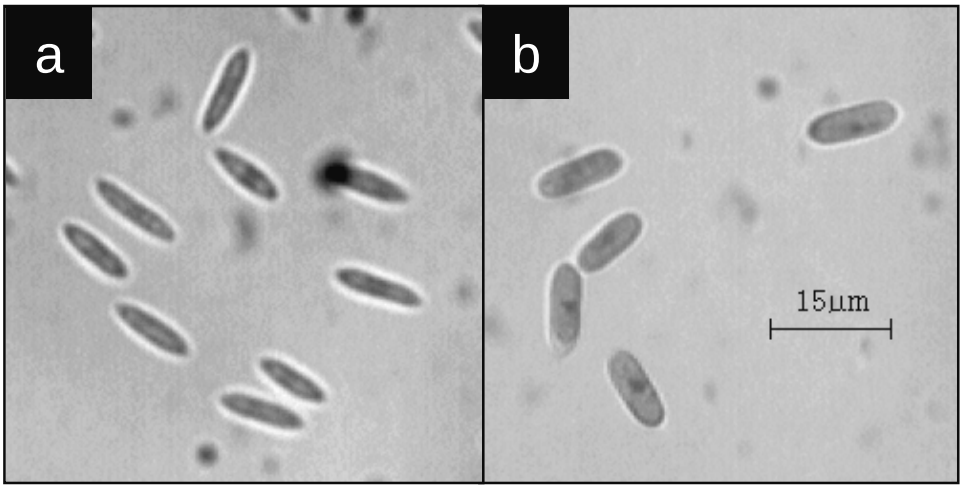

Figura 6 – Conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum:* (a) retos, hialinos, unicelulares, fusiformes, com ápices afilados (isolado PE-88); (b) retos, hialinos, unicelulares, oblongos e com ápices arredondados (isolado AV-30)

Tabela 5 – Dimensões e formatos de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego

(continua)

Isolado	Dimensões			Formato[2] (%)			
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comp./Larg.	1	2	3	4
AV-01	13,4 c[1] (10,3-17,2)	3,9 e (2,9-4,8)	3,5 e (2,3-5,0)	0	97	0	3
AV-02	11,8 e (9,5-14,3)	3,5 g (2,9-4,0)	3,4 e (2,6-4,9)	0	92	4	4
AV-03	13,3 c (11,0-15,4)	4,0 d (3,7-4,4)	3,4 e (2,5-4,2)	0	87	5	8
AV-04	12,3 e (10,3-14,3)	3,7 f (3,3-5,1)	3,3 f (2,3-4,3)	1	89	7	3
AV-05	12,9 d (9,5-15,0)	3,8 e (2,9-4,4)	3,4 e (2,4-5,1)	0	85	7	8
AV-06	13,1 c (11,0-15,4)	3,9 e (3,3-4,8)	3,4 e (2,5-4,7)	0	96	2	2
AV-07	12,2 e (9,5-17,2)	3,3 i (2,9-4,0)	3,7 d (2,4-5,3)	0	87	5	8
AV-08	12,1 e (10,3-14,3)	3,7 f (2,6-4,4)	3,3 f (2,5-4,6)	0	76	6	18
AV-09	12,3 e (9,5-17,2)	3,5 h (2,6-5,5)	3,6 d (2,3-5,6)	0	89	7	4
AV-10	12,7 d (9,5-18,0)	3,6 f (2,9-5,1)	3,5 e (2,6-4,9)	0	88	4	8
AV-11	11,7 f (9,5-13,2)	3,6 f (2,9-4,4)	3,3 f (2,5-4,5)	0	98	0	2
AV-12	13,1 c (8,8-15,4)	3,8 e (2,9-5,1)	3,5 e (2,4-4,2)	0	79	6	15
AV-13	15,7 a (12,5-19,1)	3,7 f (2,9-4,4)	4,3 b (3,0-5,7)	0	95	1	4
AV-14	13,3 c (11,0-15,4)	3,6 f (2,9-4,0)	3,7 d (3,0-5,3)	0	96	2	2

Tabela 5 – Dimensões e formatos de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego

(continuação)

Isolado	Dimensões			Formato[2] (%)			
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comp./Larg.	1	2	3	4
AV-15	13,3 c (11,0-15,0)	3,7 f (3,3-4,4)	3,6 d (2,7-4,6)	0	88	4	8
AV-16	12,7 d (9,5-16,5)	3,8 e (2,9-4,8)	3,3 f (2,6-4,5)	0	97	0	3
AV-17	11,9 e (9,5-14,3)	3,6 g (2,6-4,0)	3,3 f (2,4-4,3)	0	89	5	6
AV-18	13,4 c (9,5-15,4)	3,7 f (3,3-4,4)	3,6 d (2,6-4,7)	0	95	2	3
AV-19	12,3 e (10,3-14,3)	3,6 g (2,9-4,4)	3,5 e (2,5-4,3)	0	96	0	4
AV-20	12,8 d (10,3-19,8)	3,3 i (2,6-5,5)	3,8 c (3,1-4,9)	0	88	5	7
AV-21	14,2 b (11,7-17,2)	3,5 h (2,9-4,0)	4,1 c (3,1-5,3)	0	96	0	4
AV-22	12,6 d (9,5-15,0)	3,6 g (2,9-4,0)	3,5 e (2,6-4,6)	0	89	5	6
AV-23	12,0 e (9,5-15,4)	3,6 g (2,9-4,4)	3,4 e (2,6-4,9)	0	94	0	6
AV-24	13,5 c (11,0-16,5)	3,9 e (3,7-5,1)	3,5 e (2,5-4,5)	0	98	0	2
AV-25	13,1 c (10,3-17,2)	3,7 f (2,9-5,1)	3,6 d (2,5-4,9)	0	77	8	15
AV-26	13,2 c (11,0-18,0)	3,4 h (2,6-4,4)	3,9 c (2,5-4,9)	0	90	4	6
AV-27	14,0 b (11,0-16,5)	3,8 e (3,7-4,4)	3,7 d (2,5-4,5)	0	94	2	4
AV-28	13,2 c (10,3-17,2)	3,8 e (2,9-4,8)	3,5 e (2,5-5,6)	0	98	0	2
AV-29	14,5 b (11,0-18,0)	3,7 f (2,9-4,4)	4,0 c (3,0-5,4)	0	90	0	10
AV-30	13,2 c (10,3-17,2)	3,7 f (2,9-4,0)	3,6 d (2,8-4,7)	0	94	1	5
MN-31	14,2 b (11,0-18,3)	3,8 e (2,9-4,8)	3,8 c (2,5-4,7)	3	84	6	7
MN-32	15,0 a (12,5-17,6)	3,9 e (2,9-4,4)	3,9 c (2,8-6,0)	0	95	3	2
MN-33	13,2 c (10,3-15,4)	4,1 d (3,3-4,4)	3,3 f (2,3-4,0)	3	86	5	6
MN-34	14,2 b (11,7-16,9)	3,7 f (3,3-4,8)	3,8 c (2,7-4,9)	0	93	3	4
MN-35	13,3 c (10,3-16,9)	3,7 f (2,9-5,1)	3,7 d (2,6-5,0)	2	89	6	3
MN-36	14,9 a (11,0-19,8)	3,6 g (2,9-4,8)	4,3 b (2,8-6,4)	0	90	3	7
MN-37	12,4 d (9,5-18,3)	3,0 l (2,2-4,8)	4,2 b (2,2-6,0)	0	96	3	1
MN-38	13,1 c (10,3-18,7)	3,7 f (2,9-4,4)	3,6 d (2,7-5,7)	0	97	3	0
MN-39	12,3 e (9,5-15,4)	3,7 f (2,9-4,4)	3,4 e (2,5-4,2)	0	83	11	6
MN-40	15,1 a (12,5-18,3)	3,4 h (2,9-4,4)	4,5 a (3,4-5,8)	0	91	6	3
MN-41	14,5 b (11,0-16,9)	3,7 f (3,3-4,4)	3,9 c (2,7-4,7)	0	90	6	4
MN-42	14,7 a (11,7-19,8)	3,6 g (2,9-4,4)	4,3 b (2,7-6,8)	0	91	4	5
MN-43	12,8 d (8,8-16,1)	3,3 i (2,9-4,4)	4,0 c (2,4-5,5)	0	93	2	5
MN-45	14,4 b (10,3-19,8)	3,1 j (2,6-3,7)	4,7 a (3,4-6,8)	0	87	7	6
MN-46	11,4 f (8,8-16,1)	2,9 l (2,6-3,7)	3,9 c (2,4-5,5)	0	93	4	3
MN-47	14,0 b (11,0-18,7)	3,5 h (2,9-4,4)	4,0 c (2,8-6,4)	0	91	4	5

Tabela 5 – Dimensões e formatos de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego

(continuação)

Isolado	Dimensões			Formato[2] (%)			
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comp./Larg.	1	2	3	4
MN-48	13,5 c (9,5-16,9)	3,2 i (2,9-3,7)	4,2 b (3,3-5,8)	0	92	3	5
MN-49	12,1 e (10,3-15,8)	3,4 h (2,6-4,4)	3,6 d (2,5-5,4)	0	96	4	0
MN-50	13,3 c (11,7-14,7)	3,3 i (2,6-4,0)	4,1 c (2,9-5,7)	1	87	6	6
MN-51	11,7 f (8,8-14,7)	3,7 f (2,9-4,4)	3,2 f (2,4-4,5)	0	93	4	3
MN-52	14,0 b (11,7-16,1)	3,9 e (3,3-4,8)	3,6 d (2,8-4,4)	0	95	2	3
MN-53	14,9 a (11,7-19,8)	3,5 h (2,9-4,4)	4,3 b (2,7-5,6)	0	91	4	5
MN-54	11,7 f (8,8-14,7)	3,1 j (2,6-4,0)	3,7 d (2,6-4,9)	0	88	5	7
MN-55	11,4 f (8,8-16,1)	3,6 g (2,6-4,0)	3,3 f (2,4-4,6)	0	93	3	4
MN-56	11,8 e (9,5-15,4)	3,2 i (2,6-4,4)	3,7 d (2,5-6,0)	0	92	4	4
MN-57	11,9 e (8,8-13,6)	3,4 h (2,9-4,4)	3,6 d (2,4-4,6)	0	85	7	8
MN-58	14,9 a (11,0-19,8)	3,3 i (2,9-4,0)	4,6 a (3,1-6,4)	0	89	3	8
PS-59	14,1 b (11,7-16,9)	4,4 b (3,7-5,1)	3,2 f (2,7-4,2)	0	87	3	10
PS-60	13,5 c (11,7-16,1)	4,3 c (3,7-5,1)	3,2 f (2,3-4,0)	0	97	2	1
PS-61	14,1 b (11,7-16,9)	4,2 c (3,7-4,8)	3,3 f (2,7-4,2)	0	98	2	0
PS-62	13,8 c (12,1-16,5)	4,0 d (3,3-4,4)	3,5 e (2,8-4,1)	0	95	3	2
PS-63	14,4 b (12,5-16,9)	4,7 a (4,0-5,1)	3,1 g (2,6-3,8)	0	98	2	0
PS-64	14,8 a (12,5-18,0)	4,7 a (4,0-5,5)	3,1 g (2,5-3,8)	0	97	2	1
PS-65	12,6 d (10,3-14,3)	4,4 b (3,7-4,8)	2,9 h (2,2-3,6)	0	96	3	1
PS-66	13,1 c (9,9-15,8)	3,7 f (3,3-4,0)	3,6 d (2,7-4,8)	0	93	4	3
PS-67	13,9 b (11,7-18,3)	4,4 b (4,0-5,1)	3,2 f (2,5-4,2)	0	95	3	2
PS-68	14,1 b (12,8-15,8)	3,8 e (3,3-4,4)	3,7 d (2,9-4,3)	0	96	3	1
PS-69	12,2 e (9,9-13,6)	4,2 c (3,7-4,8)	2,9 h (2,5-3,5)	0	91	5	4
PS-70	14,8 a (13,2-16,1)	4,1 d (3,7-5,1)	3,7 d (2,9-4,4)	0	90	7	3
PS-71	13,4 c (12,1-16,5)	4,1 d (3,3-4,4)	3,3 f (2,8-4,3)	0	92	6	2
PE-72	10,9 f (7,0-14,3)	3,3 i (2,2-3,3)	3,4 e (2,1-5,6)	0	90	5	5
PE-73	14,6 b (12,1-16,9)	3,8 e (3,3-4,8)	3,8 c (3,0-5,1)	71	20	8	1
PE-74	11,1 f (8,8-16,9)	3,9 e (2,9-4,8)	2,9 h (2,2-5,1)	77	16	7	0
PE-75	12,4 d (10,3-15,0)	3,9 e (3,3-4,8)	3,2 f (2,5-4,1)	65	26	9	0
PE-76	13,7 c (11,4-15,8)	4,2 c (3,3-5,1)	3,3 f (2,2-4,3)	80	14	5	1
PE-77	12,3 e (9,5-15,0)	4,1 d (3,3-5,1)	3,1 g (2,4-4,1)	73	16	9	2
PE-78	12,7 d (10,3-14,3)	3,9 e (2,9-4,8)	3,3 f (2,2-4,8)	0	95	3	2

Tabela 5 – Dimensões e formatos de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego

(conclusão)

Isolado	Dimensões			Formato[2] (%)			
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comp./Larg.	1	2	3	4
PE-79	12,3 e (10,3-15,0)	3,0 l (2,2-4,0)	4,3 b (2,8-6,2)	0	94	4	2
PE-80	12,5 d (10,3-15,0)	2,9 l (2,2-4,0)	4,5 a (2,8-6,2)	0	86	7	7
PE-81	13,1 c (11,0-15,8)	3,9 e (2,9-5,1)	3,4 e (2,4-5,4)	0	96	2	2
PE-82	12,7 d (11,4-15,0)	4,2 c (3,3-5,5)	3,1 g (2,2-3,9)	76	19	5	0
PE-83	10,0 g (8,1-13,9)	3,6 f (2,9-4,0)	2,8 h (2,1-3,7)	85	12	8	0
PE-84	12,7 d (11,0-16,5)	3,4 h (2,9-4,0)	3,8 c (2,7-5,0)	0	97	2	1
PE-85	11,1 f (8,4-14,3)	3,4 h (2,2-4,4)	3,4 e (2,1-5,8)	0	90	4	6
PE-86	12,1 e (8,4-16,5)	3,6 g (2,2-4,0)	3,5 e (2,1-7,5)	0	93	3	4
PE-87	12,2 e (8,8-15,0)	3,6 g (2,6-4,8)	3,5 e (2,2-5,9)	0	95	2	3
PE-88	13,3 c (11,0-15,0)	3,9 e (3,3-4,8)	3,4 e (2,3-4,4)	87	11	2	0
PE-89	12,6 d (8,8-15,0)	4,1 d (3,7-4,8)	3,1 g (1,8-4,1)	0	88	5	7
PE-90	11,4 f (8,4-13,6)	3,7 f (2,6-4,8)	3,2 f (1,9-5,3)	2	83	7	8
PE-91	11,2 f (9,2-14,3)	3,7 f (2,9-4,8)	3,1 g (2,2-4,3)	70	17	11	2
PE-92	12,2 e (8,4-15,0)	3,6 g (2,2-4,4)	3,4 e (2,2-4,9)	0	91	4	5
PE-93	10,5 g (7,7-13,6)	3,1 j (2,2-3,7)	3,4 e (2,3-4,7)	0	89	5	6
PE-94	12,8 d (8,8-15,0)	3,6 g (2,6-4,0)	3,7 d (2,2-5,9)	0	92	5	3
C.V.(%)[3]	12,0	11,2	16,6				

[1]Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

[2] Formato: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (4) reto, com constrição. [3] Coeficiente de variação.

Tabela 6 – Dimensões médias de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego

Hospedeiro	Dimensões médias dos conídios		
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comprimento/Largura
Abacate	13,0 c[1]	3,7 b	3,6 b
Manga	13,3 b	3,4 d	3,9 a
Maracujá	13,7 a	4,2 a	3,3 d
Pêssego	12,1 d	3,6 c	3,4 c
C.V.(%)[2]	14,1	13,3	18,7

[1]Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. [2] Coeficiente de variação.

2.3.2.3 Caracterização molecular

2.3.2.3.1 Identificação com oligonucleotídeos específicos

O par de oligonucleotídeo Cc1F1 e Cc2R1, específicos para o gênero *Colletotrichum*, amplificou um fragmento de 447 pb para todos os isolados, confirmando que os mesmos pertencem a este gênero.

Como podemos observar na Tabela 7, nenhum isolado teve fragmentos de DNA amplificados em PCR utilizando-se os oligonucleotídeos Col1/ITS4, exceto o isolado Man-76, utilizado como padrão positivo para esses oligonucleotídeos, que foram desenvolvidos para uma espécie desconhecida de *Colletotrichum* que ocorre em algumas frutíferas na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003).

O isolado padrão de *C. acutatum* e nove isolados de pêssego (PE-73, PE-74, PE-75, PE-76, PE-77, PE-82, PE-83, PE-88, PE-91) tiveram fragmentos de 490 pb amplificados com o uso do par de oligonucleotídeo CaInt2 e ITS4 (Tabela 7, Figura 7). Esses resultados confirmam os obtidos através das caracterizações morfo-culturais, nas quais esses isolados apresentaram taxa de crescimento da colônia e predominância de conídios com formato similar ao citado para a espécie *C. acutatum* (SUTTON, 1992; ADASKAVEG; HARTIN, 1997; VINNERE, 2004; TOZZE JÚNIOR, 2007).

Todos os isolados de abacate, manga e 14 isolados de pêssego (PE-72, PE-78, PE-79, PE-80, PE-81, PE-84, PE-85, PE-86, PE-87, PE-89, PE-90, PE-92, PE-93, PE-94) e três isolados de maracujá (PS-62, PS-66, PS-68), além do isolado padrão de *C. gloeosporioides* (AVO-33-4B) foram positivos em PCR com os oligonucleotídeos CgInt e ITS4, os quais amplificaram fragmentos com 450 pb (Tabela 7, Figura 7), demonstrando que a maioria dos isolados estudados pertencem à espécie *C. gloeosporioides*. Tais resultados corroboram a informação de Piccinin, Pascholati e Di Piero (2005), que citam apenas *C. gloeosporioides* como agente causal da antracnose do abacateiro no Brasil. Também confirmam as observações de Pimenta (2009), o qual observou que apenas esta espécie esteve associada a antracnose da manga em um estudo envolvendo isolados coletados em diferentes municípios do Estado de São Paulo.

Os isolados positivos para *C. gloeosporioides* apresentaram conídios com formato típico ao citado para esta espécie, embora as dimensões médias dos conídios estivessem fora da faixa de comprimento ou largura estabelecida para esta espécie por Sutton (1992) para 27 isolados (AV-02, AV-07, AV-11, AV-17, AV-20, AV-26, MN-37, MN-40, MN-43, MN-45, MN-46, MN-48, MN-49, MN-50, MN-51, MN-54, MN-55, MN-56, MN-57, MN-58, PE-72,

PE-79, PE-80, PE-84, PE-85, PE-90, PE-93). A maioria dos isolados identificados como sendo *C. gloeosporioides* por PCR também demonstrou rápido crescimento das colônias, outra característica típica desta espécie. Entretanto, cinco isolados (AV-17, AV-24, MN-34, MN-46, MN-57) tiveram velocidade de crescimento das colônias relativamente baixa, próxima a relatada para *C. acutatum* (TOZZE JÚNIOR, 2007). Freeman, Katan e Shabi (1998) já haviam constatado isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de amendoeiras com taxa de crescimento de colônias mais baixa, similares às apresentadas por isolados de *C. acutatum* obtidos de morango.

Esses resultados demonstram que as características culturais e morfológicas citadas para esta espécie por Sutton (1992) podem levar a identificações equivocadas e que tais características não devem ser utilizadas isoladamente para fins taxonômicos, como Menezes (2006) e Cai et al. (2009) já haviam sugerido.

Apenas 10 isolados, todos obtidos de maracujá (PS-59, PS-60, PS-61, PS-63, PS-64, PS-65, PS-67, PS-69, PS-70, PS-71), não tiveram fragmentos de DNA amplificados por nenhum dos pares de oligonucleotídeos espécie-específicos utilizados nas PCRs (Tabela 7). Esses isolados apresentaram conídios oblongos, com ápices arredondados, semelhante ao que Sutton (1992) descreve para *C. gloeosporioides*, porém, com exceção de PS-64, todos apresentaram baixas taxas de crescimento das colônias. Tais resultados indicam que esses isolados pertencem a uma espécie distinta de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, ainda que, morfo-culturalmente, apresente algumas semelhanças com as mesmas.

Na região nordeste do Brasil, Almeida e Coêlho (2007) também constataram isolados com características morfo-culturais próximas a *C. gloeosporioides* mas que não foram positivos em PCR específicos para *C. gloeosporioides*. Entretanto, diferentemente do que foi observado no presente trabalho, alguns isolados avaliados pelos autores foram positivos em PCR utilizando o oligonucleotídeo Col1, em conjunto com o ITS-4, que também amplificaram isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de maracujá na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al. 2003).

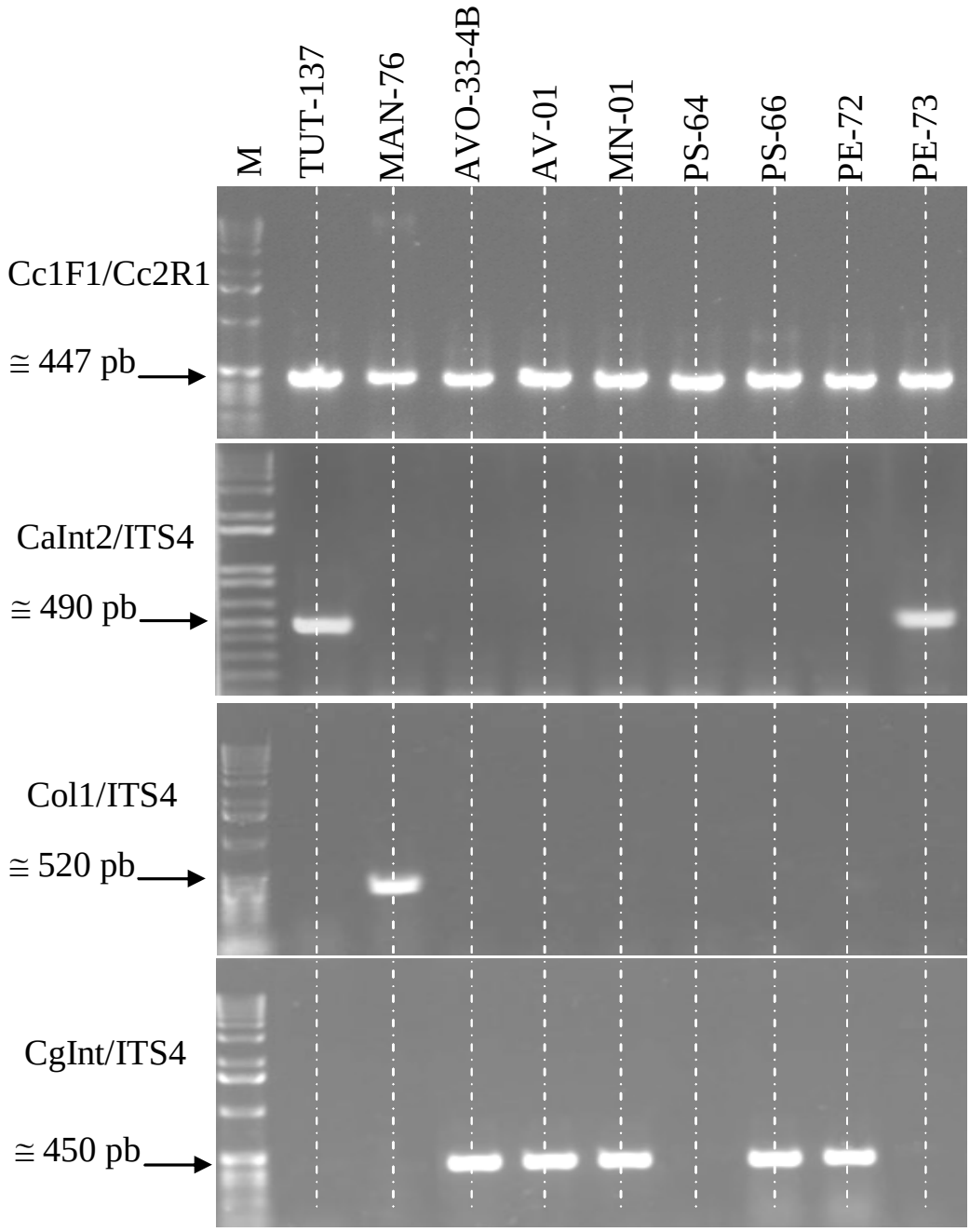

Figura 7 - Fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos Cc1F1/Cc2R1 (*Colletotrichum* sp.), CaInt2/ITS4 (*C. acutatum*), Col1/ITS4 (desenvolvido para espécie de *Colletotrichum* não identificada que ocorre em frutíferas na Colômbia) e CgINT/ITS4 (*C. gloeosporioides*), observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: Marcador molecular (1kb); TUT-137: padrão de *C. acutatum*; Man-76: isolado de manga da Colômbia amplificado pelos oligonucleotídeos Col1/ITS4; AV-01: isolado obtido de abacate; MN-01: isolado obtido de manga; PS-64 e PS-66: isolados obtidos de maracujá; PE-72 e PE-73, isolados obtidos de pêssego

Tabela 7 – Identificação de isolados de *Colletotrichum* obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego em reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos

Isolado	Oligonucleotídeos			Espécie	Isolado	Oligonucleotídeos			Espécie
	CgInt ITS4	CaInt2 ITS4	Col1 ITS4			CgInt ITS4	CaInt2 ITS4	Col1 ITS4	
Avo334B	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-47	+	-	-	*C. gloeosporioides*
Tut-137	-	+	-	*C. acutatum*	MN-48	+	-	-	*C. gloeosporioides*
Man-16	-	-	+	*Colletotrichum* sp.	MN-49	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-01	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-50	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-02	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-51	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-03	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-52	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-04	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-53	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-05	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-54	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-06	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-55	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-07	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-56	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-08	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-57	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-09	+	-	-	*C. gloeosporioides*	MN-58	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-10	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-59	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-11	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-60	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-12	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-61	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-13	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-62	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-14	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-63	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-15	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-64	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-16	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-65	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-17	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-66	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-18	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-67	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-19	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-68	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-20	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-69	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-21	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-70	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-22	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PS-71	-	-	-	*Colletotrichum* sp.
AV-23	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-72	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-24	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-73	-	+	-	*C. acutatum*
AV-25	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-74	-	+	-	*C. acutatum*
AV-26	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-75	-	+	-	*C. acutatum*
AV-27	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-76	-	+	-	*C. acutatum*
AV-28	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-77	-	+	-	*C. acutatum*
AV-29	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-78	+	-	-	*C. gloeosporioides*
AV-30	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-79	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-31	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-80	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-32	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-81	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-33	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-82	-	+	-	*C. acutatum*
MN-34	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-83	-	+	-	*C. acutatum*
MN-35	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-84	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-36	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-85	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-37	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-86	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-38	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-87	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-39	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-88	-	+	-	*C. acutatum*
MN-40	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-89	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-41	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-90	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-42	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-91	-	+	-	*C. acutatum*
MN-43	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-92	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-45	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-93	+	-	-	*C. gloeosporioides*
MN-46	+	-	-	*C. gloeosporioides*	PE-94	+	-	-	*C. gloeosporioides*

2.3.2.3.2 Análise das sequências de nucleotídeos das regiões ITS e β-tubulina

A análise filogenética foi realizada com base nas sequências nucleotídicas concatenadas das regiões ITS e β-tubulina para isolados representativos de cada hospedeiro avaliado e de cada espécie identificada por meio das demais técnicas utilizadas.

Com base nas seqüências de DNA obtidas foi possível a identificação de três espécies de *Colletotrichum*: *C. acutatum, C. gloeosporioides* e *C. boninense* (Tabela 8).

Houve correspondência dos resultados desta análise com a identificação por PCR utilizando-se oligonucleotídeos espécie-específicos para todos os isolados identificados como sendo *C. gloeosporioides* e *C. acutatum.* Esses resultados confirmam a especificidade dos oligonucleotídeos CaInt2/ITS4 e CgINT/ITS4.

O seqüenciamento de DNA também permitiu a identificação da espécie dos três isolados de maracujá (PS-59, PS-63 e PS-64) escolhidos entre os 10 isolados que não foram amplificados por PCR com os oligonucleotídeos espécie-específicos utilizados. Estes isolados foram identificados como *C. boninense,* espécie que foi constatada causando antracnose em maracujá no Brasil (TOZZE JÚNIOR et al., 2010) e que morfologicamente apresenta algumas semelhanças com *C. gloeosporioides.*

Considerando o baixo número de isolados de cada município escolhidos para esta análise filogenética não foi possível correlacionar os resultados com as regiões geográficas de coleta dos isolados. Todavia, os isolados estudados se agruparam conforme a sua espécie, formando clados bem distintos (Figura 8).

Como pode ser observado na Figura 8, houve a formação de cinco clados. O primeiro é formado somente pelo isolado de *C. chlorophyti*, cuja seqüência foi obtida no *GeneBank* e usada como *outgroup* da árvore filogenética. O segundo clado é constituído pelos isolados PE-73, PE-74 e PE-91, obtidos de pêssegos e identificados como sendo *C. acutatum,* os quais apresentaram pequena distância genética com os isolados YN316 e YN02, ambos pertencentes à espécie *C. acutatum,* usados para construção da árvore (Figura 9).

Os isolados de maracujá identificados como *C. boninense*, encontram-se no terceiro clado, onde também foram incluídos isolados das espécies *C. graminicola, C. capsici* e *C. trucatum,* espécies que possuem conídios falcados, uma marca morfológica bastante distinta de *C. boninense,* o qual possui conídios retos. Porém, como pode ser notado, os isolados de *C. boninense* (STE-U2998, C05016, PS-59, PS-63 e PS-64), apesar de estarem dentro de um grupo com diferentes espécies de *Colletotrichum,* formam uma clado especifico, com

distâncias genéticas que variam de 0,045 a 0,048 das outras espécies que estão dentro do seu grupo (Figura 9).

No quarto clado são encontrados somente os isolados de *C. musae* (BTL 32 e BTL 31), cuja seqüência de DNA também foi obtida no *GenBank* e utilizada para construção da árvore filogenética.

O quinto e último clado é formado pelos isolados pertencentes a espécie *C. gloeosporioides*. Neste clado pode-se observar a ocorrência de três subgrupos, que parecem estar parcialmente sustentadas pelo hospedeiro de origem dos isolados estudados.

No primeiro subgrupo encontram-se os três isolados de pêssego, um de maracujá e três de abacate. Apesar das distâncias genéticas entre estes isolados serem muito baixas, com base nos valores de "bootstrap" os isolados de pêssego e maracujá parecem estar mais próximos entre si do que com os isolados de abacate. Por sua vez, todos os isolados de manga seqüenciados encontram-se no segundo subgrupo.

No terceiro subgrupo estão três isolados de abacate e dois isolados de maracujá que se enquadram dentro do mesmo caso do primeiro subgrupo, no qual as distâncias genéticas são também baixas, mas com base nos valores de "bootstrap", pode ser observado que os isolados de maracujá parecem estar mais próximos entre si do que com os isolados de abacate.

Com base nos dados, pode-se concluir que a análise concatenada da região ITS1-5.8S-ITS2 e da β-tubulina foi eficiente na identificação das espécies dos isolados estudados, permitindo a separação das espécies trabalhadas de forma concisa. Ainda, apesar da pequena variabilidade genética entre isolados de *C. gloeosporioides*, foi possível realizar uma correlação genética dos isolados de manga com seu hospedeiro, sendo esta relação bem definida.

Os resultados obtidos pela análise filogenética foram condizentes com as caracterizações culturais e morfológicas, que também indicaram haver diferenças nas populações de *Colletotrichum* spp. associadas a cada hospedeiro. Entre essas diferenças, destacamos o fato dos isolados de *C. gloeosporioides* de manga, em média, apresentarem maior sensibilidade à temperatura de 35ºC e possuir conídios com maior relação entre comprimento e largura, características que permitiram diferenciá-los dos isolados dos demais hospedeiros. Com base nessas informações, podemos inferir que existe certo grau de especialização dos isolados estudados ao seu hospedeiro de origem.

Tabela 8 – Isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados para a análise filogenética

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Origem
AV-03	*C. gloeosporioides*	Abacate	Olímpia, SP
AV-05	*C. gloeosporioides*	Abacate	Bauru, SP
AV-15	*C. gloeosporioides*	Abacate	Dois Córregos, SP
AV-22	*C. gloeosporioides*	Abacate	Bernardino de Campos, SP
AV-23	*C. gloeosporioides*	Abacate	Limeira, SP
AV-27	*C. gloeosporioides*	Abacate	Jardinópolis, SP
MN-45	*C. gloeosporioides*	Manga	Catanduva, SP
MN-48	*C. gloeosporioides*	Manga	Jaú, SP
MN-58	*C. gloeosporioides*	Manga	Botucatu, SP
MN-51	*C. gloeosporioides*	Manga	Jaboticabal, SP
MN-57	*C. gloeosporioides*	Manga	Cabralia Paulista, SP
PE-72	*C. gloeosporioides*	Pêssego	Paranapanema, SP
PE-73	*C. acutatum*	Pêssego	Paranapanema, SP
PE-74	*C. acutatum*	Pêssego	Botucatu, SP
PE-80	*C. gloeosporioides*	Pêssego	Marília, SP
PE-91	*C. acutatum*	Pêssego	Bauru, SP
PE-93	*C. gloeosporioides*	Pêssego	Pindorama, SP
PS-59	*C. boninense*	Maracuja	Adamantina, SP
PS-62	*C. gloeosporioides*	Maracuja	Valinhos, SP
PS-63	*C. boninense*	Maracuja	Bariri, SP
PS-64	*C. boninense*	Maracuja	Campinas, SP
PS-66	*C. gloeosporioides*	Maracuja	Irapuru, SP
PS-68	*C. gloeosporioides*	Maracuja	Irapuru, SP
Gi157427564	*C. capsici*	*Capsicum frutencens*	Coimbatore (Índia)
gi263043765 (120709)	*C. truncatum*	*Capsicum frutencens*	Coimbatore (Índia)
gi284807466 (CBS66788)	*C. truncatum*	Espécies desconhecida	Martinica (ilha do Caribe)
gi284807470 (14279)	*C. chlorophyti*	*Stylosanthes hamata*	Austrália
gi306977580 (C07009)	*C. gloeosporioides*	Pimentão	Não informado
gi306977583 (C05016)	*C. boninense*	Não publicado	Não publicado
gi307603 (CM0705)	*C. gloeosporioides*	Não publicado	Não publicado
gi307603134 (CQ-B12c)	*C. gloeosporioides*	Não publicado	Não publicado
gi307603179 (YN02)	*C. acutatum*	Não publicado	Não publicado
gi307603180 (YN316)	*C. acutatum*	Não publicado	Não publicado
gi308156240 (C01139)	*C. boninense*	Não publicado	Não publicado
gi328833880 (BTL31)	*C. musae*	Banana	Não informado
gi328833881 (BTL32)	*C. musae*	Banana	Não informado
gi38606400 (STE-U2998)	*C. boninense*	*Leucospermum* sp.	Austrália
gi38606403 (STE-U5304)	*C. capsici*	*Arachis hypogea*	Tanzânia
gi397603176 (CF07)	*C. gloeosporioides*	Não publicado	Não publicado
gi6886573 (DT378)	*C. graminicola*	Não publicado	Não publicado
gi6886577 (DT1024)	*C. graminicola*	Não publicado	Não publicado

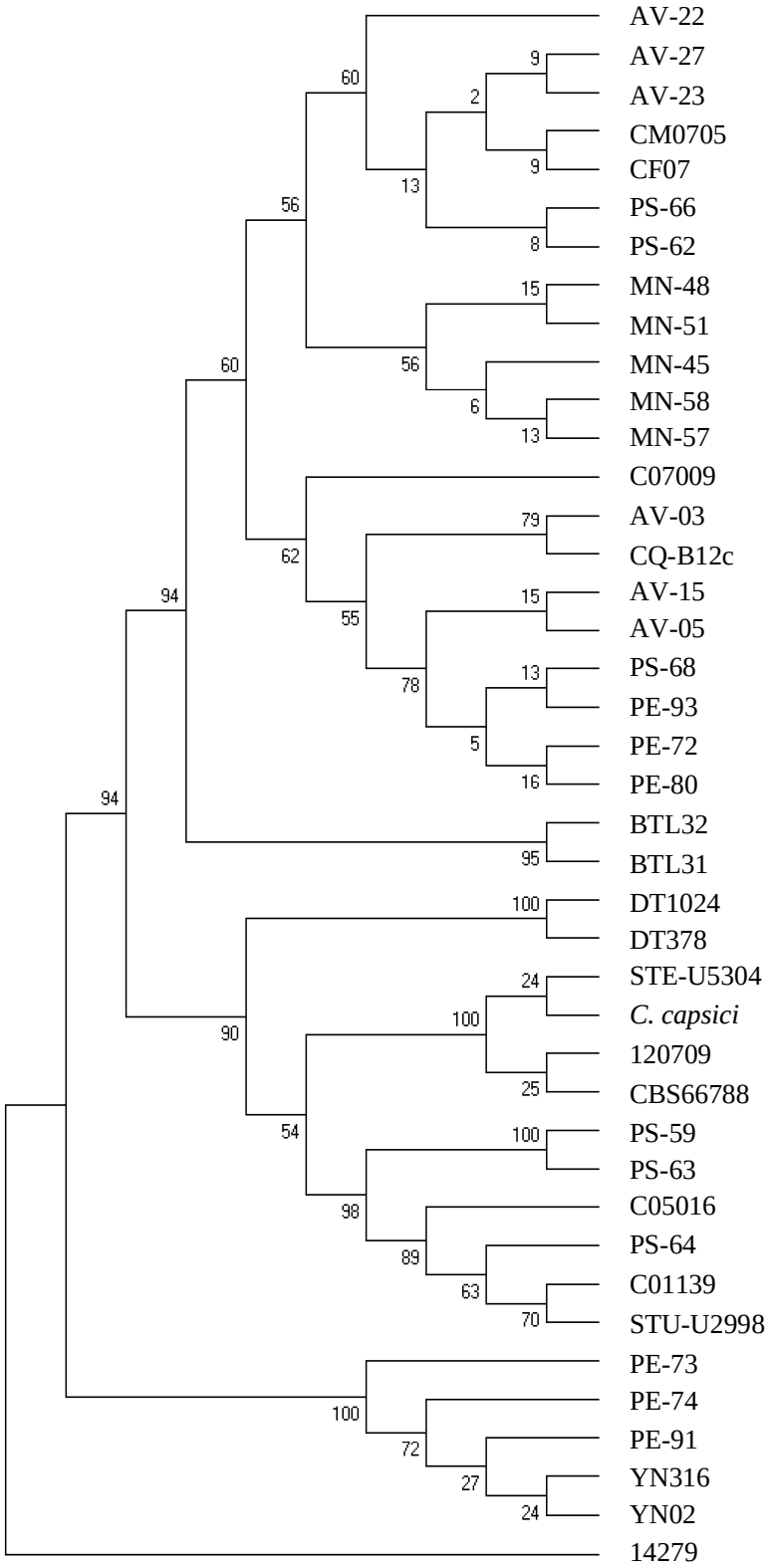

Figura 8 - Árvore filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* utilizando sequências de genes das regiões ITS-5.8S rDNA e β-tubulina de isolados de *Colletotrichum* spp., analisados de forma concatenada. Utilizou-se o método *p-distance* para estimar as distâncias entre as sequências e "bootstrap" (10.000 replicações) para quantificar o erro padrão das estimativas de distância

	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
1	PE-74																																									
2	AV-22	0,074																																								
3	AV-15	0,074	0,010																																							
4	AV-27	0,072	0,002	0,007																																						
5	MN-45	0,074	0,005	0,010	0,002																																					
6	PE-73	0,007	0,072	0,072	0,069	0,072																																				
7	MN-58	0,074	0,005	0,010	0,002	0,000	0,072																																			
8	AV-03	0,072	0,010	0,005	0,007	0,010	0,069	0,010																																		
9	MN-57	0,074	0,005	0,010	0,002	0,000	0,072	0,000	0,010																																	
10	AV-05	0,074	0,010	0,000	0,007	0,010	0,072	0,010	0,005	0,010																																
11	MN-48	0,074	0,005	0,010	0,002	0,000	0,072	0,000	0,010	0,000	0,010																															
12	AV-23	0,072	0,002	0,007	0,000	0,002	0,069	0,002	0,007	0,002	0,007	0,002																														
13	PS-66	0,072	0,002	0,007	0,000	0,002	0,069	0,002	0,007	0,002	0,007	0,002	0,000																													
14	MN-51	0,074	0,005	0,010	0,002	0,000	0,072	0,000	0,010	0,000	0,010	0,000	0,002	0,002																												
15	PS-59	0,095	0,055	0,057	0,053	0,050	0,093	0,050	0,057	0,050	0,057	0,050	0,053	0,053	0,050																											
16	PS-62	0,072	0,002	0,007	0,000	0,002	0,069	0,002	0,007	0,002	0,007	0,002	0,000	0,000	0,002	0,053																										
17	PS-63	0,100	0,060	0,062	0,057	0,055	0,098	0,055	0,062	0,055	0,062	0,055	0,057	0,057	0,055	0,005	0,057																									
18	PS-68	0,074	0,010	0,000	0,007	0,010	0,072	0,010	0,005	0,010	0,000	0,010	0,007	0,007	0,010	0,057	0,007	0,062																								
19	PS-64	0,086	0,050	0,053	0,048	0,045	0,084	0,045	0,048	0,045	0,053	0,045	0,048	0,048	0,045	0,021	0,048	0,026	0,053																							
20	PE-72	0,074	0,010	0,000	0,007	0,010	0,072	0,010	0,005	0,010	0,000	0,010	0,007	0,007	0,010	0,057	0,007	0,062	0,000	0,053																						
21	PE-91	0,002	0,072	0,072	0,069	0,072	0,005	0,072	0,069	0,072	0,072	0,072	0,069	0,069	0,072	0,093	0,069	0,098	0,072	0,084	0,072																					
22	PE-93	0,074	0,010	0,000	0,007	0,010	0,072	0,010	0,005	0,010	0,000	0,010	0,007	0,007	0,010	0,057	0,007	0,062	0,000	0,053	0,000	0,072																				
23	PE-80	0,074	0,010	0,000	0,007	0,010	0,072	0,010	0,005	0,010	0,000	0,010	0,007	0,007	0,010	0,057	0,007	0,062	0,000	0,053	0,000	0,072	0,000																			
24	*C. boninense* (C01139)	0,088	0,053	0,055	0,050	0,048	0,086	0,048	0,050	0,048	0,055	0,048	0,050	0,050	0,048	0,019	0,050	0,024	0,055	0,002	0,055	0,086	0,055	0,055																		
25	*C.boninense* (STE-U2998)	0,088	0,053	0,055	0,050	0,048	0,086	0,048	0,050	0,048	0,055	0,048	0,050	0,050	0,048	0,019	0,050	0,024	0,055	0,002	0,055	0,086	0,055	0,055	0,000																	
26	*C. boninense* (C05016)	0,088	0,055	0,057	0,053	0,050	0,086	0,050	0,053	0,050	0,057	0,050	0,053	0,053	0,050	0,021	0,053	0,026	0,057	0,010	0,057	0,086	0,057	0,057	0,007	0,007																
27	*C. acutatum* (YN316)	0,002	0,072	0,072	0,069	0,072	0,005	0,072	0,069	0,072	0,072	0,072	0,069	0,069	0,072	0,093	0,069	0,098	0,072	0,084	0,072	0,000	0,072	0,072	0,086	0,086	0,086															
28	*C. gloeosporioides* (CM0705)	0,072	0,002	0,007	0,000	0,002	0,069	0,002	0,007	0,002	0,007	0,002	0,000	0,000	0,002	0,053	0,000	0,057	0,007	0,048	0,007	0,069	0,007	0,007	0,050	0,050	0,053	0,069														
29	*C. gloeosporioides* (CF07)	0,072	0,002	0,007	0,000	0,002	0,069	0,002	0,007	0,002	0,007	0,002	0,000	0,000	0,002	0,053	0,000	0,057	0,007	0,048	0,007	0,069	0,007	0,007	0,050	0,050	0,053	0,069	0,000													
30	*C. gloeosporioides* (C07009)	0,076	0,012	0,007	0,010	0,007	0,074	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,010	0,010	0,007	0,055	0,010	0,060	0,007	0,050	0,007	0,074	0,007	0,007	0,053	0,053	0,055	0,074	0,010	0,010												
31	*C. gloeosporioides* (CQ-B12c)	0,072	0,010	0,005	0,007	0,010	0,069	0,010	0,000	0,010	0,005	0,010	0,007	0,007	0,010	0,057	0,007	0,062	0,005	0,048	0,005	0,069	0,005	0,005	0,050	0,050	0,053	0,069	0,007	0,007	0,007											
32	*C. acutatum* (YN02)	0,002	0,072	0,072	0,069	0,072	0,005	0,072	0,069	0,072	0,072	0,072	0,069	0,069	0,072	0,093	0,069	0,098	0,072	0,084	0,072	0,000	0,072	0,072	0,086	0,086	0,086	0,000	0,069	0,069	0,074	0,069										
33	*C. musae* (BTL32)	0,072	0,012	0,017	0,010	0,007	0,069	0,007	0,014	0,007	0,017	0,007	0,010	0,010	0,007	0,048	0,010	0,053	0,017	0,043	0,017	0,069	0,017	0,017	0,045	0,045	0,048	0,069	0,010	0,010	0,014	0,014	0,069									
34	*C. musae* (BTL31)	0,072	0,012	0,017	0,010	0,007	0,069	0,007	0,014	0,007	0,017	0,007	0,010	0,010	0,007	0,048	0,010	0,053	0,017	0,043	0,017	0,069	0,017	0,017	0,045	0,045	0,048	0,069	0,010	0,010	0,014	0,014	0,069	0,000								
35	*C. graminicola* (DT1024)	0,091	0,053	0,053	0,050	0,048	0,088	0,048	0,053	0,048	0,053	0,048	0,050	0,050	0,048	0,048	0,050	0,053	0,053	0,050	0,053	0,088	0,053	0,053	0,048	0,048	0,050	0,088	0,050	0,050	0,050	0,053	0,088	0,045	0,045							
36	*C. graminicola* (DT378)	0,091	0,053	0,053	0,050	0,048	0,088	0,048	0,053	0,048	0,053	0,048	0,050	0,050	0,048	0,048	0,050	0,053	0,053	0,050	0,053	0,088	0,053	0,053	0,048	0,048	0,050	0,088	0,050	0,050	0,050	0,053	0,088	0,045	0,045	0,000						
37	*C. capsici* (STEU5304)	0,093	0,053	0,050	0,050	0,048	0,095	0,048	0,055	0,048	0,050	0,048	0,050	0,050	0,048	0,045	0,050	0,050	0,050	0,045	0,050	0,091	0,050	0,050	0,043	0,043	0,041	0,091	0,050	0,050	0,053	0,055	0,091	0,050	0,050	0,048	0,048					
38	C.capsici	0,093	0,053	0,050	0,050	0,048	0,095	0,048	0,055	0,048	0,050	0,048	0,050	0,050	0,048	0,045	0,050	0,050	0,050	0,045	0,050	0,091	0,050	0,050	0,043	0,043	0,041	0,091	0,050	0,050	0,053	0,055	0,091	0,050	0,050	0,048	0,048	0,000				
39	*C. truncatum* (120709)	0,093	0,053	0,050	0,050	0,048	0,095	0,048	0,055	0,048	0,050	0,048	0,050	0,050	0,048	0,045	0,050	0,050	0,050	0,045	0,050	0,091	0,050	0,050	0,043	0,043	0,041	0,091	0,050	0,050	0,053	0,055	0,091	0,050	0,050	0,048	0,048	0,000	0,000			
40	*C. truncatum* (CBS66788)	0,093	0,053	0,050	0,050	0,048	0,095	0,048	0,055	0,048	0,050	0,048	0,050	0,050	0,048	0,045	0,050	0,050	0,050	0,045	0,050	0,091	0,050	0,050	0,043	0,043	0,041	0,091	0,050	0,050	0,053	0,055	0,091	0,050	0,050	0,048	0,048	0,000	0,000	0,000		
41	*C. chlorophyti* (14279)	0,086	0,069	0,062	0,067	0,069	0,084	0,069	0,067	0,069	0,062	0,069	0,067	0,067	0,069	0,076	0,067	0,081	0,062	0,088	0,062	0,084	0,062	0,062	0,086	0,086	0,088	0,084	0,067	0,067	0,069	0,067	0,084	0,072	0,072	0,084	0,084	0,079	0,079	0,079	0,079	

Figura 9 - Estimativa da distância genética entre as sequências de genes das regiões ITS-5.8S rDNA e β-tubulina de isolados de *Colletotrichum* spp., analisados de forma concatenada, de acordo com modelo gerado no programa Mega 5.5. (TAMURA et al., 2011)

2.3.2.4 Caracterização patogênica

2.3.2.4.1 Agressividade dos isolados no hospedeiro de origem

Todos os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de lesões típicas da antracnose em abacate, manga, maracujá e pêssego mostraram-se patogênicos quando inoculados em seus hospedeiros de origem, reproduzindo os sintomas característicos da doença. Nos frutos inoculados apenas com disco de BDA, utilizados como testemunha, não houve manifestação de sintomas da doença.

A agressividade foi variada entre isolados, permitindo a distinção de grupos dentro de cada hospedeiros quando os diâmetros das lesões foram avaliados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Os isolados de abacate apresentaram variabilidade relativamente baixa, sendo divididos em dois grupos. No primeiro grupo o diâmetro médio das lesões variou entre 34,0 mm e 38,25 mm, diferindo dos isolados do segundo grupo, cujas lesões variaram entre 38,7 a 44,0 mm (Figura 10). Todos os isolados oriundos do município de Dois Córregos foram classificados dentro do grupo de maior agressividade enquanto para os demais municípios não houve um comportamento padrão entre os isolados.

Com relação aos isolados obtidos de manga, houve alta diversidade na agressividade, suficiente para distinção de cinco grupos (Figura 11). Os isolados MN-41, MN-46, MN-48, MN-52, MN-57, MN-58 compuseram o grupo com as maiores lesões, as quais ficam compreendidas entre 35,2 e 37,2 mm de diâmetro, enquanto os isolados MN-31, MN-32, MN-45 formaram o grupo de menor agressividade, com lesões entre 14,5 e 18,0 mm de diâmetro. Não houve correspondência entre o município de origem e a agressividade dos isolados.

Para os isolados de maracujá três grupos foram formados (Figura 12). O grupo menos agressivo foi composto por dois isolados de *C. gloeosporioides* do município de Irapuru, que causaram lesões com médias entre 11,5 e 13,0 mm de diâmetro, ao passo que, o grupo que promoveu as maiores lesões foi composto por sete isolados, com lesões entre 21,5 e 28,5 mm. Os isolados de Adamantina e Bauru foram classificados apenas no grupo de maior agressividade, para os demais municípios os isolados foram classificados em diferentes grupos.

Os isolados de pêssego foram divididos em quatro grupos (Figura 13), não havendo correlação entre a agressividade e a origem dos mesmos. Contudo, apenas os isolados de *C. gloeosporioides* compuseram os dois grupos de maior agressividade, causando lesões entre 19,0 e 24,7 mm de diâmetro, enquanto os dois grupos de menor agressividade foram formados

exclusivamente pelos isolados de *C. acutatum*, que promoveram lesões entre 10,2 a 17,2 mm de diâmetro. Apesar da diferença no tamanho das lesões ocasionadas por essas duas espécies, os sintomas promovidos pelas mesmas foram indistinguíveis, o que impossibilita a diagnose baseada apenas na expressão dos sintomas visando à identificação da espécie.

Os resultados revelam grande heterogeneidade quanto à agressividade dos isolados de cada hospedeiro, com exceção para os isolados de abacate. Isto implica em maior dificuldade no desenvolvimento de métodos de controle efetivos da doença, especialmente quando tais métodos são baseados na resistência genética do hospedeiro.

A ampla variabilidade patogênica de fungos do gênero *Colletotrichum* associados aos hospedeiros aqui estudados, também foi verificada por outros autores. Como exemplo, citamos o trabalho desenvolvido por Almeida e Coêlho (2007), no qual a amplitude no diâmetro das lesões entre 33 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de maracujá após sete dias da inoculação, foi de 3,9 a 19,1 mm, permitindo a classificação dos isolados em dois grupos. De modo semelhante Serra et al. (2011) distinguiram 40 isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de mangueiras em cinco grupos distintos, de acordo com o diâmetro das lesões promovidas em folhas, que variou entre 8,4 e 22,2 mm após sete dias da inoculação. Além desses autores, Swart (1999) igualmente constataram uma alta diversidade patogênica entre 290 isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de abacate e da manga, suficientes para discriminar três grupos entre os isolados de manga e quatro grupos entre os isolados de abacate.

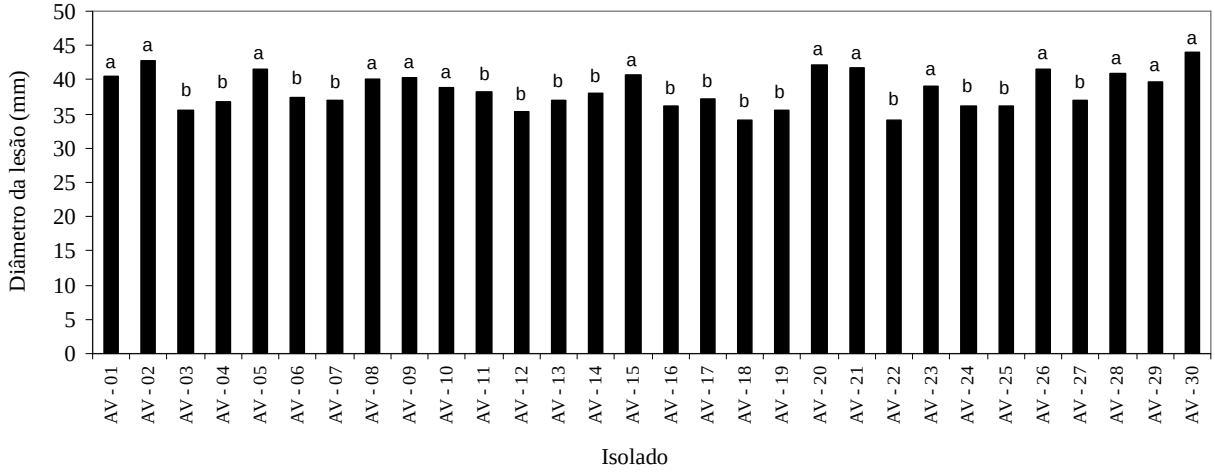

Figura 10 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate após sete dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (Coeficiente de variação = 7,6%)

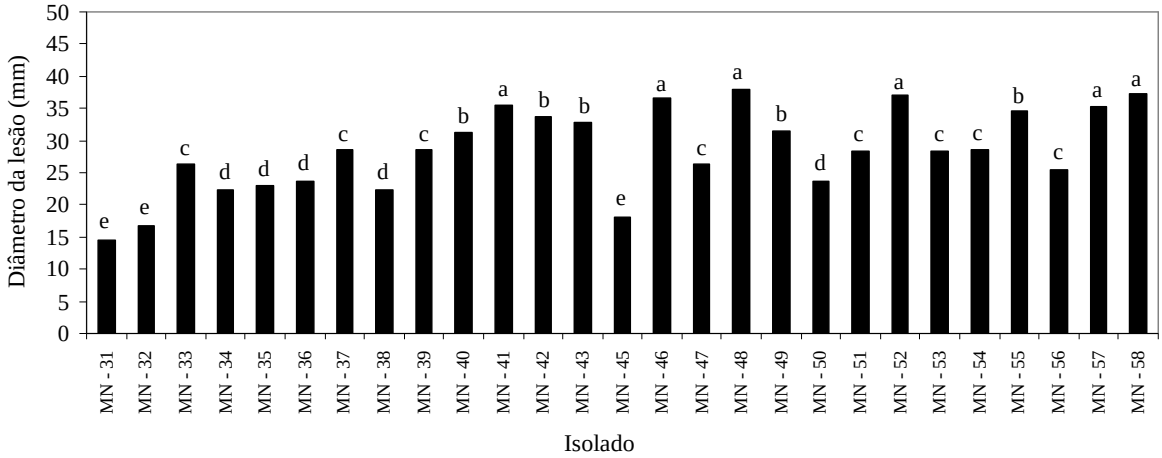

Figura 11 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em manga após sete dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (Coeficiente de variação = 10,4%)

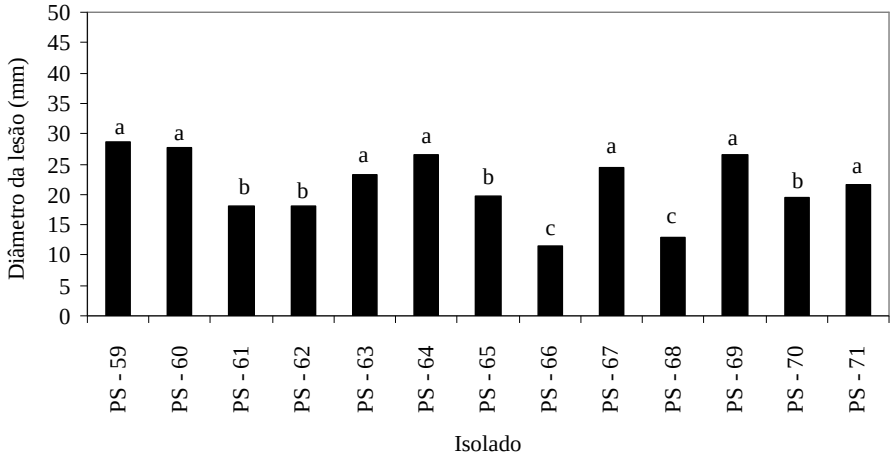

Figura 12 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em maracujá após dez dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (Coeficiente de variação = 27,8%)

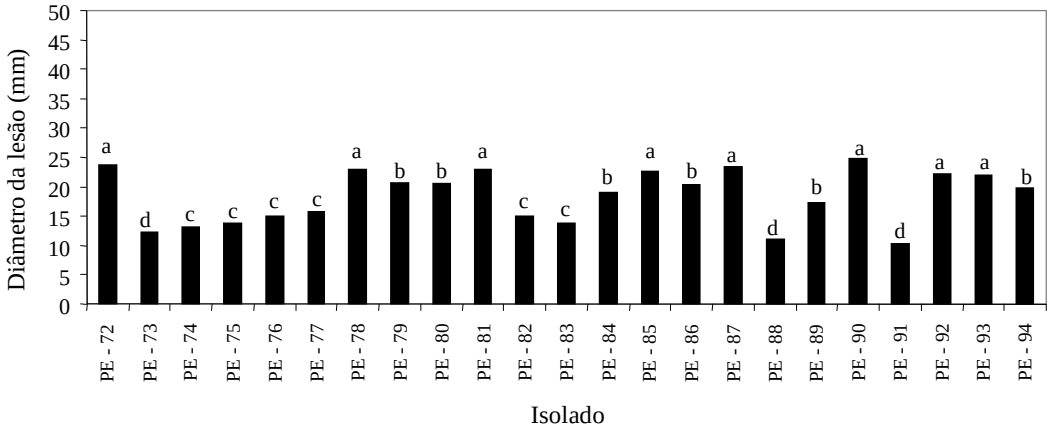

Figura 13 - Diâmetro de lesões promovidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em pêssego após cinco dias da inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (Coeficiente de variação = 11,7%)

2.3.2.4.2 Patogenicidade cruzada

Todos os isolados promoveram sintomas em abacate, manga, maracujá e pêssego quando inoculados com disco de BDA contendo estruturas do fungo, assim como, todos os isolados causaram lesões em abacate, manga e pêssego quando inoculados com suspensões de conídios. Entretanto, nenhum isolado promoveu sintomas em maracujá durante o período de avaliação do experimento quando os frutos foram inoculados com suspensões de conídios. Este fato pode estar relacionado à ocorrência de infecções latentes, de forma que o período compreendido entre o início e o término do experimento pode ter sido insuficiente para a expressão de sintomas. Nos frutos inoculados apenas com disco de BDA ou água destilada, utilizados como testemunha, não houve manifestação de sintomas da doença.

Ao compararmos resultados dos dois métodos de inoculação, constatamos que alguns isolados foram mais agressivos que outros quando inoculados com suspensões de conídios, mas tiveram comportamento contrário quando foram inoculados com discos.

Independente do método de inoculação utilizado, dentro de cada espécie vegetal avaliada constatou-se similaridades estatísticas entre os tamanhos das lesões promovidas por isolados de diferentes hospedeiros. Em abacate, por exemplo, as maiores lesões foram causadas pelos isolados AV-05 (obtido de abacate) e PE-80 (obtido de pêssego), não havendo diferenças significativas entre esses e alguns outros isolados destas e de outras frutíferas. O mesmo ocorreu para a manga, maracujá e pêssego, como pode ser observado nas Tabelas 9 e 10. Esses resultados não correspondem aos constatados por Giblin, Coates e Irwin (2010), os quais verificaram que os isolados de abacate foram significativamente mais agressivos que os isolados de manga quando inoculados em abacate e os isolados de manga foram significativamente mais agressivos que os isolados de abacate quando inoculados na manga.

Os isolados *C. gloeosporioides*, em geral, promoveram as maiores lesões em abacate, manga e pêssego. Para o maracujá, o isolado de *C. boninense* (PS-64) promoveu as maiores lesões, porém, nas demais frutas esse isolado foi menos agressivo que os das demais espécies. Observação semelhante foi feita por Silva-Rojas e Avila-Quezada (2011), que também observaram que *C. boninense* promoveu lesões menores que as causadas por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em abacate. Em relação aos isolados de *C. acutatum* constatou-se baixa agressividade em pêssego, porém, em manga e em abacate esta espécie promoveu lesões com diâmetros similares estatisticamente às causadas pelos isolados mais agressivos.

Apesar de não haver relatos no Brasil de *C. boninense* e *C. acutatum* causando antracnose em abacate, no México estas duas espécies são relatadas (SILVA-ROJAS;

AVILA-QUEZADA, 2011). Neste trabalho, confirmamos que isolados dessas espécies podem, potencialmente, promover antracnose em abacates no Brasil.

Em termos do aspecto das lesões, pode-se constatar que os sintomas da antracnose promovidos pelos isolados de *C. acutatum* e *C. boninense* foram distintos dos causados por *C. gloeosporioides* em abacate. Após sete dias da inoculação, as lesões causadas por *C. acutatum* foram caracterizadas por intensa massa conidial de cor laranja, o isolado de *C. boninense* não produziu massas de esporos e promoveu lesões menores, de cor marrom-clara e os isolados de *C. gloeosporioides* em geral promoveram lesões mais escuras, de marrom a negra, com massa de esporos laranja a salmão pálido (Figura 14). Para os demais hospedeiros não houve diferenças no aspecto das lesões causadas pelas diferentes espécies.

Diferente do que foi constatado neste trabalho, Silva-Rojas e Avila-Quezada (2011) não observaram diferenças evidentes entre os sintomas ocasionados por *C. gloeosporioides* daqueles causados por *C. acutatum* em abacates 'Hass'. Desta forma, a expressão dos sintomas ocasionados por essas espécies parece ser influenciada pela variedade da fruta ou pelas condições ambientais. Assim sendo, a diagnose da doença por meio do aspecto das lesões pode não ter valor relevante quando o objetivo é a identificação da espécie do agente causal.

Tabela 9 – Diâmetro das lesões de antracnose em frutos feridos de diferentes hospedeiros após sete dias da inoculação com discos de batata-dextrose-ágar contendo estruturas de isolados de *Colletotrichum* spp

	Diâmetros das lesões (mm)			
Isolado	**Abacate**	**Manga**	**Maracujá**	**Pêssego**
AV-01	42,3 ab[1]	23,0 b	10,0 bc	28,0 bcd
AV-05	44,0 a	33,0 ab	11,0 bc	33,3 ab
AV-30	40,5 abc	22,5 b	12,8 abc	34,3 ab
MN-48	30,3 cd	32,3 ab	11,5 bc	29,3 abcd
MN-57	43,5 ab	35,3 a	16,5 ab	33,5 ab
MN-58	42,5 ab	31,0 ab	10,5 bc	31,3 abc
PS-64	29,5 d	23,0 b	18,3 a	22,8 d
PS-66	26,5 d	28,0 ab	8,3 bc	28,8 abcd
PS-68	35,8 abcd	32,3 ab	10,3 bc	25,5 cd
PE-72	43,3 ab	29,5 ab	10,3 bc	34,8 a
PE-73	27,5 d	32,5 ab	11,0 bc	22,8 d
PE-80	45,3 a	24,5 ab	7,5 c	30,8 abc
PE-83	33,3 bcd	23,5 ab	10,0 bc	24,8 cd
C.V.(%)[2]	11,3	16,9	23,5	9,0

[1] Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente segundo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. [2] Coeficiente de variação.

Tabela 10 – Diâmetro das lesões de antracnose em frutos feridos de diferentes hospedeiros após sete dias da inoculação com suspensão de conídios (10^5 conídios/mL) de isolados de *Colletotrichum* spp

Isolado	Diâmetro médio das lesões (mm)							
	Abacate		Manga		Maracujá		Pêssego	
AV-01	21,0	abcd[1]	16,8	ab	0,0	a	20,5	abcd
AV-05	25,8	a	26,3	a	0,0	a	21,3	abc
AV-30	23,3	abc	17,5	ab	0,0	a	24,5	a
MN-48	19,3	abcd	21,0	ab	0,0	a	20,3	abcd
MN-57	21,5	abcd	27,3	a	0,0	a	19,3	abcd
MN-58	17,8	bcde	24,5	ab	0,0	a	15,8	cd
PS-64	10,8	e	15,3	b	0,0	a	14,5	d
PS-66	15,5	de	25,5	ab	0,0	a	21,8	abc
PS-68	16,5	cde	24,3	ab	0,0	a	14,8	d
PE-72	24,3	ab	22,5	ab	0,0	a	24,8	a
PE-73	18,8	abcd	23,3	ab	0,0	a	18,0	bcd
PE-80	25,5	a	18,3	ab	0,0	a	22,5	ab
PE-83	20,0	abcd	17,8	ab	0,0	a	17,5	bcd
C.V.(%)[2]	14,7		19,6		0,0		12,8	

[1] Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente segundo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. [2] Coeficiente de variação.

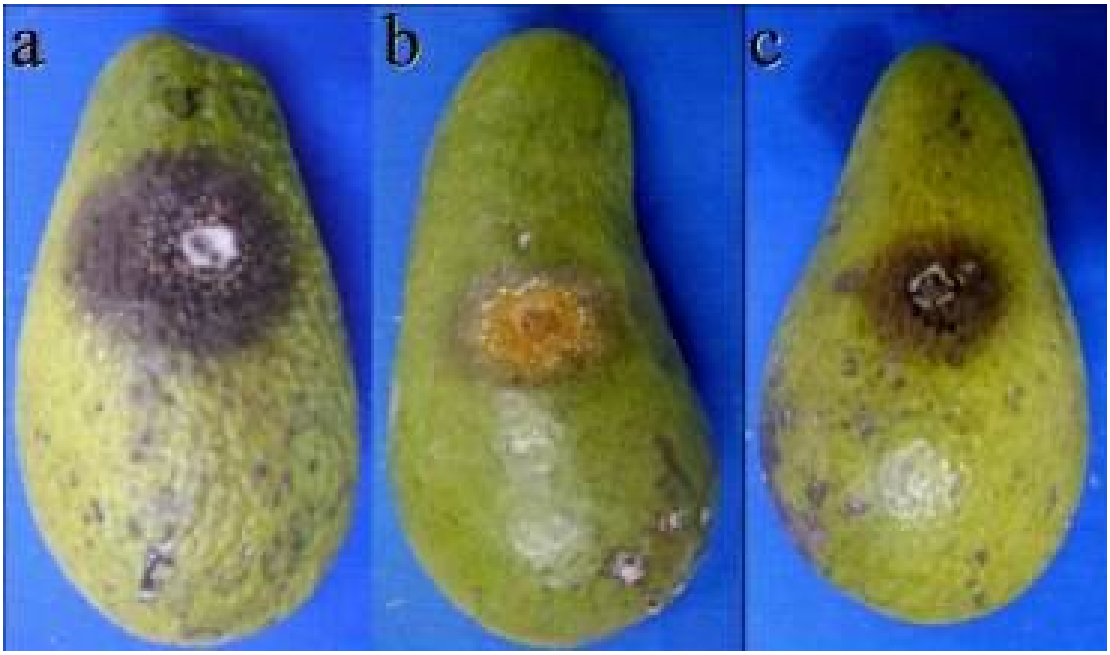

Figura 14 – Sintomas causados por *Colletotrichum gloeosporioides* (AV-05), *C. acutatum* (PE-83) e *C. boninense* (PS-64) em abacate 'Fuerte'

Os resultados indicam a ausência de especificidade patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego aos seus hospedeiros de origem, o que corrobora as observações de outros autores no Brasil, a exemplo de Bonett et al. (2010). Esses autores confirmaram, através de inoculações artificiais, que isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de diferentes hospedeiros promoveram antracnose em várias espécies de frutas, incluindo abacate, o qual foi suscetível aos isolados de mamão, fruta-do-conde, pimentão verde, chuchu, jiló, manga e pimenta. Semelhantemente, Peres et al. (2002), Silva et al. (2006) e Lima Filho, Oliveira e Menezes (2003) ao estudarem isolados de *Colletotrichum* spp. de algumas frutíferas demonstraram que, potencialmente, infecções cruzadas podem ocorrer.

Em Israel, Freeman e Shabi (1996) também constataram que isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de amêndoa, maçã, abacate e manga, bem como isolados de *C. acutatum* de maçã e pêssego, infectam frutos destacados de outros hospedeiros, incluindo abacate, amêndoa, maçã, manga e nectarina. Posteriormente, Freeman, Katan e Shabi (1998) ressaltaram que estes experimentos foram realizados sob condições extremas, comumente aplicadas em inoculações artificiais e que apesar desses hospedeiros serem cultivados muito próximos em algumas regiões daquele país, não há comprovação da ocorrência de infecção cruzada em condições naturais.

A afirmação de Freeman, Katan e Shabi (1998) deve ser considerada no presente trabalho, pois embora as inoculações artificiais demonstrem que os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego possuem o potencial de causar antracnose em frutos de todos esses hospedeiros, não existe comprovação de que isto ocorre em condições naturais. Uma evidência disto é a inexistência de relatos das espécies *C. acutatum* em abacate, manga e maracujá e de *C. boninense* em abacate, manga e pêssego no Brasil, embora as mesmas tenham causado antracnose em frutos dessas espécies quando inoculados artificialmente.

Diante da incerteza de que as infecções cruzadas verificadas neste e em outros trabalhos possam ocorrer em condições naturais é necessário que novos estudos sejam realizados, visando determinar quais plantas efetivamente atuam como fontes de inóculo para a antracnose do abacateiro. Essa informação é de grande importância para a determinação de estratégias de controle desta doença, tendo em vista que os abacateiros são cultivados predominantemente em pequenas ou médias propriedades, situadas em regiões onde comumente existem propriedades vizinhas que se dedicam ao cultivo de diferentes frutíferas.

Além disso, tem se recomendado o cultivo associado de abacateiros com outras espécies de plantas, a exemplo do maracujá (KOLLER, 1992), o que aumenta ainda mais o risco de infecção cruzada.

2.3.2.5 Caracterização enzimática

Segundo os testes realizados detectou-se a capacidade de isolados de *Colletotrichum* obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego produzirem diferentes tipos de enzimas (Figuras 15 e 16), que podem atuar durante os processos de infecção e colonização do hospedeiro, bem como, constatou-se a existência de variabilidade na produção dessas enzimas entre os isolados avaliados, como pode ser visualizado na Tabela 11.

Nenhum isolado promoveu halo de degradação no substrato específico para detecção da atividade amilolítica, resultado que difere dos constatados por Pereira (2009) que constatou atividade amilolítica entre isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* de goiaba e de Lima Filho, Oliveira e Menezes (2003) que observaram a produção desta enzima para isolados de *C. musae* de banana e *C. gloeosporioides* de caju, manga e maracujá. Entretanto, neste trabalho observou-se que todos os isolados cresceram neste substrato que contém amido como única fonte de carbono e que é considerado uma fonte de energia utilizada por fungos (GRIFFIN, 1994). Desta forma, a produção de amilases pode ter ocorrido, mas em quantidade insuficiente para formação do halo.

Em relação à catalase, constatou-se que todos os isolados a produziram, sendo classificados em dois grupos, de acordo com o volume de gás oxigênio liberado durante a reação de quebra do peróxido de hidrogênio, observado indiretamente por meio do maior ou menor borbulhamento do gás na solução (Figura 15). A produção de catalase foi constatada em *C. gloeosporioides* var. *malvae* e esta poderia atuar durante a fase colonização necrotrófica deste fungo, evitando danos causados pelo peróxido de hidrogênio originário de células degeneradas do hospedeiro (GOODWIN; LI; JIN, 2001). Além disso, existem indícios de que a catalase atua suprimindo as respostas de defesa das plantas, fato demonstrado por Dixon, Harrison e Lamb (1994), segundo os quais o tratamento de sementes de soja com esta enzima promoveu o bloqueio do acúmulo da gliceolina, uma fitoalexina induzida por *Verticillium dahliae*.

A atividade celulolítica foi observada para todos os isolados, com exceção de AV-27. (Tabela 11). Estes isolados foram classificados em oito grupos de acordo com a área do halo decorrente da ação das celulases. O grupo que promoveu os halos com as maiores áreas foi

formado por 18 isolados, de distintos hospedeiros e procedências. A produção de celulases é importante para fungos fitopatogênicos, haja vista que a celulose e as hemiceluloses, em conjunto com substâncias pécticas, são componentes estruturais da parede celular vegetal, atuando como uma barreira física para a colonização do patógeno (CAVALCANTI, 2007).

A exemplo dos resultados obtidos, Lima Filho, Oliveira e Menezes (2003) observaram produção de celulase por isolados de *C. gloeosporioides* de manga e maracujá. Por sua vez, Pereira (2009) além de observar a atividade celulolítica em isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* pode diferenciar essas espécies pelo fato da primeira espécie ter maior atividade desta enzima quando comparada com a segunda. No presente trabalho, entretanto, este fato não foi confirmado, tendo em vista que nenhum isolado de *C. acutatum* integrou o grupo no qual houve as maiores áreas de degradação da celulose.

Considerando a lacase, observou-se que não houve produção desta enzima para 35 isolados (Tabela 11), os demais isolados apresentaram atividade distinta para esta enzima, sendo classificados em oito grupos. O grupo que apresentou os maiores halos no substrato específico para detecção desta enzima foi formado por três isolados de abacate (AV-19, AV-29, AV-30) e por dois isolados de pêssego (PE-85 e PE-87), todos identificados como sendo *C. gloeosporioides*. As lacases são glicoproteínas polifenol oxidases que atuam na degradação da lignina e, segundo Obara, Varéa-Pereira e Miyagui (2005), podem estar envolvidas na patogenicidade de alguns fungos.

A atividade lipolítica não foi observada para 11 isolados (AV-27, MN-34, MN-41, MN-46, PS-59, PS-61, PS-69, PE-73, PE-83, PE-88 e PE-91), os demais apresentaram atividade lipolítica variada. Os isolados foram classificados em nove grupos, de acordo com a área do halo opaco decorrente da degradação de lipídios no meio de cultura. O grupo que apresentou os halos com as maiores áreas foi formado por dois isolados de pêssego (PE-86 e PE-89), ambos pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*. As lipases são enzimas do tipo esterases, que inclui a cutinase, uma importante enzima responsável pela degradação da cutina, um biopoliéster insolúvel que constitui o componente estrutural da cutícula das plantas, a qual atua como a primeira barreira física da planta contra os patógenos (KOLATTUKUDY, 1985; MACEDO; PIO, 2005). A importância dessa enzima durante a infecção de *C. gloeosporioides* foi demonstrada por Dickman e Patil (1986) ao comprovarem que isolados mutantes desta espécie foram incapazes de causar sintomas em mamão.

No caso da pectinase, constatou-se que todos os isolados produziram esta enzima, sendo classificados em três grupos conforme a área do halo translúcido que se formou no

meio de cultura. O grupo que promoveu os halos com maiores áreas foi composto por 23 isolados e o grupo que promoveu halos com as menores áreas foi composto por 56 isolados. Todos os isolados de pêssego, exceto um (PE-72), foram classificados dentro do grupo com menores áreas de degradação decorrente da ação da pectinase. Segundo Silva et al. (2005), a pectato liase, um tipo de pectinase, atua sobre a matriz de pectato da parede celular vegetal, em conjunto com outras enzimas pectiolíticas, como a metilesterases da pectina e poligalacturonases. O papel dessa enzima durante a patogênese foi avaliado por Wattad et al. (1997) os quais observaram 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*. Yakoby et al. (2001) também demonstraram a necessidade da expressão dessa enzima durante os processos patogênicos de *C. gloeosporioides* em abacates. Esses autores verificaram que a severidade da antracnose nos frutos inoculados com isolados mutantes, incapazes de produzir esta enzima, foi de 36% a 45% menor que a dos frutos inoculados com isolados que não sofreram mutação.

Finalmente, todos os isolados apresentaram atividade da proteolítica. A área do halo formado pela ação das proteinases permitiu separar os isolados em nove grupos, onde o isolado AV-11 destacou-se por promover halo com maior área. A importância das proteinases durante a patogênese de *C. coccodes* foi verificada por Redman e Rodriguez (2002), ao comprovarem que mutantes desta espécie que não produziam esta enzima não foram virulentos.

Embora os resultados obtidos demonstrem que os isolados apresentam diferenças quanto à atividade de algumas enzimas que podem estar envolvidas na infecção e colonização do hospedeiro, não houve correção significativa ($p<0,05$) entre as atividades enzimáticas *in vitro* e agressividade dos isolados nos seus hospedeiros de origem (valores de “r” não demonstrados).

Resultados similares foram constatados por Almeida e Coêlho (2007), os quais também não constataram a correlação entre a atividade *in vitro* da amilase, lipase, proteinase e celulose, com a agressividade de isolados de *C. gloeosporioides* em maracujá amarelo.

Por outro lado, a correlação entre a atividade enzimática *in vitro* e a agressividade do isolado tem sido constatada por alguns autores. Este é o caso do trabalho desenvolvido por Pereira (2009), no qual foi demonstrada a correlação positiva entre a área de degradação do amido, lipídio e pectina *in vitro* e agressividade de isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em goiaba. Semelhantemente, Couto, Menezes e Coêlho (2002) observaram uma

alta correlação entre a atividade amilolítica e o diâmetro das lesões de isolados de *C. musae* em bananas.

A baixa correlação entre a produção de enzimas em substrato artificial e a agressividade dos isolados no hospedeiro, entretanto, não é um bom indicativo de que essas enzimas não participam dos processos de infecção e colonização do hospedeiro, pois o substrato tem influência sobre a expressão das enzimas e a reprodução exata das condições oferecidas pelo substrato natural é difícil de ser reproduzida em meio artificial.

Em abacate, por exemplo, foi verificado que durante o amadurecimento o pericarpo tem o seu pH aumentado de 5.2 para 6.1 e o patógeno *C. gloeosporioides* contribui para a alcalinização do meio, por meio da indução do acúmulo de amônia nos tecidos do hospedeiro. Este processo ocorre através da indução da expressão de genes regulatórios, entre eles o pacC, um forte regulador de genes dependentes de pH, e que é conhecido como importante regulador do gene pelB (KRAMER-HAIMOVICH et al.,2006). A alcalinização do meio é necessário para ativação de diversas enzimas extracelulares, a exemplo da pectato liase (CAVALCANTI, 2007).

Tabela 11 – Área do halo de degradação (cm^2) resultante da atividade das enzimas celulase, lacase, lipase, pectinase e proteinase e atividade da enzima catalase produzidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em meios de cultura específicos

(continua)

Isolados	Enzimas (área do halo de degradação - cm^2)					Atividade da catalase[2]
	Celulose	Lacase	Lipase	Pectinase	Proteinase	
AV-01	14,0 a[1]	0,0 h	8,3 c	7,7 a	6,4 f	+
AV-02	11,1 d	0,0 h	4,0 f	5,1 b	5,4 g	+
AV-03	11,7 c	11,1 d	6,9 d	4,8 c	3,3 i	+
AV-04	12,3 b	8,5 e	5,0 e	7,1 a	9,7 c	+
AV-05	13,0 b	13,8 c	4,6 f	7,8 a	3,4 i	+
AV-06	13,3 a	0,0 h	2,1 h	6,9 a	8,0 d	+
AV-07	11,3 c	0,0 h	6,2 e	4,7 c	8,1 d	+
AV-08	14,1 a	0,0 h	4,1 f	7,6 a	6,8 e	+
AV-09	13,6 a	0,0 h	6,3 e	6,0 b	5,1 g	++
AV-10	13,0 b	0,0 h	3,4 g	7,2 a	6,5 f	+
AV-11	14,4 a	0,0 h	4,2 f	6,9 a	13,3 a	++
AV-12	12,6 b	14,8 c	8,3 c	3,2 c	4,3 h	+
AV-13	14,5 a	15,9 b	4,2 f	3,0 c	4,1 h	+
AV-14	11,5 c	0,0 h	3,2 g	7,3 a	8,2 d	+
AV-15	10,8 d	0,0 h	5,3 e	5,5 b	8,1 d	+
AV-16	12,6 b	13,3 c	3,7 g	6,5 b	5,5 g	+
AV-17	10,5 d	13,2 c	5,7 e	7,4 a	5,4 g	+
AV-18	11,7 c	15,0 c	9,5 b	3,1 c	4,1 h	+

Tabela 11 – Área do halo de degradação (cm^2) resultante da atividade das enzimas celulase, lacase, lipase, pectinase e proteinase e atividade da enzima catalase produzidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em meios de cultura específicos

(continuação)

Isolados	Enzimas (área do halo de degradação – cm^2)					Atividade da catalase[2]
	Celulose	Lacase	Lipase	Pectinase	Proteinase	
AV-19	8,0 f	17,1 a	5,7 e	3,1 c	7,3 e	+
AV-20	11,9 c	0,0 h	2,5 g	3,1 c	4,1 h	+
AV-21	13,0 b	0,0 h	8,6 b	5,9 b	6,8 e	+
AV-22	13,3 a	13,8 c	4,3 f	2,9 c	5,0 g	+
AV-23	13,6 a	13,6 c	6,1 e	5,8 b	6,0 f	+
AV-24	10,6 d	15,6 b	7,0 d	3,7 c	8,5 d	+
AV-25	8,5 f	0,0 h	9,5 b	7,2 a	5,2 g	+
AV-26	13,7 a	0,0 h	8,1 c	3,3 c	5,1 g	+
AV-27	0,0 h	0,0 h	0,0 i	5,5 b	9,1 c	+
AV-28	10,9 d	0,0 h	7,7 c	4 c	10,9 b	+
AV-29	11,2 d	18,1 a	6,3 e	7,7 a	4,9 g	+
AV-30	10,8 d	18,8 a	9,0 b	3,0 c	3,5 i	+
MN-31	14,7 a	11,2 d	3,2 g	7,5 a	5,3 g	+
MN-32	9,7 e	0,0 h	3,1 g	2,7 c	5,1 g	+
MN-33	10,0 d	15,9 b	6,1 e	3,2 c	4,1 h	+
MN-34	12,8 b	7,7 e	0,0 i	7,5 a	4,6 h	+
MN-35	12,9 b	0,0 h	5,9 e	7,5 a	5,8 f	+
MN-36	10,5 d	0,0 h	7,3 d	7,8 a	6,1 f	+
MN-37	10,7 d	14,3 c	6,8 d	2,8 c	6,5 f	+
MN-38	11,0 d	0,0 h	4,5 f	3,1 c	5,1 g	+
MN-39	12,7 b	10,9 d	7,6 c	5,1 b	5,8 f	+
MN-40	12,7 b	0,0 h	5,8 e	3,1 c	3,0 i	+
MN-41	14,0 a	10,6 d	0,0 i	2,9 c	6,7 e	+
MN-42	11,7 c	0,0 h	2,0 h	6,2 b	5,1 g	+
MN-43	12,2 b	0,0 h	5,1 e	4,2 c	9,6 c	+
MN-45	11,1 d	13,9 c	6,4 e	5,7 b	5,0 g	+
MN-46	13,7 a	2,1 g	0,0 i	3,0 c	6,4 f	+
MN-47	11,8 c	3,5 g	6,1 e	7,1 a	6,7 e	+
MN-48	11,4 c	12,2 d	7,4 d	6,7 a	5,9 f	+
MN-49	13,8 a	9,8 d	6,1 e	7,3 a	5,6 g	+
MN-50	9,4 e	3,3 g	2,2 h	7,4 a	5,9 f	+
MN-51	15,2 a	3,8 g	4,1 f	4,9 c	5,4 g	+
MN-52	14,0 a	14,6 c	7,5 d	7,6 a	4,2 h	+
MN-53	12,6 b	0,0 h	8,0 c	3,4 c	7,2 e	+
MN-54	12,5 b	0,0 h	5,1 e	3,6 c	4,0 h	+
MN-55	14,5 a	0,0 h	9,5 b	3,6 c	7,0 e	+
MN-56	13,1 a	0,0 h	0,9 h	4,1 c	6,5 f	+
MN-57	11,1 d	12,9 c	4,3 f	6,5 b	4,2 h	++
MN-58	14,1 a	13,7 c	1,1 h	6,0 b	6,0 f	+
PS-59	9,6 e	6,2 f	0,0 i	1,9 c	7,0 e	+

Tabela 11 – Área do halo de degradação (cm^2) resultante da atividade das enzimas celulase, lacase, lipase, pectinase e proteinase e atividade da enzima catalase produzidas por isolados de *Colletotrichum* spp. em meios de cultura específicos

(continuação)

Isolados	Enzimas (área do halo de degradação – cm^2)					Atividade da catalase[2]
	Celulose	Lacase	Lipase	Pectinase	Proteinase	
PS-60	8,5 f	10,9 d	7,9 c	6,7 a	8,4 d	+
PS-61	6,4 g	0,0 h	0,0 i	3,5 c	3,9 h	+
PS-62	11,0 d	0,0 h	1,6 h	3,9 c	6,9 e	+
PS-63	8,2 f	1,8 h	1,5 h	3,6 c	11,0 b	+
PS-64	10,6 d	11,5 d	6,9 d	5,9 b	5,4 g	+
PS-65	7,9 f	7,6 e	0,9 h	2,4 c	4,6 h	+
PS-66	11,6 c	0,0 h	6,2 e	3,3 c	3,8 h	+
PS-67	10,6 d	0,0 h	0,2 i	3,2 c	8,9 d	+
PS-68	12,0 c	16,3 b	3,5 g	3,0 c	7,9 d	+
PS-69	6,3 g	7,1 e	0,0 i	1,6 c	7,5 e	+
PS-70	13,9 a	0,5 g	1,4 h	5,8 b	8,2 d	+
PS-71	10,9 d	0,0 h	0,5 i	8,1 a	10,9 b	+
PE-72	12,4 b	13,6 c	10,1 b	7,6 a	3,7 h	+
PE-73	10,1 d	14,6 c	0,0 i	3,9 c	3,9 h	++
PE-74	11,2 d	8,7 e	1,7 h	2,6 c	5,0 g	++
PE-75	10,4 d	14,0 c	1,2 h	2,9 c	3,3 i	+
PE-76	12,4 b	16,6 b	1,8 h	2,7 c	3,1 i	++
PE-77	10,9 d	0,0 h	1,5 h	3,2 c	3,3 i	++
PE-78	9,7 e	0,0 h	7,1 d	3,7 c	6,0 f	+
PE-79	11,9 c	8,5 e	7,3 d	3,9 c	3,7 i	+
PE-80	10,1 d	10,7 d	7,9 c	4,0 c	5,2 g	+
PE-81	12,3 b	15,5 b	6,8 d	3,2 c	6,4 f	+
PE-82	10,5 d	16,0 b	0,6 i	2,8 c	3,4 i	++
PE-83	10,6 d	8,2 e	0,0 i	2,7 c	4,2 h	++
PE-84	9,2 e	13,3 c	8,4 c	4,6 c	9,2 c	+
PE-85	10,5 d	17,4 a	4,0 f	3,4 c	3,6 i	+
PE-86	10,7 d	12,0 d	13,5 a	2,9 c	9,2 c	+
PE-87	9,9 d	18,4 a	8,0 c	3,1 c	7,7 d	++
PE-88	10,9 d	5,5 f	0,0 i	2,5 c	5,4 g	++
PE-89	12,5 b	14,2 c	12,9 a	4,2 c	8,1 d	+
PE-90	11,3 c	14,8 c	5,2 e	3,3 c	10,8 b	+
PE-91	12,5 b	0,8 g	0,0 i	2,1 c	6,9 e	++
PE-92	12,1 c[1]	15,3 c	5,5 e	3,0 c	3,0 i	+
PE-93	11,9 c	0,0 h	10,4 b	5,0 c	6,7 e	+
PE-94	11,4 c	16,2 b	6,8 d	3,1 c	3,0 i	+
C.V. (%)[3]	8,2	20,3	17,4	30,3	10,8	

[1] Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. [2] (+) baixa atividade, (++) alta atividade. [3] Coeficiente de variação.

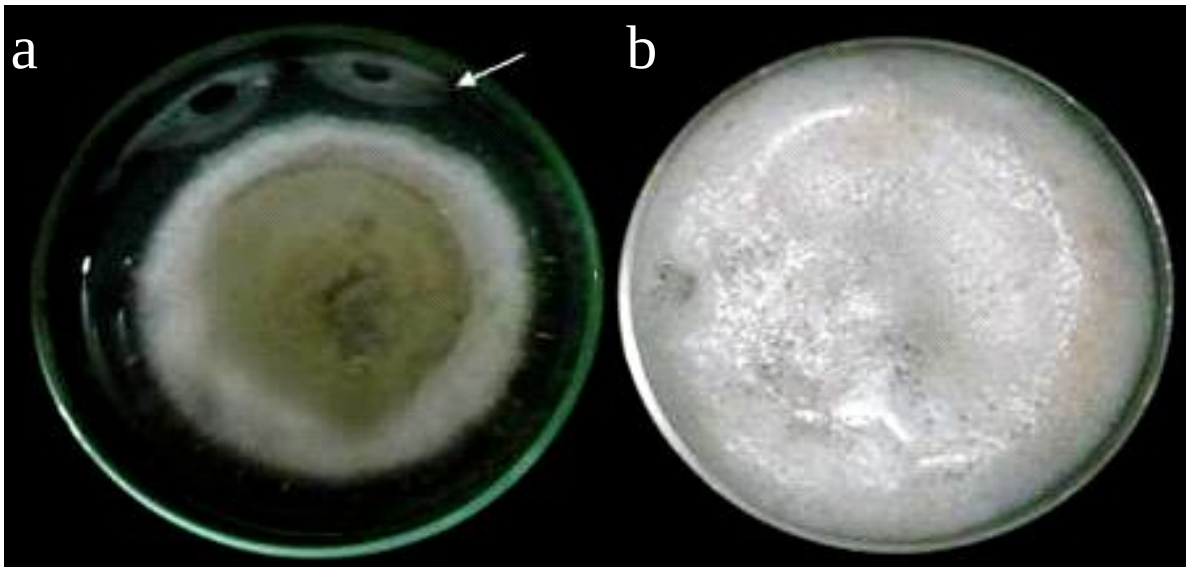

Figura 15 - Decomposição do peróxido de hidrogênio em placas de Petri com colônias de *Colletotrichum* cultivadas em meio a 25 ºC, sob fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias em meio batata-dextrose-ágar: (a) baixa atividade da catalase (pouco borbulhamento de gás na solução, indicado pela seta); (b) alta atividade da catalase (borbulhamento de gás intenso na solução em toda a placa)

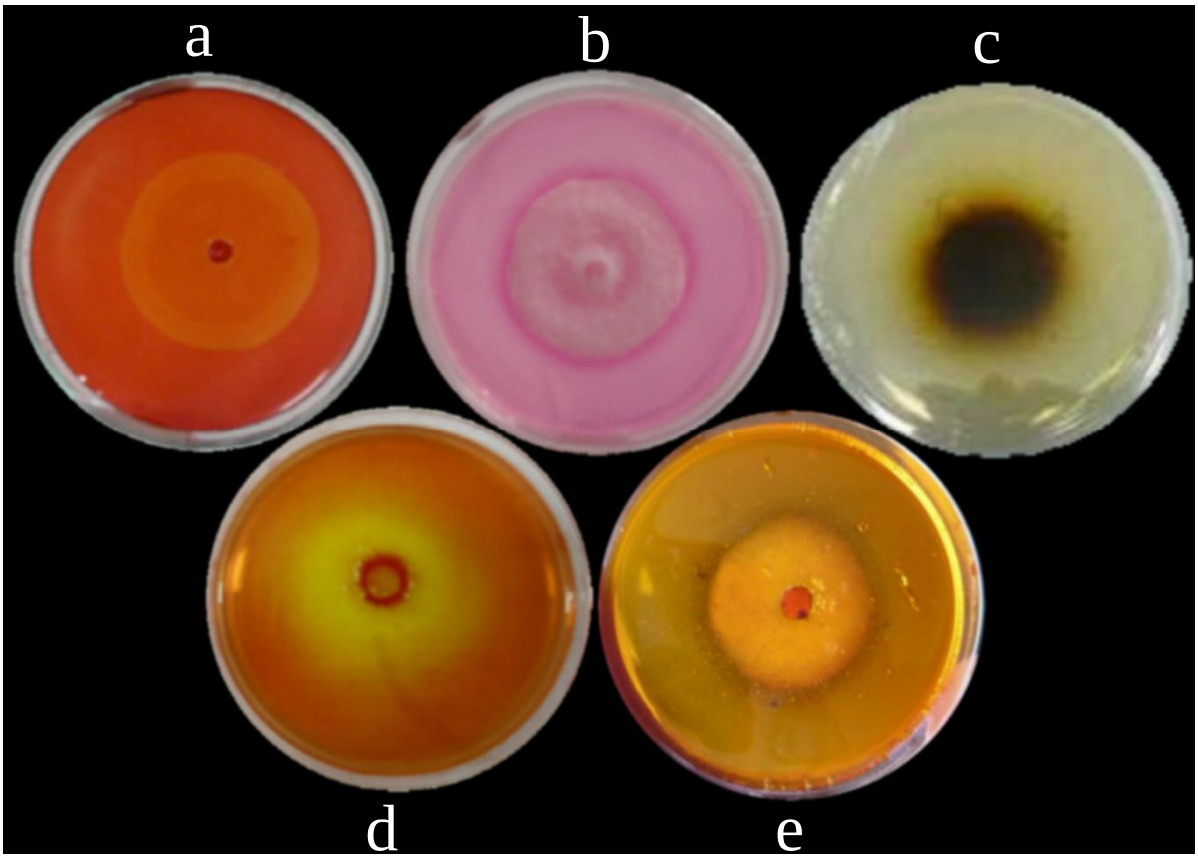

Figura 16 - Halos promovidos pela atividade *in vitro* da celulase (a), lípase (b), lacase (c), proteinase (d) e pectinase (e) de isolados de *Colletotrichum* spp. de frutíferas cultivados em substrato sólido específico

2.3.3 Efeito da temperatura e período de molhamento sobre a pré-penetração infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates 'Hass' e 'Fuerte'

2.3.3.1 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*

Temperatura e período de molhamento tiveram forte influência sobre germinação e formação de apressórios de *C. gloeosporioides*, como pode ser observado nas Figuras 17 e 18.

As superfícies de respostas da germinação de conídios (i) e formação de conídios com apressórios (ii), ajustadas pelo modelo beta-monomolecular, foram descritas, respectivamente, pelas equações abaixo:

(i) Z=((0,001043)*((T-(4,11959)) ^ (2,54203)) * (((40,0006)-T) ^ (2,18824))) * ((0,117833) * (1-(2,90061) * EXP((0,39454)* M)))

(ii) Z=((0,0000787)*((T-(4,16538))^(3,36691))*(((40,0)-T)^(2,70413)))*((0,032341)*(1-(2,38677)*EXP(-(0,292395)*M)))

Para as duas equações descritas anteriormente, Z corresponde a variável analisada, T corresponde a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (horas).

A germinação de conídios e formação de apressórios ocorreu em ampla faixa de temperatura, compreendida entre 10ºC e 35ºC, não sendo constatada a germinação de conídios nas temperaturas de 5 e 40ºC.

Nas temperaturas de 10ºC e 35ºC houve baixas percentagens de conídios germinados e conídios com apressórios. Essas variáveis atingiram valores máximos com 24 horas de molhamento, com percentagens médias de conídios germinados de 17,2% a 10ºC e de 18,2% a 35ºC e percentagem de conídios com apressórios de 2,5% a 10ºC e de 4% a 35ºC.

A faixa compreendida entre 15 e 30ºC foi favorável para a germinação de conídios, promovendo valores acima de 50% de conídios germinados a partir de 6 horas de molhamento. Após 12 horas de molhamento, a percentagem de conídios com apressórios foi de 42% a 15ºC e superior a 50% entre 20ºC e 30ºC.

Em relação ao período de molhamento, constatou-se que três horas foram suficientes para a germinação de alguns conídios incubados entre 15 e 30ºC. Quando os mesmos foram incubados a 10ºC o período mínimo para a germinação de conídios foi de 12 horas enquanto a 35ºC o mínimo foi de seis horas.

O aumento no período de molhamento resultou em maiores percentagens de conídios germinados e apressórios formados entre 10 e 35ºC. Observou-se que com três horas de

molhamento a percentagem de conídios germinados foi inferior a 15% enquanto com 24 horas de molhamento mais de 90% dos conídios germinaram e formaram apressórios em temperaturas entre 20 e 30ºC.

Considerando o período de molhamento de 24 horas, a temperatura ótima calculada através da equação ajustadas pelo modelo beta-monomolecular para a germinação e conídios foi de 23,4ºC enquanto para a formação de apressórios foi de 24,0ºC. Esses valores são próximos às temperaturas médias observadas na maioria dos municípios paulistas durante o maior período do ano (MIRANDA et al., 2011).

Os resultados deste trabalho são similares aos constatados por Soares, Lourenço e Amorim (2008) e por Moraes (2009) para isolados de *C. gloeosporioides* obtido de goiabeira. Como no presente trabalho, esses autores constataram que a germinação de conídios e formação de apressórios foi inibida nas temperaturas de 5 e 40ºC e ocorreu entre 10°C a 35°C, com maiores percentagens de conídios germinados e apressórios formados entre as temperaturas de 20 e 25°C.

Tais resultados revelam que este fungo é capaz de explorar ampla faixa de temperatura, indicando que este é capaz de germinar e formar apressórios em qualquer época do ano e período do dia, pois são raros e curtos os períodos onde as temperaturas ambientes ficam abaixo de 5ºC ou acima de 40ºC nas regiões produtoras de abacate do Brasil.

A capacidade do fungo explorar ampla faixa de temperatura pode inviabilizar o desenvolvimento de sistemas de previsão de doenças baseados nessa variável (MORAES, 2009).

O fato da germinação dos conídios de *C. gloeosporioides* ser totalmente inibida na temperatura de 5ºC, demonstra que a refrigeração consiste em um método adequado para evitar novas infecções em frutos sob pós-colheita. Constatação semelhante foi feita por Everett (2003), o qual estudando isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* obtidos de abacate, observou que a germinação de conídios de *C. acutatum* sob temperaturas inferiores a 7,1ºC foi totalmente inibida, enquanto *C. gloeosporioides* teve a germinação de conídios inibida em temperaturas abaixo de 13,7ºC.

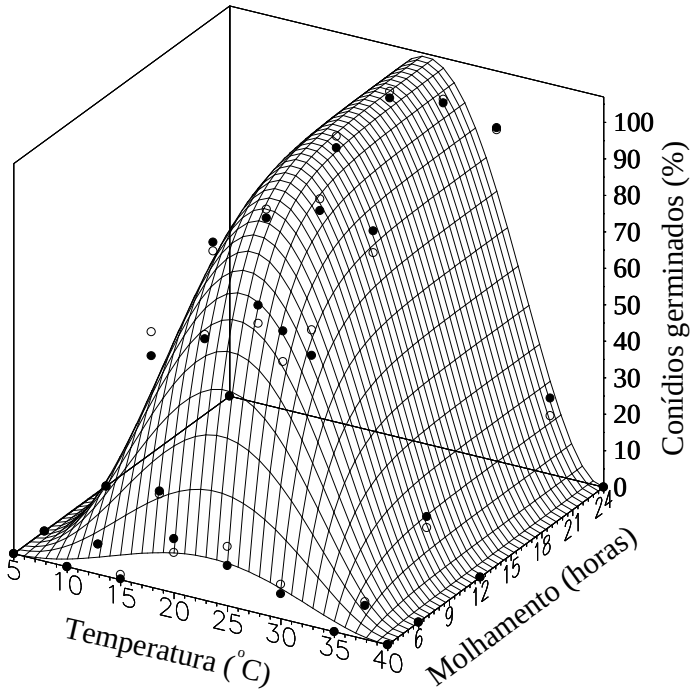

Figura 17 - Superfície de resposta da germinação (%) de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Fuerte', em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,001043)*((T-(4,11959)) ^ (2,54203)) * (((40,0006)-T) ^ (2,18824))) * ((0,117833) * (1-(2,90061) * EXP((0,39454)* M))), onde Z é percentagem de conídios germinados, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento (experimentos realizados simultaneamente)

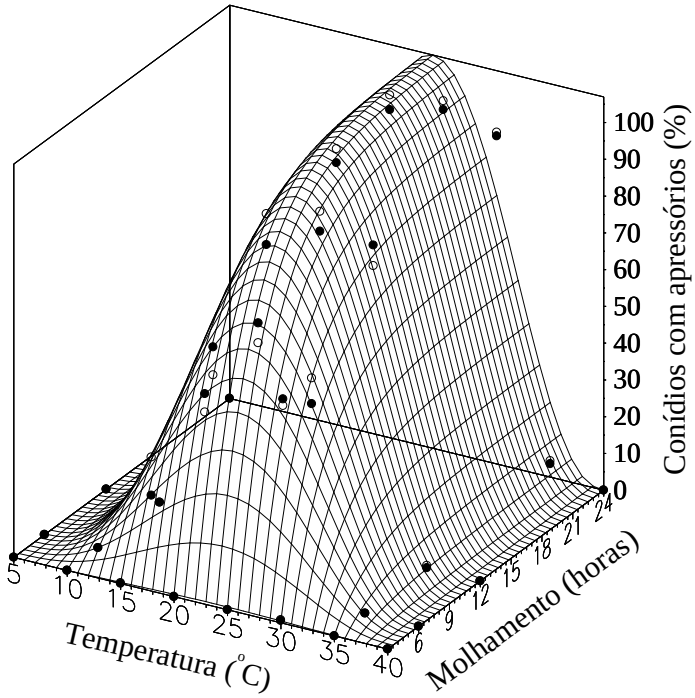

Figura 18 - Superfície de resposta de formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides* sobre abacate 'Fuerte' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação (ii) Z=((0,0000787)*((T-(4,16538))^(3,36691))*(((40,0)-T)^(2,70413)))*((0,032341)*(1-(2,38677) * EXP(-(0,292395)*M))) onde Z é a percentagem de conídios com apressórios, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento

2.3.3.3 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacates 'Hass' e 'Fuerte'

Neste experimento foi constatada a ocorrência de lesões típicas da antracnose nos frutos das duas variedades quando estes foram incubados entre 15ºC e 30ºC. Na temperatura de 10ºC não houve manifestação de sintomas durante o período de avaliação do experimento.

O aumento no período de molhamento de 6 para 24 horas não teve influência sobre a taxa de desenvolvimento da doença e sobre o diâmetro médio das lesões após 12 dias da inoculação, conforme demonstram as Figuras 20 a 23. Esse resultado indica que, na presença de ferimentos, *C. gloeosporioides* infecta o hospedeiro em curtos períodos de molhamento, inferiores a 6 horas, fato que deve ser considerado para o controle da doença.

Por sua vez, a temperatura teve grande influência no desenvolvimento da antracnose. Com base nos resultados obtidos observou-se que os períodos de incubação foram maiores a 15ºC e menores a 25 e 30ºC (Figura 19). Na temperatura de 15ºC observou-se que, em média, 42% dos abacates 'Hass' apresentaram sintomas da antracnose, números próximos aos observados para o abacate 'Fuerte' cuja incidência média foi de 39%. Nas temperaturas de 20, 25 e 30ºC, todos os frutos apresentaram sintomas de antracnose em até 9 dias para o abacate 'Fuerte' e em até 10 dias para o abacate 'Hass'.

O efeito da temperatura também foi observado sobre o período de latência. Para o abacate 'Fuerte' este período variou 11 e 12 dias a 15ºC, de 7 a 12 dias a 20ºC e de 6 a 9 dias a 25 e 30ºC. Para o abacate 'Hass', o período de latência ocorreu entre 10 e 12 dias a 15ºC, de 7 a 11 dias a 20ºC e de 5 a 10 dias a 25 e 30ºC.

O aumento na temperatura promoveu, ainda, o incremento nas taxas de desenvolvimento e nos diâmetros médios das lesões (Figuras 20 a 23).

Tanto para o abacate 'Hass' como para o 'Fuerte', os sintomas observados nos frutos incubados a 15ºC foram menos severos que àqueles ocorridos acima de 20ºC, ficando limitados a pequenas lesões necróticas superficiais. A 25 e 30ºC as lesões formadas apresentaram grandes proporções, tanto em área como em profundidade, atingindo a polpa e tornando os frutos imprestáveis para o consumo. As maiores taxas de desenvolvimento e diâmetros das lesões foram verificadas na temperatura de 30ºC.

A temperatura ótima obtida por meio do modelo beta-monomolecular, com base nos diâmetros das lesões, foi de 29,2ºC para o abacate 'Fuerte' e de 28,5ºC para o abacate 'Hass'. Para ambas as variedades a temperatura mínima calculada foi de 10,0 ºC enquanto a

temperatura máxima obtida pela equação ajustada pelo modelo beta-monomolecular foi de 35,5ºC para o abacate ‘Fuerte’ e 34,6ºC para o ‘Hass’.

Os resultados obtidos neste trabalho correspondem às observações de Fitzell e Muirhead (1983), os quais verificaram que o nível da antracnose em abacates ‘Fuerte’ aumentou com o acréscimo da temperatura, sendo baixo a 15ºC e muito alto entre 27ºC e 30ºC. Desta forma, os autores concluíram que os elevados danos ocasionados pela antracnose durante as épocas do ano em que a temperatura ambiente excede 24ºC podem ser reduzidos com o amadurecimento e comercialização dos frutos em temperaturas de até 17ºC.

Hopkirk et al. (1994) também observaram que abacates ‘Hass’ mantidos a 25 e 30 °C apresentaram níveis significativamente mais elevados de podridões e tornaram-se imprestáveis para a comercialização, enquanto os frutos amadurecidos a 15°C demonstraram vida de prateleira significativamente mais longa e tiveram baixas incidências de podridões. Os autores constataram, ainda, que os frutos mantidos a 25°C amoleceram na mesma taxa que os mantidos a 20°C durante o amadurecimento, mas que a 30 °C as frutas não amadureceram adequadamente.

Fato semelhante foi reportado por Erickson e Yamashita (1964), que demonstraram a alta sensibilidade de abacates ‘Hass’ a temperaturas superiores a 27ºC, nas quais o fruto tem sua maturação prejudicada, com conseqüente alteração na textura da polpa, fato que poderia estar associado a maior severidade da antracnose, verificada neste trabalho.

Também há indícios do processo de maturação estar relacionado com a suscetibilidade do fruto à antracnose, fato que foi sugerido por vários autores para esta e outras podridões pós-colheita do abacate (TRUTER; EKSTEEN, 1987; DARVAS; KOTZE; WEHNER, 1990; PRUSKY; PLUMBLEY; KOBILER, 1991). Desta forma, os frutos incubados a 10 e 15ºC podem ter apresentado baixos índices da antracnose por terem a maturação mais lenta que aqueles incubados a 25 e 30ºC.

Ainda, há que se considerar o efeito inibitório de baixas temperaturas sobre o metabolismo do fungo, como foi demonstrado no item 2.3.2.1, onde as colônias incubadas a 15ºC tiveram crescimento inferior as incubadas a 25 e 30ºC.

Essas informações devem ser consideradas durante os procedimentos de transporte e armazenamento de abacates ‘Hass’ e ‘Fuerte’ e demonstram que a manutenção dos frutos em ambiente refrigerado, considerado por Kohatsu e Moreira (2008) como sendo o principal método de conservação pós-colheita empregado para o abacate, deve ser adotado sempre que

possível durante o transporte e armazenamento dos frutos, visando minimizar os danos ocasionados pela antracnose.

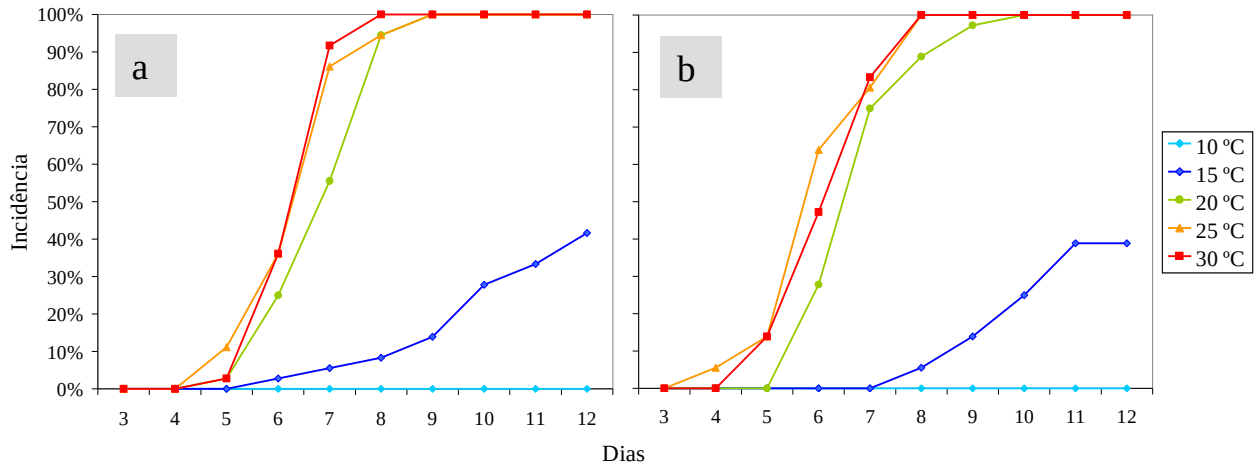

Figura 19 – Incidência de antracnose em abacates 'Fuerte' (a) e 'Hass' (b) inoculados com *Colletotrichum gloeosporioides* e incubados sob diferentes temperaturas

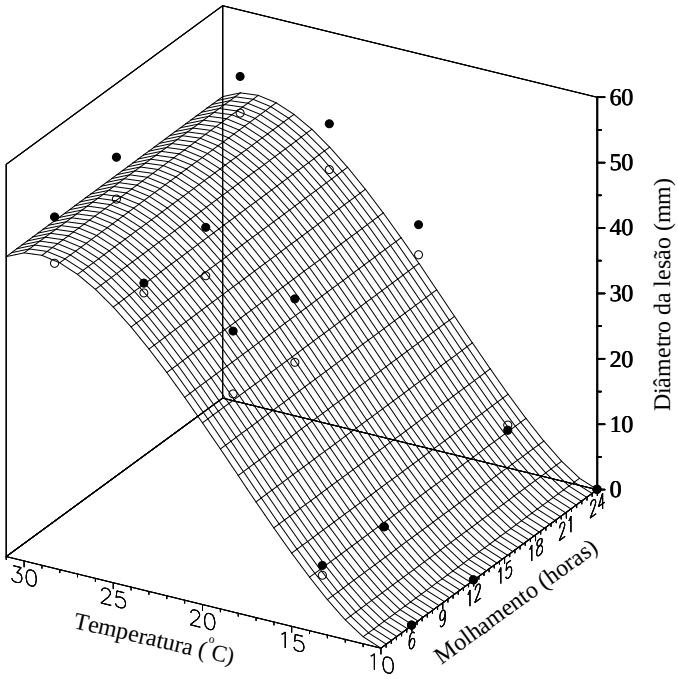

Figura 20 - Superfície de resposta do diâmetro das lesões de antracnose após 12 dias da inoculação de um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Fuerte' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((1,36398)*((T-(9,9994))^(1,514))*(((35,5719)-T)^(0,507149)))*((0,69494)*(1-(0,777153)*EXP(-(0,0000694)*M))) onde Z é o diâmetro da lesão, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento

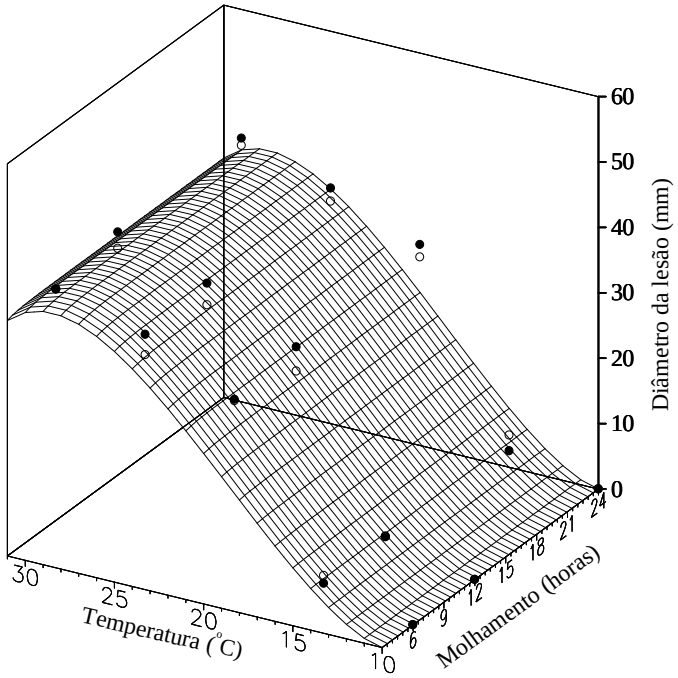

Figura 21 - Superfície de resposta do diâmetro das lesões de antracnose após 12 dias da inoculação de um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Hass' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,274028)*((T-(9,9999))^(1,60253))*(((34,6397)-T)^(0,532106)))*((0,511157)*(1-(0,262566)*EXP(-(0,924801)*M))) onde Z é o diâmetro da lesão, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h), Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento

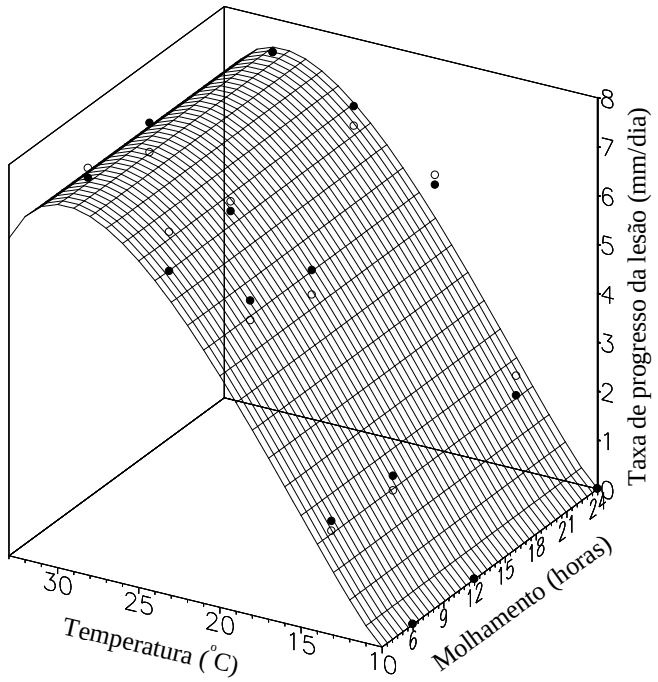

Figura 22 - Superfície de resposta da taxa de progresso das lesões promovidas por *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Fuerte' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,54293)*((T-(9,99943))^(1,19829))*(((35,262)-T)^(0,357384)))*((0,20823)*(1-(0,02623)*EXP(-(0,899807)*M))) onde Z é a taxa de progresso da lesão, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento

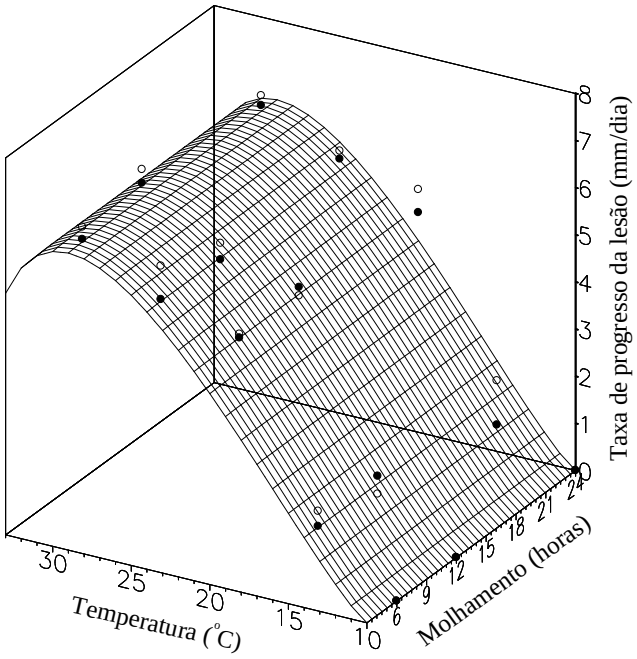

Figura 23 - Superfície de resposta da taxa de progresso das lesões promovidas por *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate 'Hass' em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação Z=((0,290072)*((T-(9,99926))^(1,23527))*(((34,7453)-T)^(0,371775)))*((0,29973) *(1-(0,38769)*EXP(-(1,59277)*M))) onde Z é a taxa de progresso da lesão, T é a temperatura (ºC) e M é o período de molhamento (h). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e brancos representam dados do segundo experimento

2.3.4 Controle da antracnose em abacates com fungicidas e sanitizantes

Dentre os produtos avaliados o procloraz foi o único que reduziu significativamente a antracnose em abacate 'Hass' até o 14° dia de armazenamento, com 10,8% de incidência, ante 65,0% apresentado pela testemunha (Tabela 12). Ausência de sintomas de antracnose foi observada até o oitavo dia de armazenamento com os fungicidas procloraz e imazalil, comparado a 13,3% de incidência na testemunha. Decorridos 14 dias do tratamento, o procloraz foi o único funcigida cuja incidência da antracnose foi significativamente menor do que a ocorrida no tratamento controle, porém, os resultados do tratamento com procloraz não diferiram estatisticamente dos obtidos com o imazalil.

Esses resultados corroboram as informações de outros trabalhos, que demonstram que o tratamento de abacates por imersão em calda contendo com procloraz é eficaz no controle pós-colheita da antracnose do abacateiro (MUIRHEAD et al., 1982; ROUX; WENTZEL; ROOSE, 1985; POWELL, 1988; MCMILLAN; NARAYANAN, 1990).

O tiabendazol, que atualmente é o único fungicida que pode ser utilizado no Brasil para o controle da antracnose em pós-colheita (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005),

também promoveu o controle significativo da antracnose doença, mas apenas aos dez dias do tratamento, após este período o produto foi ineficaz.

Na África do Sul, Dyk, Villiers e Korsten (1997), constataram que o tiabendazol teve eficácia bastante variável no controle da antracnose em função da origem dos frutos, fato que poderia estar associado com diferentes níveis de resistência do patógeno a esse fungicida. Entretanto, no Brasil a ocorrência de resistência em *C. gloeosporioides* do abacateiro não é relatada.

O controle da doença também foi verificado com cloreto de benzalcônio e dióxido de cloro, somente no décimo dia de armazenamento, não sendo eficientes em reduzir a incidência da antracnose, nas avaliações subsequentes. Por sua vez, não foi constatado controle significativo da antracnose em nenhuma das avaliações quando se empregou o hipoclorito de sódio no tratamento dos frutos.

Apesar desses resultados, Boshoff, Slabbert e Korsten (1995) obervaram que o tratamento dos frutos com produtos a base de amônia quaternária, como é o caso de cloreto de benzalcônio (amônio quaternário catiônico) e cloro a 900 ppm, reduziram significativamente a antracnose, de modo que a imersão dos frutos em solução com cloro nos *packinghouses* pode ser importante na redução das podridões.

O fato de produtos que não atuam sistemicamente no fruto promoverem redução na incidência da antracnose, mesmo quando os frutos são tratados após a colheita, pode estar relacionado à atuação desses produtos sobre os apressórios melanizados que permanecem quiescentes na epiderme do fruto verde e só completam o processo de infecção após o amadurecimento do fruto e decréscimo na concentração do composto antifúngico “dieno” (1-acetoxi-2-hidróxi-4-oxoheneicosa-12,15-dieno), presente no pericarpo dos frutos imaturos (BINYAMINI; SCHIFFMANN-NADEL, 1972; PEGG et al., 2002). Desta forma, o tratamento do fruto ainda verde, logo após a colheita, pode impedir o estabelecimento da infecção resultando no controle da doença.

O tratamento dos frutos com azoxistrobina e Ecolife® também se mostraram ineficazes para o controle da antracnose em todos os períodos de avaliação.

Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, Coates et al. (2001) demonstraram que o tratamento de abacates ‘Hass’ com azoxistrobina, associado a um agente molhante, foi eficaz no controle da antracnose, mas quando este fungicida foi aplicado sem o adjuvante, os níveis de controle desta doença foram menores.

Em relação ao Ecolife®, o mesmo se mostrou eficaz no controle da antracnose na pós-colheita de algumas variedades de banana (FURTADO et al., 2010), entretanto, não há relatos na literatura do uso deste produto para o manejo da antracnose do abacate.

Tabela 12 - Efeito de produtos na incidência (%) da antracnose em abacate 'Hass', após diferentes períodos do tratamento pós-colheita

Produtos	**Dias após o tratamento**				
	6	**8**	**10**	**12**	**14**
Testemunha	2,8 a[1]	13,3 a	30,0 a	49,2 a	65,0 a
Azoxistrobina	0,0 a	5,6 ab	24,7 ab	49,7 a	54,7 a
Dióxido de cloro	0,0 a	5,3 ab	13,6 bc	41,1 a	56,9 a
Ecolife®	0,0 a	5,3 ab	21,7 abc	49,2 a	64,7 a
Cloreto de benzalcônio	0,0 a	2,5 ab	8,1 cd	30,0 ab	46,4 a
Hipoclorito de sódio	0,0 a	5,3 ab	19,2 abc	41,4 a	49,4 a
Imazalil	0,0 a	0,0 b	8,1 cd	27,2 ab	38,1 ab
Procloraz	0,0 a	0,0 b	0,0 d	8,3 b	10,8 b
Tiabendazol	0,0 a	2,5 ab	13,6 bc	38,6 a	43,6 a

[1] Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste não paramétrico de comparação de múltiplas proporções.

3 CONCLUSÕES

- A principal doença pós-colheita identificada em abacates ‘Fuerte’ e ‘Hass’, durante o ano de 2008, em *packinghouse* de Bauru-SP, foi a antracnose;
- As injúrias mecânicas decorrentes das operações de colheita e pós-colheita não favorecem o desenvolvimento de podridões a partir de infecções quiescentes;
- No Estado de São Paulo, a antracnose do abacate e manga é causada por *C. gloeosporoides*, espécie que também está associada à antracnose do maracujá e do pêssego. Além de *C. gloeosporioides*, *C. boninense* causa antracnose em maracujá e *C. acutatum* promove antracnose em pêssego neste Estado;
- Isolados de *Colletotrichum* de abacate, manga, maracujá e pêssego são altamente variáveis do ponto de vista morfo-cultural, patogênico e fisiológico, tanto inter quanto intraespecificamente;
- *C. gloeosporoides*, *C. acutatum* e *C. boninense*, potencialmente, podem promover infecções cruzadas em abacate, manga, maracujá e pêssego;
- Há certo grau de especialização dos isolados de *C. gloeosporoides* de manga, ainda que, inoculações artificiais revelem que tais isolados podem causar infecções também em abacate, maracujá e pêssego;
- A temperatura e período de molhamento influenciam a pré-penetração de *C. gloeosporioides* e o seu desenvolvimento em abacate. Temperaturas entre 20 e 30 ºC com períodos de molhamento superior a 6 horas são mais favoráveis para o desenvolvimento da antracnose, enquanto temperaturas abaixo de 10ºC controlam eficientemente a doença;
- Controle eficaz da antracnose em abacate pode ser obtido com os fungicidas procloraz e imazalil.

REFERÊNCIAS

ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, Saint 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**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population-dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology,** Lancaster, v. 84, p. 420-425, 1994.

AHMED, K.M. Effect of temperature and light on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* penz. **Bangladesh Journal of Botany,** Dhaka, v. 14, n. 2, p.155-159, 1985.

ALAHAKOON, P.W.; BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloepsporioides* on tropical fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** London, v. 44, n. 2, p. 93-103, 1994.

ALLEN, R.N. **Avocado diseases.** NSW Agriculture. Disponível em: <http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/120012/avocado-diseases.pdf>. Acesso em: 10 set. 2011.

ALMEIDA, L.C.C.; COÊLHO, R.S.B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular**.** **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 318-328, 2007.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

ARX, J.A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. **Phytopathologische Zeitschrift,** Berlin, v. 29, p. 413-468. 1957.

ASSIS, T.C. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose da mangueira, quanto à utilização de carboidratos, patogenicidade, produção de enzimas e análise de RAPD**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2001.

ASSIS, T.C. MENEZES, M.; ANDRADE, D.E.G.T.; COÊLHO, R.S.B. Diferenciação de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoesterase, e produção de enzimas extracelulares. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 36, n. 2, p. 140-144, 2010.

AVILA-QUEZADA, G.; SILVA-ROJAS, H.V.; TELIZ-ORTIZ, D. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 91, p. 1200-1200, 2007.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum*:** biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.

BAILEY, J.A.; O`CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). ***Colletotrichum***: Biology, pathology and control. Wallingford: CAB Internacional, 1992. chap. 5, p. 1-26.

BAILEY, J.A.; NASH, C.; MORGAN, L.W.; CONNELL, R.J.O; TEBEEST, D.O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 10, p. 1076-1083, 1996.

BEDENDO, I.P. Ambiente e doença In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia.** 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 331-341.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais**: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289p.

BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 478-482, 1995.

BEZUIDENHOUT, J.J.; KUSCHKE, E. Voorkoms en tendense van naoessiektes by Suid-Africaanse avokado's in 1982 by Rungis. **South African Avocado Growers' Association Yearbooks,** Duivelskloof, v. 4, p. 20-23, 1983.

BINYAMINI, J.P.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 62, p. 592-594, 1972.

BLEINROTH, E. W.; CASTRO, J.V. de. Matéria-prima. In: ITAL. **Abacate:** cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2.ed. Campinas: ITAL, 1992. p. 58-148.

BONETT, L.P.; ALMEIDA, M.; GONÇÃLVES, R.G.A.; AQUINO, T.F.; BERNARDI-WENZEL, J. Caracterização morfocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência Guarapuava,** Guarapuava, v. 6, n. 3, p. 451-463, 2010

BORGES; M.H.C.; MELO, B. **Cultura do Abacateiro.** Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/>. Acesso em: 15 jan. 2011.

BOSHOFF, M.; SLABBERT, M.J.; KORSTEN, L. Effect of detergent sanitizers on post-harvest diseases of avocado. **South African Avocado Growers' Association Yearbook,** Duivelskloof, v. 18, p.96–98, 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **AGROFIT:** Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 abr. 2011.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.

BUENO, C.R.N.C. **Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas.** 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes temperaturas e espectros de radiação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Anais ...** São Paulo: SBM, 2005. p. 61.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JÚNIOR, H.J. ; RAGO, A.M.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes substratos, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. S134-S134, 2005. Resumo.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.; 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,** Chiang Mai, v. 39, p. 183-204, 2009.

CALADO, R.D.A. **Diversidade genética do vírus da Hepatite C circulante numa população de utilizadores de drogas injectáveis de Lisboa.** 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2009.

CAMPOS, J.S. **Abacaticultura paulista.** Campinas: CATI, 1984. 92p.

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.

CANNON, P.F.; BUDDIE, A.G.; BRIDGE, P.D. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 104, p.189-204, 2008.

CANTO, W.L.; SANTOS, L.C.; TRAVAGLINI, M.M.E. **Óleo de abacate:** extração, usos e seus mercados atuais no Brasil e na Europa. Estudos Econômicos. Campinas: ITAL, 1980. 144p.

CAVALCANTI, L.S. Toxinas e exoenzimas relacionadas à patogênese de *Colletotrichum* In: WORKSHOP REGIONAL SOBRE *Colletotrichum*, 1., 2007, Recife. **Proceedings...***Colletotrichum*' 2007 ... Recife: UFRPE, 2007. 1 CD-ROM.

CHOI, K.J.; KIM, W.G.; KIM, H.G.; CHOI, H.W.; LEE, Y.K.; LEE, B.D.; LEE, S.Y.; HONG, S.K. Morphology, molecular phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum panacicola* causing anthracnose of Korean ginseng. **Plant Pathology,** London, v. 27, n.1, p. 1-7, 2011.

COATES, L.M.; MUIRHEAD, I.F.; IRWIN, J.A.; GOWANLOCK, D.H. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 1363-1370, 1993.

COATES, L.M.; WILLINGHAM, S.L.; PEGG, K.G.; COOKE, A.; DEAN, J.; LANGDON, P. Field and postharvest management of avocado fruit diseases. In: AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND AVOCADO GROWERS' CONFERENCE: 'VISION 2020', 1., 2001, Brisbane. **Proceedings...** Brisbane:Australian Avocado Growers' Federation, 2001. 1 CD-ROM

COLHOUN, J. Effects of environment factors on plant disease. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 11, p. 343-364, 1973.

CORDA, A.C.I. **Icones fungorum Hucusque cognitorum.** Prague, 1837. 39 p.

CORRELL, J.C.; RHOADS, D.D.; GUERBER, J.C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment lenght polymorphisms, DNA fingerprints, and randomly amplified polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 83, n. 11, p. 1199-1204, 1993.

COUTO, E.F.; MENEZES, M.; COÊLHO, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 260-266, 2002.

CROUCH, J.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. Phylogenetic relationships and fungicide sensitivities of *Colletotrichum graminicola* isolates from turfgrass in North America**.** **International Turfgrass Society Research,** Washington, v. 10, p. 186-195, 2005.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B.; WHITE, J.F.; HILLMAN, B.I. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia,** New York, v. 101, p. 717-732, 2009.

CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 281-292, 2002.

DAIUTO, E.R.; VIEITES, R.L. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em abacate da variedade hass, submetidos ao tratamento térmico. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha,** Hermosillo, v. 9, n. 2, p. 106-112, 2008.

DAMM, U.; WOUDENBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity,** Chiang Mai, v. 39, p. 45-87, 2009.

DANIELI, F. **O óleo de abacate (*Persea americana* Mill) como matéria-prima para a indústria alimentícia.** 2006. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

DARVAS, J.M. Pre-harvest chemical control of post-harvest avocado diseases. **South African Avocado Growers' Association Yearbook,** Duivelskloof, n. 4, p. 71-73, 1981.

DARVAS, J.M.; KOTZE, J.M.; WEHNER, F.C. Effect of treatment after picking on the incidence of postharvest fruit disease of avocado. **Phytophylactica,** Pretoria, v. 22, n. 1, p. 93-96, 1990.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S. S.Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are non-pathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** London, v. 28, p. 235-242, 1986.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J., LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 32, p. 479-501, 1994.

DODD, J.C.; ESTRADA, A.; JEGER, M.J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics, In: BAILEY, A.J.; JEGER, J.M. ***Colletotrichum*:** biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. p. 308-325.

DODD, J.C.; ESTRADA, A.B.; MATCHAM, J.; JEFFRIES, P.; JEGER, M.J. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. **Plant Pathology,** London, v. 40, p. 568-575, 1991.

DONADIO, L.C. **Abacate para exportação:** aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1995. 53p.

DU, M.; SCHARDL, C.L.; NUCKLES, E.M.; VAILLANCOURT, L.J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia,** New York, v. 97, n. 3, p. 641-658, 2005.

DYK, K.; VILLIERS, E.E.; KORSTEN, L. Alternative Control of Avocado Post-Harvest Diseases. **South African Avocado Growers' Association Yearbook,** Duivelskloof, v. 20, p.109-112, 1997.

ERICKSON, L.C.; YAMASHITA, T. Effect of temperature on the ripening of Hass avocado. **California Avocado Society Yearbooks,** Los Angeles, v. 48, p. 92-94, 1964.

ESTRADA, A.B.; DODD, J.C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and apressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 608-618, 2000.

EVANS, E.; NALAMPANG, S. **World, U.S. and Florida Avocado Situation and Outlook.** Food and Resource Economics Department document FE639. 2006. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/fe639> Acesso em: 25 mar. 2009.

EVERETT, K.R. The effect of low temperatures on *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing body rots of avocados in New Zealand, **Australasian Plant Pathology**, Camberra, v. 32, n. 4, p. 441-448, 2003.

FAO. FAO statistics. **Production Indices**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> Acesso em: 25 set. 2011.

FITZELL, R.D. *Colletotrichum acutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. **Plant Disease Reporter,** Washington, v. 63, p. 1067-1070, 1979.

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

FITZELL, R.D.; MUIRHEAD, I.F. Reducing post-harvest disease in Fuerte avocados by temperature management. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry,** Melbourne, v. 23, p. 331-336, 1983.

FNP. AGRIANUAL 2008: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: IFNP, 2008. 502p.

FRANCISCO, V.L.F.S.; BAPTISTELLA.C.S.L. Cultura do abacate no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 27-41, 2005.

FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** London, v. 49, n. 6, p. 395-404, 1996.

FREEMAN, E.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity test. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 62, n. 3, p. 1014-1020, 1996.

_____. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

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

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 90, p. 608-614, 2000.

FURTADO, E.L.; BACH, E.E.; KIMATI, H.; MENTEN, J.O.M.; SILVEIRA, J.A. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 25, n. 3, p. 222-228, 1999.

FURTADO, L.M.; RODRIGUES, A.A.C.; ARAÚJO, V.S.; SILVA, L.L.S.; FURTADO, A.M.C. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, p. 237-239, 2010.

GIBLIN, F.R.; COATES, L.M.; IRWIN, J.A.G. Pathogenic diversity of avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose and pepper spot in Australia. **Australasian Plant Pathology,** Collingwood, v. 39, n. 1, p. 50-62, 2010.

GONZÁLEZ, A.F.R. **Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp, Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD.** 2007. 82 p. Monografía (Trabajo de grado em Microbiología Industrial) – Faculdade de Ciências, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007. Disponível em: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf.> Acesso em: 19 set. 2011.

GOODWIN, P.H.; LI, J.; JIN; S. A catalase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* is highly expressed during the necrotrophic phase of infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v. 202, p. 103-107, 2001.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2nd .ed. New York: John Wiley, 1994. 457 p.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J.C.; JOHNSTON, P.R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia,** Lancaster, v. 95, n. 5, p. 872-895, 2003.

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.

HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistic for analyses in epidemiology. In: KRANZ, J. (Ed.) **Epidemics of plant disease:** mathematics analyses and modeling. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 12-52.

HOPKIRK, G.; WHITE, A.; BEEVER, D.J.; FORBES, S.K. Influence of postharvest temperatures and the rate of fruit ripening on internal postharvest rots and disorders of New Zealand 'Hass' avocado fruit. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 22, p. 305-311, 1994.

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. **Lavoura permanente**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=sp&tema=lavourapermanente2009>. Acesso em: 15 out. 2011.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEEGER; M.J.; PUMBLEY, R.A. *Colletotrichum* species on tropical fruits. **Plant Pathology,** London, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

JOHNSTON, P.R.; JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycologia,** New York, v. 89, n. 3, p. 420–430, 1997.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.E.; DICKMAN, M.B. ***Colletotrichum*:** host specificity, pathology and host-pathogen Interaction. Saint Paul: APS Press, 2000. chap. 4, p. 45-56.

KIRK, P.M.; CANON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the fungi.** 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008. 784 p.

KLUGE, R.; SCARPARE FILHO, J.A.; JACOMINO, A.O.; PEIXOTO, C.P. **Distúrbios fisiológicos em frutos.** Piracicaba: FEALQ, 2001. 56 p.

KOHATSU, D.S.; MOREIRA, G.C. Pós-colheita do abacate. In: LEONEL,S.; SAMPAIO, A.C.(Org.). **Abacate:** Aspectos técnicos da produção. São Paulo: Cultura Acadêmica Editora, 2008. p. 199-214.

KOLATTUKUDY, P.E. Enzymatic penetration of the plant cuticule by fungal pathogens. **Annual Review of Physiophatology,** Palo Alto, v. 23, p. 223-250, 1985.
KOLLER, O. **Abacate:** produção de mudas, instalação, manejo de pomares, colheita e pós-colheita. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002. 154 p.

KOLLER, O.C. **Abaticultura**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992. 138 p.

KORSTEN, L. Biological control in Africa: can it provide a sustainable solution for control of fruit diseases? **South African Journal of Botany,** Pietermaritzburg, v. 70, n. 1, p. 128-139, 2004.

KOTZÉ, J.M. Anthracnose of avocados. **South African Avocado Growers' Association Yearbook,** Duivelskloof, v. 2, p. 45-47, 1978. Disponível em: <http://www.avocadosource.com/Journals/SAAGA/SAAGA_1978/SAAGA_1978_PG_45-47.pdf>. Acesso em: 11 out. 2011.

KRAMER-HAIMOVICH, H.; SERVI, E.; KATAN, T.; ROLLINS, J.; OKON, Y.; PRUSKY, D. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelb activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1034–1039, 2006.

LEDGER, S.; CAMPBELL, T.; BANKS, A.; ATKINSON, L.; KERNOT, I.; FULLELOVE, G. **Internal quality of avocados in retail shops.** Queensland: Departament of Primary Industries Report, 1993. 27 p.

LEITE, R.S.S.F.; GARCIA, A.E.B. Aspectos econômicos da produção e mercado In: ITAL. **Abacate -** cultura, matéria-prima, processamento e aspectos economicos. 2.ed. Campinas: ITAL, 1992. p.193-250.

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.

LIU, B.; WASILWA, L.A.; MORELOCK, T.E.; O'NEILL, N.R.; CORRELL, J.C. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility, and host specificity. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 97, n. 10, p. 1305-1314, 2007.

LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 291-337, 2001.

MACEDO, G.A.; PIO, T.F. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 388-394, 2005.

MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; JACOMINO, A.P.; AMORIM, L. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 31, n. 1, p. 5-10, 2006.

McMILLAN JUNIOR, R.T. NARAYANAN, K.R. Effectiveness of chemical postharvast treatments for avocado anthracnose control. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society,** Deland, v.103, p. 232-233, 1990.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*, **Fitopatologia Brasileira,** Fortaleza, v. 27, Supl., p. 523-524, 2002.

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

MICHEREFF, S.J. Aspectos relevantes da epidemiologia de *Colletotrichum* em fruteiras tropicais: a antracnose da mangueira como exemplo In: WORKSHOP REGIONAL SOBRE *Colletotrichum*, 1., 2007, Recife. ***Colletotrichum'* 2007 ...** Recife: UFRPE, 2007. 1 CD-ROM.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v. 98, n. 1/3, p. 137-144, 1992.

MIRANDA, M.J.; PINTO, H.S.; ZULLO JÚNIOR, J.; FAGUNDES, R.M.; FONSECHI, D.B.; CALVE, L.; PELLEGRINO, G.Q. **Clima dos Municípios Paulistas:** A classificação climática de Koeppen para o Estado de São Paulo. Disponível em: < http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dPS-municipiPS-paulistas.html >. Acesso em: 15 set. 2011.

MONTEIRO, J.E.B.A. **Microclima e ocorrência de ramulose no algodoeiro em diferentes densidades populacionais.** 2002. 99 p. Dissertação (Mestrado em Física do Ambiente Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

MORAES, S.R. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros.** 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

MORIN, L.; DERBY, J.L.; KOKKO, E.G. Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* on Malvaceae weeds. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 165-172, 1996.

MUIRHEAD, I.F., FITZELL, R.D., DAVIS, R.D.; PETERSON, R.A. Post-harvest control of anthracnose and stem-end rots of Fuerte avocado with prochloraz and other fungicides. **Australian Journal of Experimental and Animal Husbandry**, Collingwood, v. 22, p. 41-446, 1982.

MURRAY, M.G.; THOMPSON,W.F. Rapid isolation of highmolecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v.8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NAVEH E.; WERMAN M.J.; SABO E.; NEEMAN I. Defatted avocado pulp reduces body weight and total hepatic fat but increases plasma cholesterol in male rats fed diets with cholesterol. **Journal of Nutrition,** Haifa, v. 132, p. 2015-2018, 2002.

NEI; M., KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** New York: Oxford University Press, 2000. 333p.

OBARA, F.W.H.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T. Purificação de lacases PPO-I de *Botryosphaeria rhodina*. **Acta Scientiarum Biological Sciences,** Maringá, v. 27, n. 3, p.303-310, 2005.

PALMATEER, A.J.; PLOETZ, R.C.; HARMON, P.F. **Florida plant disease management guide:** avocado (*Persea americana*). Florida: University of Florida, 2006. 10p.

PARBERY, D.G. Biology of anthracnose on leaf surfaces. In: BLAKEMAN, J.P. (Ed.) **Microbial Ecology of the Phylloplane,** New York: Academic Press, 1981. p. 135-154.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D. **Biochemical Techniques for Filamentous Fungi.** Wallingford: C.A.C. International, 1994. 125 p.

PEGG, K.G.; COATES, L.M.; KORSTEN, L.; HARDING, R.M. Foliar, fruit and soil diseases. In: WHILEY, A.W.; SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B.N. (Ed.). **The avocado:** botany, production and uses. Wallingford: CAB International Press, 2002. p. 299-338.

PEREIRA, W.V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo.** 2009. 79 p. 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. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

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

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças do abacateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia.** 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 1-7.

PIMENTA, A.A. **Caracterização morfométrica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.).** 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

PLOETZ, R.C. Mango diseases caused by fungi: antracnose. IN: PLOETZ, R.C.; ZENTMEYER, G.A.; NISHIJIMA, N.T.; ROHRBASCH, K.G.; OHR, H.D. (Ed.). **Compendium of Tropical Fruit Diseases.** Saint Paul: APS Press, 1994. p.35-36.

POWELL, A.W.G. Shrink-wrap of avocados in combination with waxing and fungicide. **South Africa Avocado Grower's Association Yearbook,** Duivelskloof, v. 11, p. 39-40, 1988.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity,** Chiang Mai, v. 39, p. 89-109, 2009.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. ***Colletotrichum*:** host specificity, pathology and host-pathogen interaction. Minnessota: APS Press, 2000. 393p.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T.; EAKS, I. Further evidence for the involvement of a preformed antifungal compound in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. **Physiological Plant Pathology,** London, v. 22, n. 2, p.189-198, 1983.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.A.; KOBILER, I. Modulation of natural resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides* by CO_2 treatment. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** London, v. 39, p. 325-334, 1991.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.A.; KOBILER, I.; ZAUBERMAN, G.; FUCHS, Y. The effect of elevated CO_2 levels on the symptom expression of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. **Plant Pathology,** Saint Paul, v.42, p.900–904, 1993.

PRUSKY, D.; OHR, H.D.; GRECH, N.; CAMPBELL, S.; KOBILER, I.; ZAUBERMAN, G.; FUCHS, Y. Evaluation of antioxidants butylated hydroxyanisole and fungicide prochloraz for control of post-harvest anthracnose of avocado fruit during storage**. Plant Disease,** Saint Paul, v. 79, n. 8, p. 797-800, 1995.

QUIMIO, T.H; QUIMIO, A.J. Notes on Philippine grape and guava anthracnose. **Plant Disease Reporter,** Washington, v. 59, p. 221-224, 1975.

RAJAK, R.C. Nutritional requirement of two species of *Colletotrichum.* **Acta Botanica Indica,** Meerut, v. 11, p. 155-160, 1983

RAMPERSAD, S.N. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 95, n. 10, p. 1244-1254, 2011.

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.

RIBEIRO, D.C.; BOGO, A.; DANTAS, A.C.M.; GOMES, E.A.; COÊLHO, C.M.M.; GUIDOLIN, A.F. Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp. **Revista de Ciências Agroveterinárias,** Lages, v. 8, n. 1, p. 43-52, 2009.

ROTEM, J.; COHEN, Y.; BASHI, E. Host and environmental influences on sporulation in vivo. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 16, p. 83-101, 1978.

ROUX, A.W.G.; WENTZEL, R.C.S; ROOSE, C. Efficiency of Prochloraz treatments for postharvest disease control in avocados. **South African Avocado Growers' Association Yearbook,** Duivelskloof, v. 8, p. 44-45, 1985.

SALGADO, J.M. **Alimentos inteligentes.** São Paulo: Editora Prestígio, 2005. p. 32-38.

SALGADO, J.M.; BIN, C.; CORNÉLIO, A.R. Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade Hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos: versão preliminar. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 6., 2005. Campinas, **Anais...** Campinas, UNICAMP. 2005. 1 CD ROM.

SANDERS, G.M.; KORSTEN, L. A comparative morphological study of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Canadian Journal of Botany,** Ottawa, v. 81, p. 877-885, 2003a.

_____. Comparison of cross inoculation potential of south african avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research,** Jena, v. 128, p. 143-150, 2003b.

SANGEETHA, C.G.; RAWAL, R.D. Temperature requirement of different isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango. **American-eurasian Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 1, p. 20-25, 2009. Disponível em: < http://www.idosi.org/aejsr/4(1)09/5.pdf>. Acesso em: 18 maio 2011.

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

SERRA, I.M.R.S.; COÊLHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.;MONTARROYOS, A.V.V.; SILVA, D.S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 37, n. 1, 2011.

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. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925314>. Acesso em: 25 mai. 2011.

SILVA, K.; REBOUÇAS, T.N.H.; LEMOS, O.L.; BOMFIM, M.P.; BOMFIM, A.A.; ESQUIVEL, G.L.; BARRETO, A.P.P; JOSÉ, A.R.S.; DIAS, N.O.; TAVARES, G.M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 131-133, 2006.

SILVA-ROJAS, H.V.; AVILA-QUEZADA, G. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. **Plant Pathology,** Saint Paul, v. 60, n. 5, p. 899–908, 2011.

SILVEIRA, N.S.S.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; MAIA, L.C.; OLIVEIRA, S.M.A. Hongos fitopatogenos asociados a frutos comercializados en Recife, Pernambuco (Brasil). **Boletín Micológico**, Valparaiso, v. 16, p. 41-47, 2001.

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.

SNOWDON A.L. A **Colour atlas of postharvest diseases and disorders of fruit and vegetables.** General introduction and fruits. London: Wolfe Scientific, 1990. 302p.

SOARES, A.R. **Infecção e colonização de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento.** 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

SOARES, A.R.; LOURENCO, S.A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Patholology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 265-272, 2008.

SPALDING, D.H.; REEDER, W.F. Low oxygen high-carbon dioxide controlled atmosphere storage for control of anthracnose and chilling injury of avocados. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 65, n. 4, p. 458-560, 1975.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** London, v. 41, n. 4, p. 265-281, 1992.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 650-655, 1996.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 1980. 696p.

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

SWART, G.M. **Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango.** 1999. 156 p. Thesis (Doctor of Plant Pathology) - Faculty of Biological and Agriculture Sciences, University Pretoria, Pretoria. 1999.

TAKAHASHI, F.; ORTEGA, E. **Emergy evaluation of avocado crop as raw material for biodiesel production.** Disponível em:< http://www.societalmetabolism.org/aes2010/Proceeds/DIGITAL%20PROCEEDINGS_files/POSTERS/P_150_Fabio_Takahashi_revisado-1.pdf>. Acesso em: 20 set. 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.;PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI,M.;KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution,** Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TANGO, J.S.; TURATTI, J.M. Óleo de abacate. In: **ABACATE:** cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL, 1992. p. 156-192.

TEIXEIRA, C.G. **ABACATE:** cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. 2.ed., Campinas: ITAL, 1991. 250p.(Série Frutas Tropicais, 8)

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

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.; FISCHER, I.H.; CÂMARA, M.P.S.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes,** Orange, v. 5, p. 70-72, 2010.

TRUTER, A.B.; EKSTEEN, G.J. Controlled and modified atmospheres to extend storage life of avocados. **South African Avocado Growers' Association Yearbook,** Duivelskloof, v. 10, p.151-153, 1987.

VERAS, S.M.; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisiomorfológica de *Colletotrichum graminicola* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 297-305, 1997.

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi:** a study on two extreme cases. 2004. 72 p. Thesis (Doctor of Phisiology) - Faculty of Science ad Technology, Uppsala Universitet, Upssala, 2004. Disponível em: < www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902-1__fulltext.pdf >. Acesso em: 22 mar. 2009.

WALKER, J.; NIKANDROW, A.; MILLAR, G.D. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. **Mycological Research,** Cambridge, v. 95, n. 10, p. 1175-1193, 1991.

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.

WILLIAMS, L.O. The botany of the avocado and its relatives. In: INTERNATIONAL TROPICAL FRUIT SHORT COURSE: THE AVOCADO, 1., 1976, Miami Beach, **Proceedings...**. Gainesville: University of Florida. 1976. p. 9-15. Disponível em: < http://www.avocadosource.com/Journals/ITFSC/PROC_1976_PG_9-15.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2011.

WILLINGHAM, S.L.; PEGG, K.G.; ANDERSON, J.M.; COOKE, A.W.; DENA, F.R.; GIBLIN, F.R.; COATES, L.M. Effects of rootstock and nitrogen fertilizer on postharvest anthracnose development in Hass avocado. **Australasian Plant Pathology,** Collingwood, v. 35, n. 6, p. 619-629, 2006.

YAKOBY, N.; BENO-MOUALEM, D.; KEEN, N.T.; DINOOR, A.; PINES,O.; PRUSKY, D. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB Is an important virulence factor in avocado fruit–fungus interaction. **Molecular Plant-microbe Interactions,** Saint Paul, v. 14, n. 8, p. 988–995, 2001.

ZAR, J.H. **Biostatistical analyis.** New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663p.