

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. EM  
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*)**

**JUAN FERNAN SIERRA HAYER**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP  
Fevereiro – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. EM  
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*)**

**JUAN FERNAN SIERRA HAYER**

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP  
Fevereiro – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Sierra Hayer, Juan Fernan, 1980-  
S572c      Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*) / Juan Fernan Sierra Hayer. - Botucatu, [s.n.], 2010.  
            xiii, 68 f.: il., color., grafs., tabs.

            Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010  
            Orientador: Edson Luiz Furtado  
            Inclui bibliografia

            1. *Colletotrichum gloeosporioides*. 2. *Colletotrichum acutatum*. 3. Seringueira. 4. Clones. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. EM SERINGUEIRA  
(*Hevea brasiliensis*)”

ALUNO: JUAN FERNAN SIERRA HAYER

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora



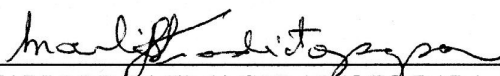
---

PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



---

PROF. DR. CESAR JÚNIOR BUENO



---

PROFª DRª MARLI DE FATIMA STRADIOTO PAPA

Data da Realização: 05 de fevereiro de 2010.

Senhor Deus do céu, muito obrigado por ser a pessoa que sempre esta comigo nas horas boas e ruins; obrigado senhor porque juntos e em equipe conseguimos terminar a pesquisa. Obrigado senhor porque dia e noite, junto com minha família e minha namorada, motivaram minha vida para nunca ficar no chão, sempre você e sua fé me motivaram para continuar com minhas metas, e com as oportunidades presentes em minha vida. Obrigado por esta experiência tão bacana que junto vivemos. Obrigado senhor por não mostrar para mim a fraqueza e sim a dureza para enfrentar as coisas. Muito obrigado, mas muito obrigado por tudo Deus, Te amo.

*Aos meus pais Tomas Sierra e Fidelina Hayer, por estar comigo sempre e pelo apoio incondicional, compreensão e por sua credibilidade para comigo.*

*Aos meus irmãos Maybelline Sierra Hayer, Sandra Sierra Hayer, Frank Sierra Hayer, Alex Sierra, Yobany Sierra e Patricia Sierra por seus apoios, e meu sobrinho Miguelucho por ser tão bonitinho.*

*Aos meus tios, sobrinhos, primos por seu apoio e orgulho.*

*A minha namorada Fabiola Ocampo, amiga, colega, e tudo o que seja bom, por ser tão linda, tão bela e tão maravilhosa comigo, e porque sempre e em todo momento e lugar ficou aqui comigo, muito obrigado.*

*A minha segunda mãe Consuelo, que em paz descanse, por sua compreensão, conselhos, e apoio para minha vida.*

*A minha amiga Angela Aristizabal por ser minha amiga incondicional e pelos momentos vividos.*

*A Paola Gonzalez, por ser minha orientadora no curso de faculdade, e por me apresentar ao professor Furtado.*

*Professor Furtado por me aceitar como orientado, por sua confiança e por ensinar para mim os caminhos do mundo da seringueira.*

*Ao programa de Proteção de Plantas pela oportunidade.*

*Dedico.*

*As pessoas que dão minha energia, alento, e motivação,  
Sempre os levo em minha mente e em meu coração,  
A meu Deus por ser o ser que dá nossa energia para continuar cada  
dia,  
Aos meus pais Tomas Sierra e Fidelina Hayer,  
Aos meus irmãos Frank Sierra, Maybelline Sierra e Sandra Sierra,  
A minha namorada Fabiola Ocampo,  
A senhora Consuelo  
A Angela Aristizabal  
A meu amigo, professor e orientador Edson Luiz Furtado.*

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso Deus por me acompanhar em todo este processo da minha vida e pela oportunidade de estar aqui no Brasil.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

A liga de Chopp, Bar Valentino, Café iguana, UP clube, escola ILC, por me dar trabalho quando precisei.

A empresa Cauchopar e FEPAF por me conceder a bolsa de estudo.

Aos meus pais, irmãos, e minha namorada, pelo apoio incondicional, dedicação, força e amor.

Ao meu amigo, pai, professor e orientador Furtado por seu apoio, confiança e atenção.

À Sakata Seed Sudamerica por ceder os isolados padrões de *Colletotrichum gloeosporioides* (1) e *Colletotrichum acutatum* (2).

Ao Instituto Biológico de São Paulo por ceder os isolados 19 e 27.

À empresa Hevea – Tec e a todos seus empregados, por me permitir a oportunidade de estar por duas semanas aprendendo e coletando a coleção de isolados presentes neste trabalho, e pelo apoio em todas as viagens na região de São José do Rio Preto, SP.

Aos professores Antonio Carlos Maringoni, Carlos F. Wilcken, Silvia Renata, Gilberto Raetano, Renate Krause, Edson Baldin, Marli Teixeira, pelos conhecimentos oferecidos.

Á pós-graduação: Marilena do Carmo Santos, Jaqueline de Moura, Marlene Rezende, Taynan Ribeiro por sua compreensão e paciência.

Aos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal (Defesa Fitossanitária), Rita Matheus Vieira, Maria do Carmem, Fátima, Paulinho, Dinha, Domingos e Norberto.

Aos meus amigos de faculdade da Colômbia: Angela Aristizabal, Silvia Buitrago, Bakary Buitrago, Reiner, Juan David Gomez, Diego, Tatiana e Maria Elisa.

Professores de faculdade por confiar e acreditar, Paola Gonzalez, Carlos Reyes, Fernando Estrada e Jorge Villa.

Aos pesquisadores da empresa Corpoica Colômbia por me apoiar: Juan Jaramillo, Javier Orozco, Lorenzo Peláez Suárez, Diego Aristizabal, Margarita Vélez, Anibal Tapiero,



Jaime Triana, a meu amigo e professor Alvaro Caicedo (esposa e filhos), Elizabeth Narvaez e Anderson Narvaez.

A minha tia Velarmina Guerrero, Saida Hayer, Leonor Sierra, Ruth Sierra, Esteban Sierra por me apoiar.

Ao professor Cesar Martins por me apresentar a meus amigos de república e por ser tão boa pessoa.

Aos amigos de laboratório: Martha Passador e Cris de Pieri por ser tão gente fina comigo, e pela grande amizade.

À Fabiano Betelloni (Deixa falar) e Karolina Dória, por ser tão legais comigo, por estar nas horas ruins e boas, por sempre se preocupar, e por sempre me socorrer quando precisei.

Aos amigos do departamento e colegas que tive o privilégio de conhecer: Júlio Marubayashi, Tatiana Mituti, Mônica Fekury, Kelly Rocha, Denise Nozaki, Daniel Dias Rosa, Karina Tumura, Haroldo Antunes, Adriana Itako, Tadeu Júnior, Sandra Cristina Vigo-Schultz, Lucas Rodrigues, Ana Carolina, Facão, João, Marília (Jequitibá), Cesar Bueno, Jaqueline Magalhães, Efrain Santana e Edvar de Sousa.

Aos amigos de república que abriram as portas da sua casa para mim: Renato (Keku), Danillo (Jacu), Sérgio (Parrudo), Guilherme (Kabelo), Eder (Caipira), Adriano Xurupito, muito obrigado pela paciência.

E a todos meus amigos que conheci aqui no Brasil, muito obrigado.

Que Deus os abençoe

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XII
1 RESUMO .....	1
2 SUMMARY .....	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO DE LITERATURA .....	7
4.1 Ocorrência e importância da doença .....	7
4.2 Técnicas moleculares.....	9
4.3 Suscetibilidade ao fungicida benomyl.....	10
4.4 Controle com fungicidas.....	10
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5.1 Obtenção e preservação dos isolados .....	15
5.2 Caracterização cultural .....	18
5.3 Caracterização morfológica.....	19
5.4 Culturas monospóricas .....	20
5.5 Caracterização patogênica .....	21
5.6 Sensibilidade ao fungicida benomyl.....	23
5.7 Identificação molecular .....	23
5.7.1 Isolamento do DNA genômico.....	23
5.7.2 Análise por PCR.....	25
5.8 Testes com extratos aquosos.....	26
5.9 Teste com fungicidas.....	27
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
6.1 Caracterização cultural dos isolados de <i>Colletotrichum</i> .....	29
6.1.2 Velocidade de crescimento de isolados de <i>Colletotrichum</i> em seis temperaturas ...	33
6.2 Caracterização morfológica.....	37
6.3 Caracterização monospórica.....	39
6.4 Caracterização patogênica .....	40

6.4.1	Caracterização patogênica de folíolos destacados.....	40
6.4.2	Patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. pelo método de discos de folíolos de seringueira .....	43
6.5	Suscetibilidade ao fungicida benomyl de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	46
6.6	Identificação Molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	48
6.7	Testes com extratos aquosos.....	53
6.8	Testes com fungicidas .....	55
7	CONCLUSÕES .....	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Identificação dos isolados, procedência de diferentes clones de seringueira, citros e manga, local, tecido e data de coleta. ....	16
Tabela 2. Escala de nota em porcentagem.....	22
Tabela 3. Denominação dos extratos aquosos utilizados no teste. ....	26
Tabela 4. Marca comercial, ingrediente ativo, grupo químico, modo de ação, e concentração do produto comercial dos fungicidas utilizados neste experimento.....	28
Tabela 5. Classificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> , em função da coloração da colônia no verso e reverso de placas de Petri. Colônias desenvolvidas em BDA, sob 25±1°C, fotoperíodo de 24 horas aos seis dias após a repicagem. ....	29
Tabela 6. Diâmetro (cm) da colônia de <i>Colletotrichum</i> spp. desenvolvidos em BDA Difco®, fotoperíodo de 12 horas, aos sete dias após a repicagem, em seis temperaturas.....	34
Tabela 7. Concentração (número de esporos x 10 <sup>5</sup> ) de esporos de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. desenvolvidos em meio BDA, fotoperíodo de 24 horas, após seis dias da repicagem nas seis temperaturas. ....	36
Tabela 8. Comprimento (µm), largura (µm), Amplitude (µm), e formato dos conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	38
Tabela 9. Patogenicidade em folíolos destacados, na superfície abaxial e adaxial, tendo como inóculo seis isolados e uma testemunha. ....	42
Tabela 10. Incidência e ausência de seis isolados, mas uma testemunha na fase abaxial e adaxial de folíolos destacados. ....	43
Tabela 11. Patogenicidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folíolos de seringueira, na superfície abaxial e adaxial. Tendo como inóculo seis isolados e uma testemunha.....	44
Tabela 12. Incidência e ausência de lesões de <i>Colletotrichum</i> spp. em discos de folíolos de seringueira, inoculados com seis isolados, mas uma testemunha nas superfícies abaxial e adaxial.....	45
Tabela 13. Crescimento micelial de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em cinco doses de benomyl.....	47

Tabela 14. Concentração de esporos de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em cinco doses de benomyl. ....	48
Tabela 15. Crescimento micelial (cm) do isolado 15S de <i>Colletotrichum</i> spp., submetido a oito extratos aquosos, em seis concentrações. ....	54
Tabela 16. Crescimento micelial do isolado 9S de <i>C. gloeosporioides</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	55
Tabela 17. Crescimento micelial do isolado 77S de <i>C. acutatum</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	56
Tabela 18. Crescimento micelial do isolado 78S de <i>C. acutatum</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	57
Tabela 19. Crescimento micelial do isolado 31S de <i>C. gloeosporioides</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	58

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Sintomas de <i>Colletotrichum</i> spp. A: Folha; B: Haste; C: Fruto e D: Pannel de sangria. .....	15
Figura 2. Representação para dominação da coloração da colônia. ....	19
Figura 3. Formato dos conídios de <i>Colletotrichum</i> observados no microscópio ótico. I pontigudo, pontigudo; II pontigudo, arredondado; III arredondado, arredondado. ....	20
Figura 4. A. Tratamentos de discos com a face abaxial e adaxial; B. Tratamento de folíolos destacados na face abaxial e adaxial. ....	22
Figura 5. Escala de severidade em relação a necroses ( %). ....	22
Figura 6. Aspecto das colônias de <i>Colletotrichum</i> em meio BDA Difco®. 1P e 2P isolados padrões fornecidos pela Empresa Sakata e correspondem a <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> e <i>C. acutatum</i> respectivamente. 9* e 29* são isolados idênticos às números correspondentes. ....	31
Figura 7. Diâmetro médio (cm) do crescimento micelial de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. submetidos a seis temperaturas. ....	35
Figura 8. Concentração de esporos (x 10 <sup>5</sup> ) de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em seis temperaturas. ....	36
Figura 9. Germinação de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. após o período de incubação, e observados por meio de um estereoscópio. O círculo representa um único conídio presente na placa de Petri. ....	39
Figura 10. Aspecto das colônias de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidas a partir de um conídio germinado. A = verso; B = reverso. ....	40
Figura 11. Tratamentos em folíolos destacados. Testemunha e isolados (78S, 77S, 9S, 3C, 4C, e 31S). A = Adaxial e B = Abaxial. ....	42
Figura 12. Aspecto de discos de folíolos de seringueira inoculados com esporos de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. Testemunha e isolados (78S, 77S, 9S, 3C, 4C, e 31S). ....	43
Figura 13. Crescimento micelial de seis isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em cinco doses de Benomyl. ....	47

Figura 14. Amplificação por PCR dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com primer específicos de <i>C. acutatum</i> . M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder. ....	49
Figura 15. Amplificação por PCR dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com primer específicos de <i>C. gloeosporioides</i> . M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder. ....	50
Figura 16. Amplificação por PCR de isolados monospóricos de <i>Colletotrichum</i> spp., com primers específicos de <i>C. gloeosporioides</i> (9S, 31S, 1P) e <i>C. acutatum</i> (77S, 78S, 2P). M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder. ....	51
Figura 17. Amplificação por PCR dos isolados monospóricos de <i>Colletotrichum</i> spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com primers ITS. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder. ....	51
Figura 18. Amplificação por PCR dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com primers ITS. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder. ....	52
Figura 19. Diferenciações de bandas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (A) e <i>C. acutatum</i> (B) a partir de PCR. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder. ....	53
Figura 20. Crescimento micelial do isolado 15S, em seis concentrações e oito extratos aquosos. ....	54
Figura 21. Inibição do crescimento micelial do isolado 9S de <i>C. gloeosporioides</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	56
Figura 22. Crescimento micelial do isolado 77S de <i>C. acutatum</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	57
Figura 23. Crescimento micelial do isolado 78S de <i>C. acutatum</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	58
Figura 24. Crescimento micelial do isolado 31S de <i>C. gloeosporioides</i> , pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações. ....	59

## 1 RESUMO

A cultura da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Jussieu) Muell. Arg.] vem sendo atacada por várias doenças de importância econômica, dentre as quais está a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* sp. (teleomorfo: *Glomerella* sp.). Este fungo causa vários danos na planta como lesões nos folíolos, nos ponteiros, nos ramos, nos frutos e cancos no painel de sangria. Somente *Colletotrichum gloeosporioides* foi relatado como agente causal desta doença no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo identificar isolados de *Colletotrichum* spp. de seringueira de diversas regiões de plantio do Estado de São Paulo. O trabalho foi conduzido em cinco fases: a) caracterização cultural, na qual foram observadas a coloração e o aspecto das culturas *in vitro*. Produção de conídios e taxa de crescimento em seis temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C); b) caracterização morfológica, na qual foi medido comprimento, largura e observado o formato dos conídios; c) teste de patogenicidade em folíolos destacados e em discos de folíolos, com quatro isolados de seringueira e dois de citros; d) crescimento em benomyl em quatro concentrações de princípio ativo; e) Identificação molecular para culturas monospóricas e multispóricas com *primers* específicos para as espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* e os *primers* ITS1 e ITS4 os quais amplificaram uma pequena região (18S) e uma grande região (28S), e estes também permitiram a amplificação da região 5.8S do rDNA e os espaçadores



internos transcritos (ITS1 e ITS2), e f) testes de crescimento em meio de cultivo acrescido com fungicidas: flutriafol, tebuconazol, epoxiconazol + piradostrobina, clorotalonil + tiofonato-metílico, captana, mancozebe, carbendazim, azoxistrobina + ciproconazol e propiconazol. Neste teste foram utilizados quatro isolados de diferentes órgãos da planta. Também foram testados diferentes extratos aquosos: *Melia azedarach* L, *Corymbia citriodora*, *Trichilia clausenii*, *Trichilia elegans*, *Azadirachta indica* A. Juss, *Chenopodium ambrosioides*, *Coriandrum sativum* e *Piper nigrum* L. Foram obtidos os seguintes resultados: a) os isolados foram divididos em dois grupos, um primeiro grupo apresentando coloração laranja+cinza e laranja, e um segundo grupo cinza clara. O aspecto coloração não foi um fator determinante para diferenciar as espécies. A produção de conídios mostrou ser bastante variável de um isolado para outro. A temperatura ótima de crescimento para os isolados foi a de 25 °C; b) os isolados apresentaram grande variação quanto ao tamanho e formato entre duas espécies predominantes *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, havendo uma faixa de sobreposição de dimensões entre as duas espécies; c) todos os isolados de seringueira junto com os de citros foram patogênicos, permitindo assim a confirmação de duas espécies causadoras de antracnose, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, e a infecção de isolados de citros para plantas de seringueira; d) o crescimento em benomyl, para isolados de seringueira, não foi representativo, já que todos cresceram nas determinadas doses; e) o par de *primer* específico de *Colletotrichum gloeosporioides* permitiu identificar oito isolados de culturas multispóricas e três monospóricas. O par de *primer* específico de *Colletotrichum acutatum* permitiu identificar quarenta e seis isolados de seringueira provenientes de culturas multispóricas e três de monospóricas. Os *primers* ITS1 e ITS4, permitiram amplificar isolados multiesporicos correspondentes à setenta e oito de seringueira, um de manga, um de citros e dois de pimentão. Também foram amplificados dois isolados monospóricos de seringueira e f) os fungicidas Flutriafol, Tebuconazol, Epoxiconazol + Piraclostrobina, Azoxistrobina + Ciproconazol e Propiconazol, foram eficientes no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*. O controle com extratos aquosos foi nulo, favorecendo o crescimento dos isolados.

O presente trabalho permitiu identificar *Colletotrichum acutatum* como nova espécie causadora de antracnose da seringueira. *Colletotrichum acutatum* de citros consegue infectar plantas de seringueira, o qual deve ser considerado no manejo da doença.

**CHARACTERIZATION AND CONTROL OF *Colletotrichum* spp. IN RUBBER (*Hevea brasiliensis*). Botucatu, 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista.**

Author: Juan Fernan Sierra Hayer

Adviser: Edson Luiz Furtado

## **2 SUMMARY**

The rubber cultivation [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Jussieu) Muell. Arg.] is being attacked by several diseases of economic importance, among which is the anthracnose; this is caused by the fungus *Colletotrichum* spp. (teleomorph: *Glomerella* spp). This fungus causes several damages in the plant such as injuries in the leaves, branches, fruits and cankers in the tapping panel. Only *Colletotrichum gloeosporioides* was reported as the causal agent of this disease in Brazil. The aim of this study was to identify isolates of the fungus *Colletotrichum* spp. from rubber trees, localized in different regions of Sao Paulo state. The study was carried out by six phases: a) culture characterization, in which the color and the culture appearance were observed *in vitro*, conidial production and growth rate at six temperatures (10, 15, 20, 25, 30, 35 °C); b) morphological characterization, which consist of measuring the length and width, and observed the shape of the conidia; c) pathogenicity test on selected leaves and disks of leaves, with four isolates from rubber and two isolates from citrus; d) growth in fungicide benomyl at four concentrations of active ingredient; e) molecular identification for monosporic and multisporic cultures with specific *primers* to the species of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* and ITS1 and ITS4 *primers* which amplified a small region (18S) and a large region (28S), and these also allowed the amplification of 5.8S rDNA and internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2); f) Growth tests in culture medium supplemented with fungicides: flutriafol, tebuconazole, epoxiconazole + piradostrobina, chlorothalonil + tiofonato-methyl, captan, mancozeb, carbendazim, azoxystrobin + cyproconazole and propiconazole. In this test, four isolates were used from

different organs of plants. Different aqueous extracts also were tested: *Melia azedarach* L, *Corymbia citriodora*, *Trichilia clausenii*, *Trichilia elegans*, *Azadirachta indica* A. Juss, *Chenopodium ambrosioides*, *Coriandrum sativum* e *Piper nigrum* L. The following results were obtained: a) the isolates were divided into two groups, a first group with orange+gray and orange color, and a second group with light gray color. The appearance color was not a predominant factor to determine the species. The conidial production showed to be varied from one isolate to another. The optimum temperature for growth of the isolates was 25 °C; b) the isolates presented large variation in size and shape between two predominant species *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*, having an overlap in size between the two species; c) All isolates of rubber and citrus were pathogenic, thus confirming the two species that cause anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*, and an infection of other citrus plants for rubber; d) The growth of the isolates of rubber in benomyl was not representative, since all grew up in all doses; e) The specific primer of *Colletotrichum gloeosporioides* identified eight multisporic and three monosporic cultures. The specific primer of *Colletotrichum acutatum* identified forty six multisporics and 3 monosporic cultures. The primers ITS1 and ITS4 allowed amplify isolates multisporic corresponding to seventy eight from rubber, one from mango, one from citrus and two from pepper. Two isolates monosporic from rubber also were amplified; f) the fungicides Flutriafol, Tebuconazol, Epoxiconazol + Piraclostrobina, Azoxistrobina + Ciproconazol e Propiconazol, were effective in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*. The control with aqueous extracts was nil, favoring the growth of the isolates.

In the preset study, *Colletotrichum acutatum* were identified as a new specie causing anthracnose in rubber. *Colletotrichum acutatum* of citrus can infect rubber plants, which should be considered in the management of the disease.

---

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, characterization, control.

### 3 INTRODUÇÃO

A produção mundial de borracha natural em 2006 foi aproximadamente 9,6 milhões de toneladas, sendo que a Ásia produziu 9,2 milhões de toneladas, a África 423 mil toneladas e a América Latina 203 mil toneladas. O Brasil participou com apenas 1,6% da produção em termos globais. A estimativa de produção anual de borracha natural está em torno de 95,5 mil toneladas para atender um consumo de 320 mil toneladas demandadas até julho de 2005. O país conta atualmente, com o plantio de apenas 220.000 hectares de seringueira, dos quais somente 100.000 encontram-se em fase produtiva. Os principais Estados brasileiros produtores de borracha natural e com possibilidades de expansão do cultivo da seringueira são: São Paulo, Mato Grosso, Bahia, Espírito Santo e Paraná. (Embrapa, 2007).

Desde 1960, o Brasil vem tentando atingir autossuficiência na produção de elastômero natural. As tentativas anteriores para produzir borracha natural, em larga escala, na Amazônia, redundaram em fracasso devido a severas epidemias do mal das folhas (*Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx). Cerca de dezoito doenças de natureza biótica já foram constatadas no Brasil (Reis, 1999). Igualmente se encontram no Estado de São Paulo a antracnose (*Colletotrichum gloeosporoides*) e o Oídio (*Oidium hevea*) (Furtado, 2005).

A antracnose da seringueira, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., constitui um sério problema para a cultura da seringueira no Estado de São Paulo; este fungo ataca diversas partes da planta ou atua como saprófita associado a outros patógenos (Furtado & Silveira, 1992). No Estado de São Paulo verificou-se a sua ocorrência em folhas, ramos e inflorescência (Silveira & Cardoso, 1987), em hastes e placas de enxerto em jardim clonal e viveiros (Furtado & Silveira, 1992) e, finalmente, em painéis de sangria (Silveira *et al.*, 1992a).

O presente trabalho teve como objetivo identificar isolados de *Colletotrichum* spp. de seringueira de diversas regiões de plantio do Estado de São Paulo. O trabalho foi conduzido em cinco fases: a) caracterização cultural, na qual foram observadas a coloração e o aspecto das culturas *in vitro*. Produção de conídios e taxa de crescimento em seis temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C); b) caracterização morfológica, na qual foi medido comprimento, largura e observado o formato dos conídios; c) teste de patogenicidade em folíolos destacados e em discos de folíolos, com quatro isolados de seringueira e dois de citros; d) crescimento em benomyl em quatro concentrações de princípio ativo; e) Identificação molecular para culturas monospóricas e multispóricas com *primers* específicos para as espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* e os *primers* ITS1 e ITS4 os quais amplificaram uma pequena região (18S) e uma grande região (28S), e estes também permitiram a amplificação da região 5.8S do rDNA e os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), e f) testes de crescimento em meio de cultivo acrescido com fungicidas: flutriafol, tebuconazol, epoxiconazol + piradostrobina, clorotalonil + tiofonato-metílico, captana, mancozebe, carbendazim, azoxistrobina + ciproconazol e propiconazol. Neste teste foram utilizados quatro isolados de diferentes órgãos da planta. Também foram testados diferentes extratos aquosos: *Melia azedarach* L, *Corymbia citriodora*, *Trichilia clausenii*, *Trichilia elegans*, *Azadirachta indica* A. Juss, *Chenopodium ambrosioides*, *Coriandrum sativum* e *Piper nigrum* L.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Ocorrência e importância da doença

Os primeiros registros da antracnose na seringueira foram feitos por Petch (1906) no Sri Lanka (ex – Ceilão), e na Malásia John (1952). Na Malásia esta doença é conhecida como “*Gloeosporium* leaf disease” (Wastie, 1973). Sua ocorrência é verificada praticamente em todos os países onde a seringueira é cultivada.

No Brasil, a antracnose ocorre com maior severidade nos estados da região Norte, todavia, apenas na forma de surtos esporádicos, ou eventuais, em viveiro, jardim clonal e plantio definitivo, causando lesões foliares, desfolhamento e mortalidade de ramos e galhos (Furtado & Trindade, 2005).

As seguintes espécies fúngicas têm sido relatadas em *Hevea* spp., como causadores da antracnose: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *C. derridis* van Hoof, *C. ficus* Koord., *Gloeosporium albo-rubrum* Petch, *G. brunneum* Petch, *G. elasticae* Chee e Maas e *G. heveae* Petch. Carpenter e Stevenson (1954), citado por Ferreira (1989), estudando as descrições dessas espécies, concluíram que todas poderiam ser consideradas como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Ferreira, 1989).

A antracnose da seringueira, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., constitui um sério problema para a cultura da seringueira no Estado de São Paulo, atacando diversas partes da planta ou atuando como saprófita associado a outros

patógenos (Silveira *et al.*, 1992b, Furtado & Silveira, 1992). No Estado de São Paulo verificou-se a sua ocorrência em folhas, ramos e inflorescência (Silveira & Cardoso, 1987), em hastes e placas de enxerto em jardim clonal e viveiros (Furtado & Silveira, 1992) e, finalmente, em painéis de sangria (Silveira *et al.*, 1992a).

A antracnose da seringueira ocorre no Norte do País associada ao mal-das-folhas ou em plantas com estresse nutricional (Gasparoto *et al.*, 1984). Em latitude mais elevada, esta doença acarreta danos severos em brotações novas, causando seca descendente e lesionando folhas. A doença pode ser também encontrada nos estados de MS, PR, MG, e ES (Furtado & Trindade, 2005).

O agente causal da antracnose da seringueira é *Glomerella cingulata*. Fungo da divisão Ascomycota, ordem Diaphortales, que na fase anamórfica corresponde ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. O patógeno é comum a diversos hospedeiros, o que favorece sua sobrevivência e dificulta seu controle. Seus conídios germinam em 4 a 6 horas em água livre. Os sintomas aparecem três dias após inoculação. A esporulação ocorre após o quinto dia. A disseminação dá-se, principalmente, através da água da chuva, não se descartando a possibilidade de ser transferido planta a planta por intermédio da faca de sangria. Condições climáticas que favorecem a doença são temperatura média de 21 °C, umidade relativa acima de 90% por 13 horas e períodos chuvosos (Furtado & Trindade, 2005).

As lesões podem ocorrer também nos pecíolos, sendo mais alongadas naqueles órgãos. Nos frutos, as lesões causam rachaduras e apodrecimento na casca. Nos ramos verdes, as infecções geralmente ocorrem nas suas inserções com o galho. Quando as condições de ambiente são muito favoráveis, essas lesões desenvolvem-se rapidamente, causando quebra de ramos na base, à altura dos locais lesionados, enquanto seus folíolos permanecem completamente verdes. De certa forma, nos ramos, essa doença pode ser confundida com o ataque de *Phytophthora* spp. Em geral, nas lesões de *C. gloeosporioides* podem ser observadas massas róseas, provenientes de abundante esporulação conidial do patógeno que sai dos acérvulos (Gasparotto, 1997).

Quanto aos danos observados pode-se citar no viveiro e jardim clonal, a morte de hastes destinadas à produção de gemas para enxertia, baixo descolamento de casca, além de provocar o baixo pegamento da enxertia, devido às placas do enxerto estarem infectadas. Local este que o patógeno se desenvolve rapidamente sob o plástico de proteção do

enxerto, matando os tecidos do mesmo e lesionando também o cavalinho. Em seringais adultos causam desfolhamento intenso e seca de ramos, debilitando as plantas e provocando um atraso na recuperação da copa, atrasando o reinício da sangria, além de facilitar a penetração de outros patógenos como *Phomopsis* sp. e *Botryodiplodia* sp. (Silveira *et al.*, 1992b).

Entre os parâmetros de identificação dos fungos fitopatogênicos, particularmente *Colletotrichum*, estão às técnicas tradicionais de morfologia, como tamanho e formato de conídios (Smith; Black, 1990, Menezes, 2002, Mills, 1992a).

## 4.2 Técnicas moleculares

Compatibilidade vegetativa, um mecanismo que controla isolamento genético de populações, tem sido usada extensivamente para examinar relacionamento genético no número de fungos fitopatogênicos de plantas. Grupos de compatibilidade genética (VCG) têm sido usados para análise de subespécies de *Colletotrichum gloeosporioides* de amendoim, *C. graminicola* de milho e *C. acutatum* de morango (Freemam *et al.*, 1998).

Nas últimas décadas, várias técnicas moleculares foram usadas sucessivamente para realizar descrições entre espécies. Reação em cadeia de polimerase (ap-PCR) e polimorfismo do núcleo DNA, DNA ribossomo (rDNA), DNA mitocondrial (mtDNA), e A+ T-rici DNA tem sido utilizados para diferenciar populações de *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. kahawae*, *C. magna*, *C. orbiculare* e outras espécies de hospedeiros (Freemam *et al.*, 1998).

Técnicas moleculares auxiliam na caracterização e identificação das espécies de *Colletotrichum*. Várias têm sido utilizadas como sucesso para complementar estudo de diferenciação de populações de *Colletotrichum* (Bueno, 2005) e (Lopez, 2001).

Com a utilização de *primers* específicos para espécies de *Colletotrichum* obtidos a partir da análise de sequência da região ITS, podem-se confirmar os resultados de morfologia e patogenicidade (Mills; Hodson; Brown 1992b, Freemam *et al.*, 2000, Freemam *et al.*, 2001).



### 4.3 Suscetibilidade ao fungicida benomyl

O fungicida benomyl pertence ao grupo dos benzimidazole, que compreende ainda os fungicidas carbendazim, tiabendazole, tiofanato metílico, que apresentam grande similaridade, tanto em seu aspecto fungistático como em suas estruturas químicas (Nene & Thaplyial, 1979).

O benomyl possui atividade sistêmica, com função erradicante e protetora contra um grande espectro de doenças causadas por fungos (Worting, 1979).

Isolados de *C. acutatum* demonstram uma baixa sensibilidade ao fungicida em experimentos *in vitro* (Sonoda & Pelosi, 1988; Dias *et al.*, 1995).

Freeman *et al.* (1998) consideram que, em geral, os isolados de *C. gloeosporioides* são altamente sensíveis ao benomyl em ensaios de laboratório, enquanto os isolados de *C. acutatum* são relativamente insensíveis ao fungicida.

Balardin & Rodrigues (1994) verificaram o efeito dos fungicidas no crescimento micelial *in vitro* de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*, utilizou os fungicidas tiofanato metílico + chlorothalonil, chlorothalonil, trifinil hidróxido de estanho, tiofanato metílico e benomyl em diferentes concentrações. Observaram variação significativa no crescimento micelial devido à ação dos fungicidas nas diferentes concentrações estudadas. O maior efeito inibidor foi causado por benomyl. A maior inibição foi observada pelos produtos com ação sistêmica, o que pode implicar em maior pressão de seleção e acarretar o surgimento de isolados adaptados.

### 4.4 Controle com fungicidas

A cultura da seringueira pode ser atacada por diferentes doenças. Estas doenças podem ser controladas com fungicidas que oferecem resultados satisfatórios para viveiros, jardins clonais e seringais jovens. Em seringais adultos, o uso de fungicidas é limitado pela falta de equipamentos de pulverizações adequados (Gasparotto *et al.*, 1985).

O controle da antracnose da seringueira pode ser feito preventivamente no viveiro e jardim clonal com fungicidas a base de chlorothalonil ou oxiclureto de cobre. No

painel de sangria, o controle pode ser efetuado através do pincelamento, ou pulverização, com fungicidas a base de chlorothalonil, chlorothalonil+tiofanato metílico, zineb+óleo vegetal, propiconazole e tebuconazole (Furtado & Trindade, 2005).

Flutriafol (125g/L) é um fungicida sistêmico, do grupo químico dos triazóis, usado em pulverização para o controle das doenças da parte aérea das culturas de aveia, banana, café, melão, soja e trigo. Este fungicida além de controlar outros fungos, também controla o fungo *Colletotrichum gossypii* Soutn, agente causal da antracnose e tombamento do algodão (Agrofit, 2009).

Tebuconazol (200g/L) é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis com ação preventiva e curativa. Este fungicida além de controlar outros fungos, também controla as seguintes espécies de *Colletotrichum*: *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. (ramulose e tombamento do algodão), *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Antracnose nos botões florais de citros, podridão de pós-colheita do mamão, manga, maracujá e podridão da uva madura) e *C. orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx (Melancia) (Agrofit, 2009).

Epoxiconazol (50g/L)+piraclostrobina (133g/L) é um produto que apresenta duplo modo de ação, atuando através do ingrediente ativo epoxiconazol do grupo químico da estrobilurina, como inibidor da bio-síntese do ergostrol, o qual é um constituinte da membrana celular dos fungos e através do ingrediente ativo piraclostrobina do grupo químico dos triazóis, como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP, essencial nos processos metabólicos dos fungos. Este fungicida controla a espécie de *C. truncatum* (Schwein.) Andrus et W.D. Moore é sinônimo de *Vermicularia truncata* Schwein. (Soja) (Agrofit, 2009).

Clorotalonil (500g/Kg) do grupo químico de isoftalonitrila + Tiofanato-metílico (200g/Kg) do grupo químico do benzimidazol, trata-se de um fungicida pó molhável, com ações sistêmicas e de contato, empregado no controle de inúmeras doenças fúngicas em diversas culturas. Controla *C. lindemuthianum* (Sacc. et Magnus) Briosi et Cavara. (Feijão), *C. orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx (Melancia, melão e pepino) e *C. gloeosporioides* (podridão da uva madura) (Agrofit, 2009).

Captana (480g/L) do grupo químico da dicarboximida é um fungicida não sistêmico, com ação preventiva, utilizado no controle de doenças fúngicas, através da

aplicação foliar nas culturas de batata, cebola, maçã, tomate e uva e no tratamento das sementes das culturas de algodão, feijão, milho e soja. Controla *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. (ramulose e tombamento do algodão), *Colletotrichum gossypii* Soutn (antracnose e tombamento do algodão), *C. lindemuthianum* (Sacc. et Magnus) Briosi et Cavara. (Feijão) e *Colletotrichum dematium* (Pers.) Grove (antracnose em soja) (Agrofit, 2009).

Mancozebe (800g/L) do grupo químico dos alquilenobis, com ação de contato. Atua sobre algumas espécies de *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Antracnose nos botões florais de citros, mancha foliar da gala em maçã, mamão, pimentão e manga), *C. lindemuthianum* (Sacc. et Magnus) Briosi et Cavara. (Feijão, feijão vagem) e *C. orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx (Melancia, melão e pepino) (Agrofit, 2009).

Carbendazim (500g/L) do grupo químico do benzimidazol é um fungicida sistêmico, indicado no tratamento de doenças da parte aérea nas culturas de citros, feijão, trigo, soja e no tratamento de sementes de feijão, soja e algodão. Atua no controle de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. (ramulose e tombamento do algodão), *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc (Antracnose nos botões florais de citros), *C. lindemuthianum* (Sacc. et Magnus) Briosi et Cavara. (Feijão) e *C. truncatum* (Schwein.) Andrus et W.D. (Soja) (Agrofit, 2009).

Azoxistrobina (200g/L) do grupo químico da estrobilurina + ciproconazol (80g/L) do grupo químico dos triazóis, é um fungicida sistêmico, usado em pulverizações preventivas, para o controle de doenças da parte aérea das culturas do algodão, café, cevada, milho, soja e trigo. Atua no controle de *C. truncatum* (Schwein.) Andrus et W.D. (Soja) (Agrofit, 2009).

Propiconazol (250g/L) do grupo químico dos triazóis é um fungicida sistêmico recomendado para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., agente causal da antracnose da seringueira (Agrofit, 2009).

Considerando o aumento da intensidade de antracnose nos seringais e pouca disponibilidade de informações, há necessidade de mais estudos envolvendo este patossistema. Informações devem ser obtidas sobre a variabilidade do patógeno, o desenvolvimento de metodologia para avaliar o comportamento de clones de seringueira com

relação aos componentes de resistência, e conhecimento dos fatores que favorecem o desenvolvimento da doença, entre outros aspectos (Stradioto, 1992).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado na Fazenda Experimental Lageado, localizada no município de Botucatu, Estado de São Paulo e foi conduzido pelo período de dois anos.

Este trabalho foi feito no Departamento de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônômicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu - Laboratórios de Fitopatologia Florestal.

O município de Botucatu tem como coordenadas a região central 22°51'03"S e 48°25'37"W e altitude de 786m. O clima, segundo a classificação de Köppen é Cfa – moderado chuvoso, com quatro a seis meses consecutivos com temperatura média do ar acima de 10°C. A temperatura média anual é de 22,8°C no mês mais quente e de 16,7°C no mês mais frio, sendo a média anual de 20,6°C. Tem precipitação pluviométrica média de 1518,8mm, sendo, em média, 229,5mm e 37,5mm para os meses de maior e menor precipitação, respectivamente (Martins, 1989). O tipo de solo enquadra-se na classe dos Latossolos Vermelho Escuro com textura arenosa (Pacola, 1997).

### 5.1 Obtenção e preservação dos isolados

Para o isolamento do fungo coletou-se órgãos ou tecidos isolados como pecíolo, folhas, hastes, frutos e casca do painel de sangria de vários cultivares presentes no jardim clonal da UNESP – Botucatu e de algumas outras regiões do estado de São Paulo (Tabela 1). Utilizaram-se cultivares como: RRIM 600, PR 255, RRIM 701, GT 1 e PB 235, em condições de jardim clonal. Todas as plantas encontram-se com uniformidade de brotações (Figura 1).

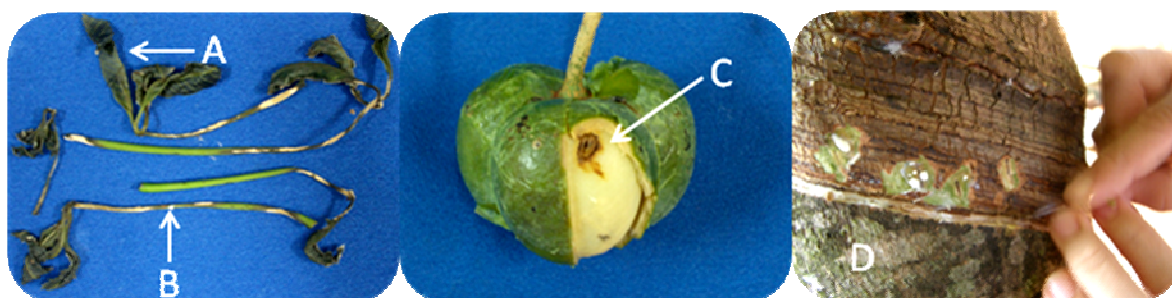


Figura 1. Sintomas de *Colletotrichum* spp. A: Folha; B: Haste; C: Fruto e D: Painel de sangria.

As amostras coletadas foram levadas ao laboratório no qual foi feita a verificação dos conídios mediante exame no microscópio ótico. Para isolamento parte de cada amostra foi submetida a solução de álcool a 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos e por ultimo foi feito um enxague com água autoclavada estéril e, posteriormente, foram colocadas dentro da câmara de fluxo laminar sobre papel toalha para sua secagem. Logo foram colocados cortes finos em placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) Difco® (39 g/L) e, oxitetraciclina (0,06 g/L), depois foram mantidas em Biological Oxygen Demand (BOD) a temperatura de  $25 \pm 1$  °C, durante 8 dias.

A preservação em óleo mineral foi feita a partir de tubos de ensaio contendo meio BDA, este foi autoclavado e distribuído para os tubos contendo 5 mL de meio, após autoclavagem foram colocados em inclinação para sua solidificação. Logo na câmara de fluxo laminar foram colocados discos de 7 mm no centro e tampados com algodão esterilizado e, mantidos em BOD a temperatura de 25 °C, durante 5 dias. Após seu crescimento foi

depositado 6 mL de óleo mineral autoclavado, ficando um centímetro acima do crescimento do fungo.

A preservação, do método Castelani foi feita em frascos de penicilina contendo 10 mL de água esterilizada e autoclavada. Foram adicionados oito discos de 7mm da colônia fúngica e posteriormente foram tampados com tampa de borracha e lacre de alumínio e, finalmente, fechados com alicate de recrave.

A preservação ao frio (-80 °C) foi feita em tubos falcon de 15 mL, onde foram depositados micélios pertencentes a cada isolado, estes foram retirados das placas de Petri com ajuda de um bisturi.

Tabela 1. Identificação dos isolados, procedência de diferentes clones de seringueira, citros e manga, local, tecido e data de coleta.

							(continua)
#	Identificação	Espécie	Hospedeiro	Clone	Tecido	Local	Data de coleta
1P	Cg91	<i>C. gloeosporioides</i>	Pimentão	-	Haste	Pouso Alegre/MG	05/07
2P	Ca99	<i>C. acutatum</i>	Pimentão	-	Fruto	Bragança Paulista/SP	06/08
3C	FL1	<i>Colletotrichum</i> spp.	Citros	Laranja	Flor	Mirassolandia/SP	27/08/2009
4C	FL2	<i>Colletotrichum</i> spp.	Citros	Laranja	Flor	Mirassolandia/SP	27/08/2009
5S	Hevea 1	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
6S	Hevea 2	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Pecíolo	Turiuba/SP	29/11/2008
7S	Hevea 3	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	PB 235	Folha	UNESP/Botucatu/SP	20/03/2009
8S	Hevea 4	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
9S	Hevea 5	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT1	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
10S	Hevea 6	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
11S	Hevea 7	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Painel	-	-
12S	Hevea 8	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 701	Folha	Unesp/Botucatu/SP	20/03/2009
13S	Hevea 9	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
14S	43	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	-	Unesp/Botucatu/SP	-
15S	38	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	-	Unesp/Botucatu/SP	-
16S	Hevea 10	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
17S	Hevea 11	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
18S	Hevea 12	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Pecíolo	Monte/SP	28/11/2008
19C	11/78	<i>C. gloeosporioides</i>	Citros	-	-	Taquari/RS	03/01/1978
20S	24	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	-	Unesp/Botucatu/SP	-
21S	Hevea 14	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Fruto	Jaci /SP	30/11/2008
22S	Hevea 15	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Haste	-	-
23S	41	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	-	Unesp/Botucatu/SP	-
24S	Hevea 16	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
25S	S7	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	Haste	Matão/SP	05/2003

Tabela 1. Identificação dos isolados, procedência de diferentes clones de seringueira, citros e manga, local, tecido e data de coleta.

(continua)

#	Identificação	Espécie	Hospedeiro	Clone	Tecido	Local	Data de coleta
26S	Hevea 17	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
27M	04/07	<i>Colletotrichum acutatum</i> .	Manga	-	-	-	05/11/2007
28S	Hevea 19	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Painel	Jaci/SP	30/11/2008
29S	Hevea 20	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Pecíolo	Jaci/SP	30/11/2008
30S	Hevea 21	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
31S	Hevea 22	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Folha	Jaci/SP	30/11/2008
32S	Hevea 23	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
33S	Hevea 24	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Pecíolo	Turiuba/SP	29/11/2008
34S	Hevea 25	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
35S	S6	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	Painel	Ouro verde/SP	05/2003
36S	Hevea 26	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
37S	Hevea 27	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
38S	Hevea 28	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Painel	Jaci/SP	30/11/2008
39S	Hevea 29	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Pecíolo	Jaci/SP	30/11/2008
40S	Hevea 30	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
41S	Hevea 31	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
42S	Pecíolo	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	Pecíolo	-	-
43S	Hevea 32	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Haste	Turiuba/SP	29/11/2008
44S	6	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	-	Unesp/Botucatu/SP	-
45S	Folha	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	-	-	-
46S	S8	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	Painel	Barretos/SP	05/2003
47S	Folha	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	Folha	-	-
48S	Hevea 33	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Fruto	Jaci/SP	30/11/2008
49S	Hevea 34	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
50S	Hevea 35	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Haste	Planalto/SP	03/12/2008
51S	Hevea 36	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Painel	Jaci/SP	30/11/2008
52S	S14	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	-	Haste	Unesp/Botucatu/SP	05/2003
53S	Hevea 37	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Painel	Jaci/SP	30/11/2008
54S	Hevea 38	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Painel	Jaci/SP	30/11/2008
55S	Hevea 39	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Pecíolo	Turiuba/SP	29/11/2008
56S	Hevea 40	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Haste	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
57S	Hevea 41	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	PB 235	Pecíolo	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
58S	Hevea 42	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	PR 255	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
59S	Hevea 43	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	PR 255	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
60S	Hevea 44	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Painel	Macaubao/SP	
61S	Hevea 45	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
62S	Hevea 46	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Haste	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
63S	Hevea 47	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	PR 255	Painel	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
64S	Hevea 48	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Caule	Mirassolandia/SP	27/08/2009
65S	Hevea 49	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Caule	Mirassolandia/SP	27/08/2009
66S	Hevea 50	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	PR 255	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009



Tabela 1. Identificação dos isolados, procedência de diferentes clones de seringueira, citros e manga, local, tecido e data de coleta.

#	Identificação	Espécie	Hospedeiro	Clone	Tecido	Local	Data de coleta
67S	Hevea 51	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	PR 255	Painel	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
68S	Hevea 52	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Haste	Mirassolandia/SP	27/08/2009
69S	Hevea 53	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	IAN 873	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
70S	Hevea 54	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
71S	Hevea 55	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Haste	Mirassolandia/SP	27/08/2009
72S	Hevea 56	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
73S	Hevea 57	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	IAN 873	Painel	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
74S	Hevea 58	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
75S	Hevea 59	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009
76S	Hevea 60	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Haste	Mirassolandia/SP	27/08/2009
77S	Hevea 61	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 937	Painel	Buritama/SP	03/12/2008
78S	Hevea 62	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	GT 1	Haste	Unesp/Botucatu/SP	20/03/2009
79S	Hevea 63	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Caule	Mirassolandia/SP	27/08/2009
80S	Hevea 64	<i>Colletotrichum</i> spp.	Seringueira	RRIM 600	Folha	Unesp/Botucatu/SP	27/08/2009

P = Pimentão; C= Citros; S= seringueira e M= Manga

## 5.2 Caracterização cultural

A caracterização cultural baseou-se no crescimento micelial dos isolados em seis temperaturas 10, 15, 20, 25, 30 e 35±1 °C, em BOD, sob fotoperíodo alternado de 12 horas de luminosidade.

Para estes experimentos foram selecionados quatro isolados de diferentes lugares da seringueira como: fruto (9S), painel de sangria (77S), haste (78S) e folha (31S). Também se utilizaram dois isolados fornecidos pelo Instituto Biológico de São Paulo, pertencentes às espécies de *C. gloeosporioides* (19C), obtido de citros, *Colletotrichum* spp., obtido de manga (27C).

Para o experimento, foram retirados discos de 7 mm das bordas dos isolados de aproximadamente sete dias de crescimento em meio BDA Difco® e, transferidos para o centro de novas placas de Petri de 5.6 mm de diâmetro, contendo o mesmo meio.

A avaliação foi realizada diariamente com auxílio de uma régua milimétrica, determinando-se o crescimento micelial (cm/dia) de cada isolado e nas diferentes

temperaturas. A identificação da coloração foi realizada no quarto dia. Verificou-se a concentração de esporos destas culturas, onde foram depositados 10 mL de água destilada estéril em cada placa. Para obtenção da suspensão dos esporos, o micélio do fungo foi raspado com auxílio de uma alça de Drigalski, logo esta foi peneirada para retirar o excesso de micélio.

O delineamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 6x6 com cinco repetições. Para a concentração de esporos, o delineamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 6x6 com quatro repetições.

Todos os dados foram submetidos e comparados por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) por Francisco de Assis S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG Campina Grande-PB.

Para todos os isolados foi feita a identificação da coloração (Figura 2)



Figura 2. Representação para dominação da coloração da colônia.

### 5.3 Caracterização morfológica

Foi determinado o comprimento e a largura dos conídios, em fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX61, com filtro 450-490nm, e fotografadas com

o programa computacional Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.). Este foi realizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – Laboratório de Genômica Integrativa – UNESP – Botucatu. Foram selecionados trinta e cinco isolados, e aleatoriamente foram medidos vinte conídios por isolado. A forma dos conídios foi classificada por tipo como apresentado na figura (Figura 3). A obtenção das lâminas foi realizada no processo de repicagem dos outros experimentos e com ajuda de uma alça foram retirados os esporos de cada colônia e depositados em cada lâmina contendo uma gota do corante de azul de algodão, logo foi colocada uma lamínula e, posteriormente, o esmalte nas bordas da lamínula, ficando assim preservadas até o momento da leitura.

Os valores do comprimento e da largura foram analisados pelo delineamento inteiramente casualizado, onde os isolados são os tratamentos e os conídios as repetições, por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) por Francisco de Assis S. e Silva DEAG-CTR-UFPA Campina Grande-PB.

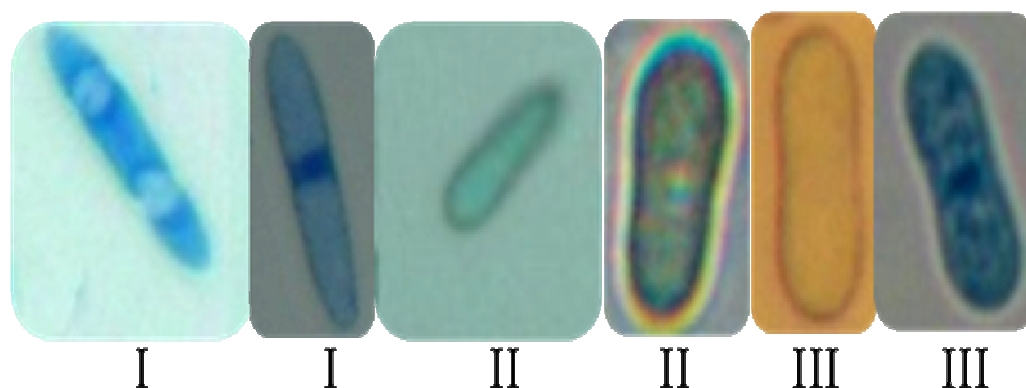


Figura 3. Formato dos conídios de *Colletotrichum* observados no microscópio ótico. I pontiagudo, pontiagudo; II pontiagudo, arredondado; III arredondado, arredondado.

#### 5.4 Culturas monospóricas

Os experimentos foram realizados com o objetivo de verificar as possíveis diferenças na identificação molecular entre as culturas multispóricas e monospóricas.

Para a validação deste experimento foram selecionados seis isolados multispóricos, sendo quatro provenientes da seringueira 9S, 77S, 78S, 31S e dois isolados de pimentão, reconhecidamente pertencentes às espécies de *C. gloeosporioides* (Cg91) e *C. acutatum* (Ca99) cedidos pela Empresa SAKATA®. Estes isolados encontram-se localizados na Tabela 1 pela numeração 1P (Cg91) e 2P para (Ca91).

A metodologia utilizada foi descrita por Menezes, (1997) Para isso se preparou em tubos de ensaio, contendo 10 mL de água estéril, uma suspensão de esporos, bem diluída, de modo a conter 1 a 10 unidades por campo microscópico, quando examinada sobre uma lâmina no aumento de dez vezes. Logo se verteu 1 mL desta suspensão sobre a superfície de um meio sólido e se espalhou uniformemente, com movimentos rotatórios da placa feitos manualmente, até cobrir inteiramente a superfície do meio. Depois se procedeu a incubação das placas em posição inclinada, a temperatura ambiente, durante 36 horas. Após se procedeu ao exame das placas no estereoscópico e com auxílio de um estilete flambado se retirou pequenos quadrados de Agar (1 mm<sup>2</sup>) com o esporo já germinado, transferindo-o para o centro de uma placa de Petri, contendo meio de cultura BDA Difco®, em condições assépticas.

### **5.5 Caracterização patogênica**

Seis isolados foram caracterizados em relação a sua patogenicidade, dois destes isolados pertencente á cultura de citros. O experimento foi realizado com folíolos destacados e discos de folíolos de seringueira (Figura 4). Para obtenção dos discos, estes foram furados com vasador de rolhas de 1,3 cm de diâmetro. A inoculação para ambos experimentos foi efetuada utilizando-se a aplicação de uma suspensão de conídios de  $1 \times 10^5$  conídios/mL, sobre a superfície abaxial e adaxial do folíolo, com ajuda de um cotonete estéril. Os experimentos foram mantidos em câmara úmida a 25°C, por quatro dias em BOD.

Para a caracterização patogênica de folíolos destacados de seringueira foi elaborada uma escala de notas de 1 a 10 para determinar a porcentagem de lesão ocasionada pelo inóculo (Tabela 2) e, para o teste de patogenicidade pelo método de discos foi determinada uma escala de nota em porcentagem. Esta foi realizada com os mesmos discos que apresentaram a lesão (Figura 5).

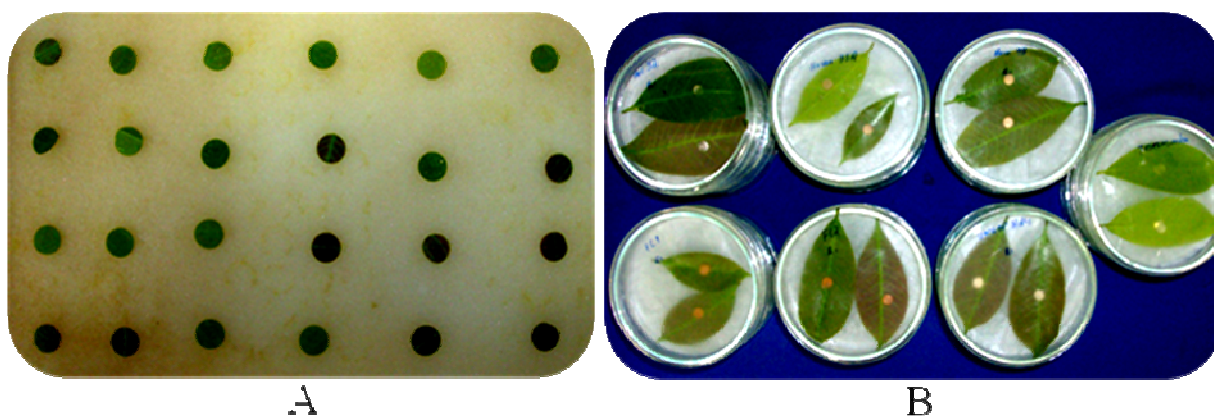


Figura 4. A. Tratamentos de discos com a face abaxial e adaxial; B. Tratamento de folíolos destacados na face abaxial e adaxial.

Tabela 2. Escala de nota em porcentagem.

Nota	%	Nota	%
0	0	6	65
1	5	7	75
2	15	8	85
3	25	9	95
4	45	10	100
5	50		

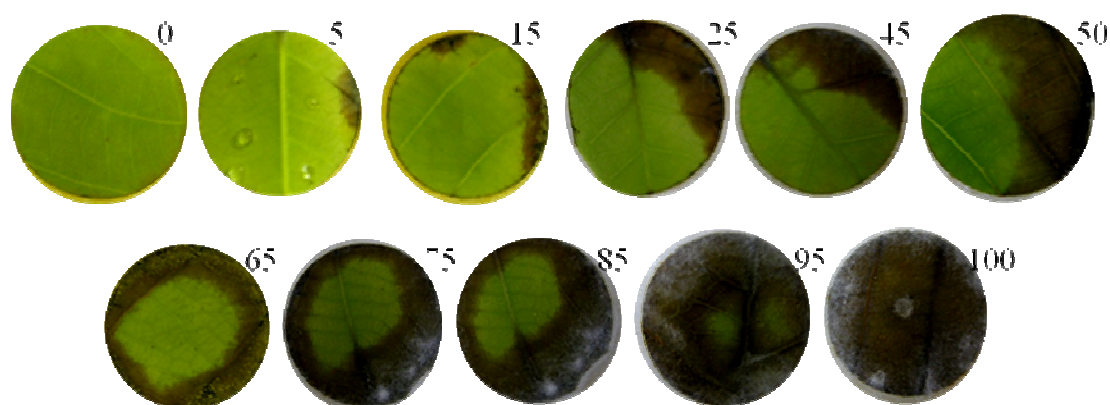


Figura 5. Escala de severidade em relação a necroses (%).

O delineamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 7x2 com quatro repetições para o primeiro experimento, e para o segundo 12 repetições.

Todos os dados foram submetidos e comparados por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) por Francisco de Assis S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG Campina Grande-PB.

## **5.6 Sensibilidade ao fungicida benomyl**

Seis isolados (1C, 2C, 9S, 77S, 78S e 31S) foram testados quanto à sensibilidade ao fungicida benomyl.

O mesmo foi incorporado ao meio fundente de BDA Difco® nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000 ug i.a./mL. Após a solidificação do meio, um disco de micélio de 7 mm de cada isolado foi colocado no centro da placa de Petri de 5.6 mm de diâmetro. As placas foram incubadas a temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  em BOD, durante seis dias.

As avaliações foram realizadas diariamente com auxílio de uma régua milimétrica, tomando-se a medida do diâmetro médio, o crescimento foi medido em cm/dia. Após verificou-se a concentração de esporos destas culturas, como a realizada no item 5.2.

O delineamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 6x5 com cinco repetições. Todos os dados foram submetidos e comparados por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) por Francisco de Assis S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG Campina Grande-PB.

## **5.7 Identificação molecular**

### **5.7.1 Isolamento do DNA genômico**

Micélios de todos os isolados foram incubados a  $-80^{\circ}\text{C}$  no momento da repicagem dos experimentos anteriores, e colocados em tubos Falcon de 15 mL.

A extração de DNA genômico total foi realizada para 65 amostras utilizando-se o método de Dellaporta *et al.* (1983).

Os micélios dos isolados foram colocados em tubos de microcentrífuga de 1500  $\mu\text{L}$ , contendo 500  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (NaCl 0,5M; EDTA 0,05M; Tris-HCl

0,1M pH 8,0;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%), este foi macerado com um pistilo plástico. Após a maceração foram adicionados 33  $\mu$ L de SDS 20% a cada um dos tubos, os quais foram agitados por dois minutos e incubados a 65°C, por dez minutos. Em seguida foram adicionados 160  $\mu$ L, de acetato de potássio 5M, e agitados por dois minutos, logo foram colocados na centrífuga a 12000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga, e após este foram adicionados 600  $\mu$ L de isopropanol, a fim de precipitar o DNA. Foram agitados e submetidos à microcentrífuga a 12000 rpm, durante dez minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente sem remover o “pellet” e lavando-se 500  $\mu$ L de etanol a 70% em cada tubo. Após este foram centrifugados por cinco minutos, e removendo cuidadosamente o sobrenadante. Finalmente as amostras foram secadas a temperatura ambiente e ressuspendido em 100  $\mu$ L de água MilliQ.

A qualidade e concentração do DNA foi verificado colocando-se alíquotas de 4  $\mu$ L de cada amostra de DNA, misturadas com 2  $\mu$ L de tampão carregamento Orange DNA Loading Dye da Fermentas, em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico e 0,02mM EDTA pH 8,3). O gel foi submetido à eletroforese por 80 V/ 90 minutos, as bandas foram coradas com brometo de etídio (10 mg/mL) e observadas através de transluminador UV.

A quantificação do DNA foi realizada no Nanodrop (ACTGene, ASP 2680 – Ver 3,5). A solução estoque de DNA foi diluída numa concentração final de 25ng/ $\mu$ L e estocadas em freezer a -20°C, a fim de evitar a degradação do DNA, sendo descongeladas no momento das reações de PCR.

Outra metodologia utilizada foi empregando-se diretamente o esporo. Para isso, com a ajuda de uma alça estéril, dentro da câmara de fluxo laminar, foi feita uma raspagem da colônia fúngica com a ponta da alça. Logo esta é colocada em um tubo eppendorf de 1.5 mL contendo 50  $\mu$ L de água MilliQ, se agita um pouco para que a solução fique homogênea, e em seguida foram preservados a - 20°C. Posteriormente são utilizados 3  $\mu$ L da amostra para produto de PCR.

### 5.7.2 Análise por PCR

Para a identificação molecular pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram utilizados *primer* específicos para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, para a identificação de todos os isolados, junto com os monospóricos.

Para todas as análises o reagente de extração utilizado foi PCR Master Mix (2X) da Fermentas®. Composto de 0,05 uni/ µL *Taq* DNA polimerase, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP e 0,4 mM dTTP.

A identificação de *C. acutatum* foi realizada com os *primers* Calnt2 (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 utilizando 25 µL de volume total por amostra, contendo 12,5 µL de Master Mix (2X), 0,140 µL de cada um dos *primer*, 3 µL de DNA extraído e 9,22 de água livre de nuclease. O programa do termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Para a detecção de *C. gloeosporioides* foi utilizado os *primers* Cglnt (5'- GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por Mills, Sreenivasaprasad e Brown (1992b). A reação foi realizada utilizando 25 µL de volume total por amostra, contendo 12,5 µL de Master Mix (2X), 0,140 µL de cada um dos *primer*, 3 µL de DNA extraído e 9,22 de água livre de nuclease. O programa do termociclador programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Para todos os isolados junto com os monospóricos foram testados os *primers* ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') que permitiram a amplificação de uma pequena região (18S) e uma grande região (28S), e estes também permitiram a amplificação da região 5.8S do rDNA e os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) White *et al.* (1990).



A reação foi realizada utilizando-se 25 µL de volume total por amostra, contendo 12,5 µL de Master Mix (2X), 0,140 µL de cada um dos *primer*, 3 µL de DNA extraído e 9,22 de água livre de nuclease. O programa no termociclador foi programado um ciclo de 94 °C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,2% contendo 0,8 µL de brometo de etídio. A eletroforese foi realizada a 80 v / 250 mA / 90 minutos. Após a corrida, o gel foi colocado em um transluminador tipo STRATAGENE EAGLEEYE II de ultravioleta.

### 5.8 Testes com extratos aquosos

Avaliou-se o efeito de extratos aquosos de oito plantas na concentração de 5%, no crescimento micelial de um isolado de seringueira presente na tabela 1 e representado pelo #12S. Para a preparação das diluições foram utilizados oito extratos (Tabela 3), que estavam com uma concentração de 5% e deste se partiu para fazer as diluições em série de 0, 1, 10, 100, 1000 e 10000 µg/i.a/mL. Estes foram colocados em frascos de Duran contendo 100 ml de água estéril e deixados durante 24 horas em agitação, após foram filtrados com ajuda de um tecido voil e colocados em novos frascos para a continuação das diluições em series. Todo o preparo foi feito em condições assépticas.

Tabela 3. Denominação dos extratos aquosos utilizados no teste.

#	Nome comum	Nome científico	Órgão
1	Santa Barbara ou Cinamomo	<i>Melia azedarach</i>	Folha
2	Eucalipto citrodora	<i>Corymbia citriodora</i>	Folhas
3	Catiguá	<i>Trichilia clausenii</i>	Folhas
4	Pau-de-ervilha	<i>Trichilia elegans</i>	Folhas
5	Nim	<i>Azadirachta indica</i>	Sementes
6	Santa Maria	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Folhas + Ramos + Flores
7	Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Sementes
8	Pimenta do reino	<i>Piper nigrum</i>	Frutos

Para avaliar a eficiência dos extratos aquosos, os mesmos foram incorporados ao meio fundente de BDA Difco® nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000 e 10000 µg/i.a./mL. Após a solidificação do meio, um disco de micélio de 7 mm de cada isolado foi colocado no centro da placa de Petri de 8 mm de diâmetro. As placas foram incubadas a temperatura de 25±1 °C em BOD, durante oito dias.

As avaliações foram realizadas diariamente com auxílio de uma régua milimétrica. O crescimento foi medido em cm/dia.

O delineamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 8x6 com cinco repetições. Todos os dados foram submetidos e comparados por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) por Francisco de Assis S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG Campina Grande-PB.

### **5.9 Teste com fungicidas**

Para estes experimentos foram selecionados quatro isolados de diferentes lugares da seringueira como: fruto (9S), painel de sangria (77S), haste (78S) e folha (31S).

Estes isolados foram testados quanto à sensibilidade aos fungicidas flutriafol, tebuconazol, epoxiconazol + piradostrobina, clorotalonil + tiofonato-metílico, captana, mancozebe, carbendazim, azoxistrobina + ciproconazol e propiconazol, nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg i.a./mL. As características gerais de cada fungicida encontram-se na (Tabela 4).

Tabela 4. Marca comercial, ingrediente ativo, grupo químico, modo de ação, e concentração do produto comercial dos fungicidas utilizados neste experimento.

#	Marca comercial	Ingrediente ativo	Grupo químico	Modo de ação	Concentração
1	Impact (SC)	Flutriafol	Triazol	Sistêmico	125 g/L
2	Folicur 200 EC	Tebuconazol	Triazol	Sistêmico	200 g/L
3	Opera (SE)	Epoxiconazol	Triazol	Sistêmico	50 g/L
		Piraclostrobina	Estrobilurina		133 g/L
4	Cerconil (WP)	Clorotalonil	Isofalonitrila	Sistêmico e de contato	500 g/Kg
		Tiofanato-metílico	Benzimidazol		200 g/Kg
5	Captan (SC)	Captana	Dicarboximida	Preventiva	480 g/L
6	Dithane NT (WP)	Mancozebe	Alquilenobis	De contato	800 g/Kg
7	Derosal 500 (SC)	Carbendazim	Benzimidazol	Sistêmico	500 g/L
8	Priori Xtra (SC)	Azoxistrobina	Estrobilurina	Sistêmico	200 g/L
		Ciproconazol	Triazol		80 g/L
9	Tilt (WP)	Propiconazol	Triazol	Sistêmico	250 g/L
10	Testemunha BDA Difco®				

Fonte: AGROFIT (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2009.

Para avaliar a eficiência dos produtos químicos no crescimento micelial dos isolados, se procedeu ao cálculo de ingrediente ativo de cada fungicida e a diluição em água autoclavada.

Os fungicidas foram incorporados em BDA autoclavado e vertidos para placas de Petri de 5.6 mm de diâmetro. Após a solidificação do meio, um disco de micélio de 7 mm de cada isolado foi colocado no centro da placa de Petri. As placas foram incubadas a temperatura de  $25 \pm 1$  °C em BOD, durante cinco dias.

As avaliações foram realizadas diariamente com auxílio de uma régua milimétrica, tomando-se a medida do diâmetro médio, o crescimento foi medido em cm/dia.

O delineamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 9x5 com cinco repetições para os quatro isolados. Todos os dados foram submetidos e comparados por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) por Francisco de Assis S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG Campina Grande-PB.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização cultural dos isolados de *Colletotrichum*

De acordo com a Tabela 5, os isolados foram classificados em grupos, devido à alta variação de coloração (Figura 6).

Tabela 5. Classificação dos isolados de *Colletotrichum*, em função da coloração da colônia no verso e reverso de placas de Petri. Colônias desenvolvidas em BDA, sob  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 24 horas aos seis dias após a repicagem.

(Continua)

Isolados	Verso	Reverso	Isolados	Verso	Reverso
<b>1P</b>	Cinza, laranja	Laranja, cinza	<b>15S</b>	Laranja	Laranja, cinza
<b>2P</b>	Cinza	Cinza	<b>16S</b>	Laranja	Laranja
<b>3C</b>	Laranja	Amarela laranja	<b>17S</b>	Laranja	Laranja
<b>4C</b>	Laranja	Amarela laranja	<b>18S</b>	Laranja	Laranja
<b>5S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>19C</b>	Cinza claro	Cinza
<b>6S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>20S</b>	Laranja	Laranja
<b>7S</b>	Laranja	Laranja	<b>21S</b>	Laranja	Laranja
<b>8S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>22S</b>	Cinza claro	Cinza
<b>9S</b>	Laranja, cinza	Laranja	<b>23S</b>	Laranja, cinza	Laranja, cinza
<b>10S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>24S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>11S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>25S</b>	Cinza claro	Cinza
<b>12S</b>	Cinza claro	Branco	<b>26S</b>	Cinza claro	Cinza
<b>13S</b>	Laranja, cinza	Laranja	<b>27M</b>	Laranja, cinza	Cinza, laranja
<b>14S</b>	Laranja, cinza	Laranja, cinza	<b>28S</b>	Cinza claro	Cinza

Tabela 5. Classificação dos isolados de *Colletotrichum*, em função da coloração da colônia no verso e reverso de placas de Petri. Colônias desenvolvidas em BDA, sob 25±1°C, fotoperíodo de 24 horas aos seis dias após a repicagem.

<b>Isolados</b>	<b>Verso</b>	<b>Reverso</b>	<b>Isolados</b>	<b>Verso</b>	<b>Reverso</b>
<b>29S</b>	Cinza, laranja	Cinza, laranja	<b>55S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>30S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>56S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>31S</b>	Laranja	Laranja	<b>57S</b>	Laranja	Laranja
<b>32S</b>	Laranja	Laranja	<b>58S</b>	Laranja	Laranja
<b>33S</b>	Laranja	Laranja	<b>59S</b>	Laranja, creme	Laranja
<b>34S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>60S</b>	Laranja	Laranja
<b>35S</b>	Laranja	Laranja	<b>61S</b>	Laranja	Laranja
<b>36S</b>	Laranja	Laranja	<b>62S</b>	Laranja	Laranja
<b>37S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>63S</b>	Laranja	Laranja
<b>38S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>64S</b>	Laranja	Laranja
<b>39S</b>	Laranja	Laranja	<b>65S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>40S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>66S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>41S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>67S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>42S</b>	Laranja	Laranja	<b>68S</b>	Laranja	Laranja
<b>43S</b>	Laranja	Laranja	<b>69S</b>	Laranja	Laranja
<b>44S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>70S</b>	Cinza, laranja	Laranja
<b>45S</b>	Laranja cinza	Laranja	<b>71S</b>	Cinza, Laranja	Laranja
<b>46S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>72S</b>	Laranja	Laranja
<b>47S</b>	Laranja	Laranja	<b>73S</b>	Laranja	Laranja
<b>48S</b>	Laranja	Laranja	<b>74S</b>	Laranja	Laranja
<b>49S</b>	Laranja	Laranja	<b>75S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>50S</b>	Laranja	Laranja	<b>76S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>51S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>77S</b>	Cinza, Laranja	Laranja
<b>52S</b>	Laranja, cinza	Laranja	<b>78S</b>	Laranja, cinza	Laranja
<b>53S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>79S</b>	Laranja	Laranja
<b>54S</b>	Cinza claro	Cinza	<b>80S</b>	Laranja, cinza	Laranja

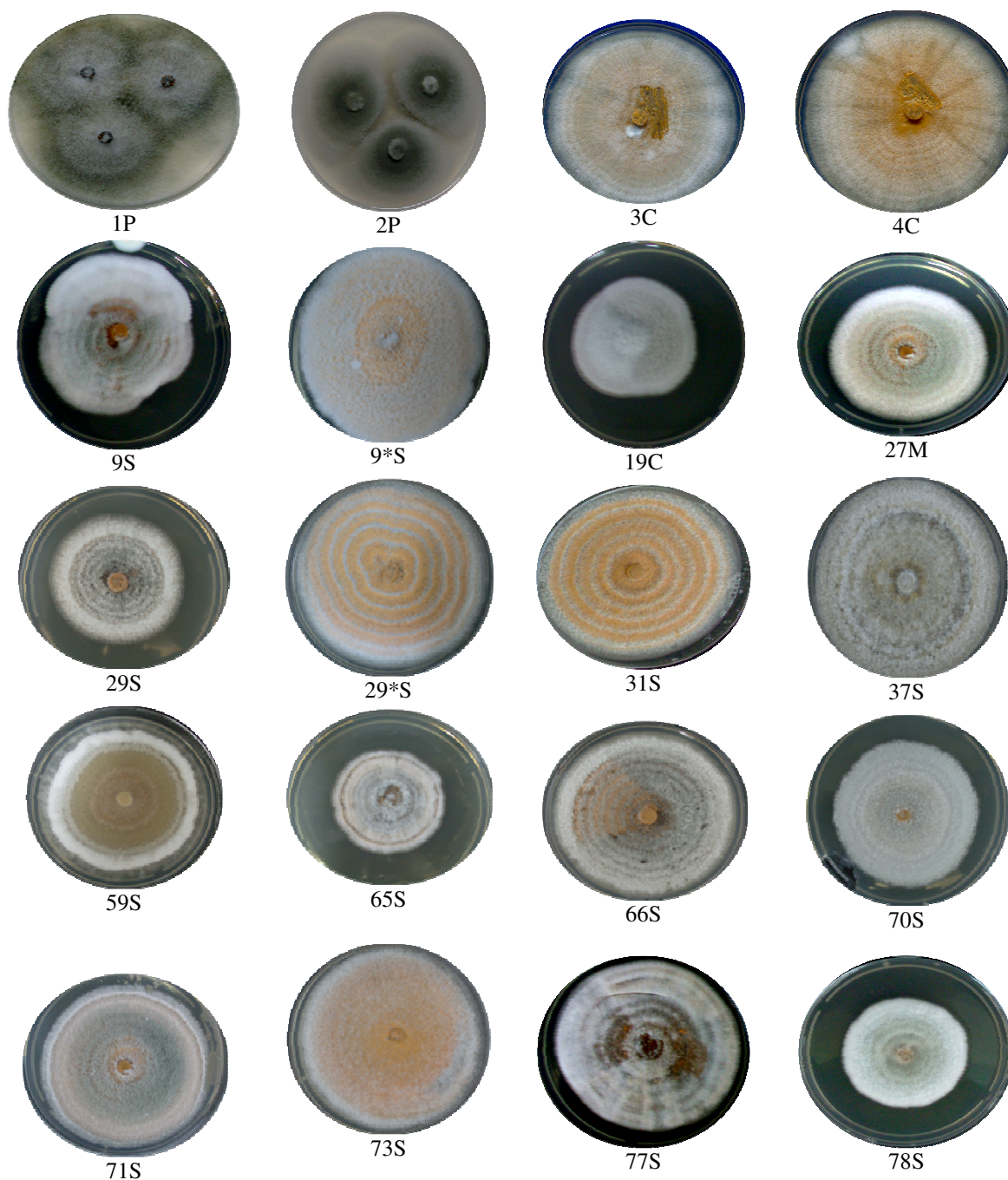


Figura 6. Aspecto das colônias de *Colletotrichum* em meio BDA Difco®. 1P e 2P isolados padrões fornecidos pela Empresa Sakata e correspondem a *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* respectivamente. 9\* e 29\* são isolados idênticos às números correspondentes.

Todos os isolados que apresentam uma coloração no sentido verso apresentaram também um reflexo da coloração no sentido reverso.

O primeiro grupo está composto pelos isolados: 1P, 3C, 4C, 7S, 9S, 13S, 14S, 15S, 16S, 17S, 18S, 20S, 21S, 23S, 24S, 27M, 29S, 31S, 32S, 33S, 35S, 36S, 39S, 42S, 43S, 45S, 47S, 48S, 49S, 50S, 52S, 55S, 56S, 57S, 58S, 59S, 60S, 61S, 62S, 63S, 64S, 65S, 66S, 67S, 68S, 69S, 70S, 71S, 72S, 73S, 74S, 75S, 76S, 77S, 78S, 79S e 80S. Estes isolados apresentam uma coloração laranja cinza, e em algumas colônias laranja em sua totalidade observada pelo fundo da placa. Estes isolados vêm acompanhados de uma massa laranja de esporos, que é responsável pela tonalidade de cor da colônia.

Características deste grupo são semelhantes às características encontradas por Gunnell (1992); Sutton (1992) e Tozze Júnior (2007).

Sutton (1992) descreveu *C. acutatum* como colônias brancas que vão tornando-se cinza escuro e pelo lado reverso apresentam uma coloração rosada. Os conídios são formados em massa apresentando coloração rosa a laranja.

Os isolados padrões 1P e 27M e nossos isolados pertencentes a este grupo. São isolados que tem características semelhantes às determinadas pelos autores, já mencionados. Determinando assim este grupo como *C. acutatum*.

Quando se compara o isolado padrão 1P do pimentão com os isolados da seringueira, podemos dizer que são bastante diferentes quanto sua coloração. O isolado 1P é mais cinza e com pouca massa conidial. Os isolados da seringueira, junto com o isolado 27M de manga (*C. acutatum*) de citros, apresentam uma coloração mais laranja cinza e laranja e com bastante massa conidial. Entre o isolado padrão e os isolados da seringueira, não foi possível determinar que são iguais.

O segundo grupo está composto pelos isolados 2P, 5S, 6S, 8S, 10S, 11S, 12S, 19C, 22C, 25S, 26S, 28S, 30S, 34S, 37S, 38S, 40S, 41S, 44S, 46S, 51S, 53S e 54S. Estes isolados apresentam uma coloração cinza claro.

Características deste grupo são semelhantes às características encontradas por Tozze Júnior (2007).

Sutton (1992) descreve *C. gloeosporioides* como colônias variáveis, de cinza branco à cinza escuro.

Este segundo grupo foi classificado como *C. gloeosporioides*, já que apresenta características semelhantes aos autores já mencionados.

Os isolados padrões 2P e 19M e os isolados da seringueira apresentaram semelhanças entre si.

Embora essas características se ajustem a determinação da espécie de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, não é fator determinante para decidir a espécie, já que a coloração é uma característica que muda constantemente entre isolados e entre eles mesmos. Um exemplo é o isolado 9S e 29S representados na Figura 6. Onde não se mantém uma originalidade da sua cor.

No Brasil, apenas *C. gloeosporioides* foi identificado como causador da antracnose da seringueira (Silveira, 1987, 1992a; Gasparotto *et al.*, 1984; Trindade & Gasparotto, 1982). Pelos resultados obtidos quanto à coloração, pode-se afirmar que mais de uma espécie de *Colletotrichum* esteja causando doença em seringueira, dentre elas *C. acutatum*, cuja ocorrência já é descrita no Sri Lanka Jayasinghe (1997) e na Índia Saha (2002).

### **6.1.2 Velocidade de crescimento de isolados de *Colletotrichum* em seis temperaturas**

Todos os isolados têm como ponto de partida 0,7 cm, referente ao disco de micélio depositado. Partindo das médias gerais do crescimento micelial, obtidas a partir dos valores do diâmetro da colônia, a melhor temperatura para os isolados 19C, 27M, 9S, 77S, 78S e 31S (Tabela 6) foi a 25°C. O isolado 31 embora tenha crescido a 25°C, teve também um bom crescimento a 30°C, como pode ser visualizado na Figura 7.

Tozze Júnior (2006) verificou que isolados causadores de antracnose de solanáceas apresentaram um melhor crescimento micelial na temperatura de 25 °C. Vinnere (2004); Tozze Júnior (2007) e Takahashi (2008) verificaram que *C. gloeosporioides* tem um desenvolvimento maior que *C. acutatum*.

O isolado 31S obtido de folha, mostrou-se bastante adaptado a todas as temperaturas utilizadas, comparado com os outros isolados. Pelas informações já descritas na coloração, o isolado ajustou-se a *Colletotrichum acutatum*.



O isolado padrão 19C de citros pertencente à espécie de *C. gloeosporioides* apresentou um crescimento menor, quando comparado com o isolado padrão 27M de manga pertencente à espécie de *C. acutatum*.

Concluí-se que o fator temperatura para isolados de seringueira não determinou a espécie, já que os isolados padrões pertencentes às duas espécies de *Colletotrichum*, não se mostraram semelhantes as já descritas pelos autores mencionados.

Possivelmente esta variação se deva a que são isolados preservados, e no momento de entrar em contato com o meio. Um pode ficar mais ativo que outro, e desenvolver-se com mais rapidez.

Tabela 6. Diâmetro (cm) da colônia de *Colletotrichum* spp. desenvolvidos em BDA Difco®, fotoperíodo de 12 horas, aos sete dias após a repicagem, em seis temperaturas.

Isolados	Temperaturas (°C)						Médias
	10	15	20	25	30	35	
19C	1,15 dA	2,35 cA	3,02 bC	3,50 aD	1,29 dE	0,70 eC	2,00 d
27M	0,80 eB	1,62 dC	3,49 bB	4,47 aB	1,85 cdD	2,02 cA	2,37 b
9S	0,96 dAB	2,13 cAB	3,14 bC	4,16 aC	2,30 cC	0,70 eC	2,23 c
77S	0,96 eAB	1,95 cB	2,93 bC	4,38 aBC	2,87 bB	1,63 dB	2,45 b
78S	0,90 cB	0,93 cD	2,52 bD	3,72 aD	2,46 bC	0,78 cC	1,88 e
31S	0,80 eB	2,30 cA	4,17 bA	5,34 aA	5,54 aA	1,44 dB	3,26 a
<b>Médias</b>	0,93 f	1,88 d	3,21 b	4,26 a	2,72 c	1,21 e	
<b>CV%</b>	<b>5,64</b>						

Para os fatores temperatura e isolado as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

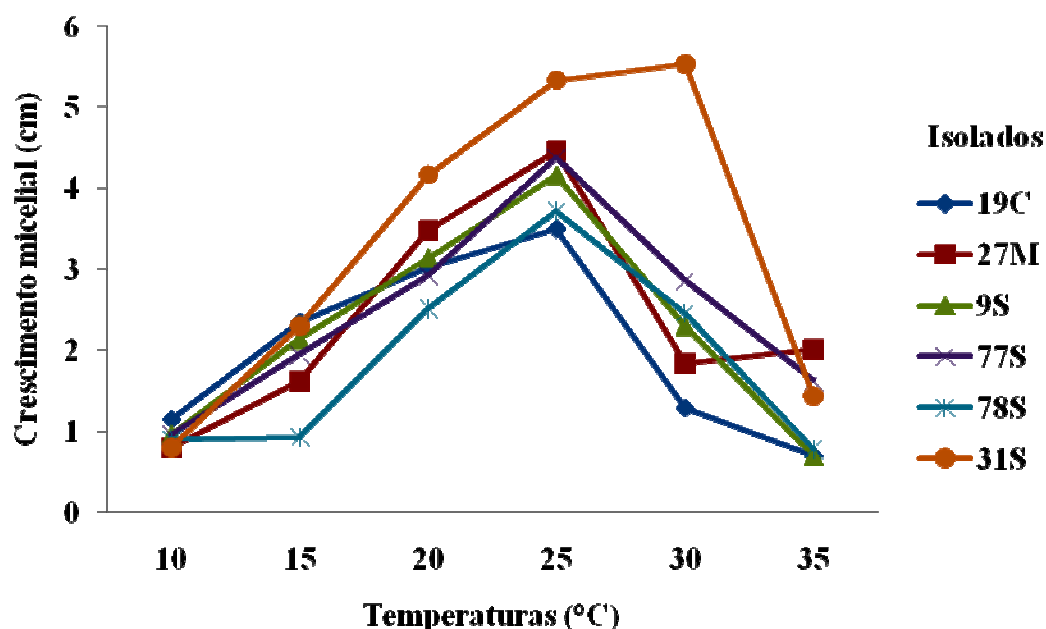


Figura 7. Diâmetro médio (cm) do crescimento micelial de seis isolados de *Colletotrichum* spp. submetidos a seis temperaturas.

Quanto a concentração de esporos nas seis temperaturas (Tabela 7), mostrou-se que as temperaturas de 20 e 25°C foram as melhores na produção de esporos quando comparadas com as médias, um bom detalhamento mostra-se na Figura 8.

Quanto aos isolados, o isolado 27M na temperatura de 25°C mostrou-se superior aos demais isolados.

Quando se compara o crescimento micelial e a concentração de esporos, vê-se que não é fator primordial, já que crescimento não está ligado à quantidade de esporulação. Pode-se ver o isolado 31S que apresentou um bom crescimento na temperatura de 25°C, obteve uma baixa concentração de esporos na temperatura de 25°C, quando comparado com o isolado 27M que teve um crescimento inferior na temperatura de 25°C e uma concentração de esporos superior.

Uma segunda hipótese que pode ser feita é que o isolado 31S cresceu mais e com maior concentração de esporos na temperatura de 30°C, e o isolado 19 foi inferior ao 31 nas duas variáveis analisadas.

Os resultados demonstram que a concentração de esporos não é fator que vem correlacionado com o crescimento micelial.

Tabela 7. Concentração (número de esporos  $\times 10^5$ ) de esporos de isolados de *Colletotrichum* spp. desenvolvidos em meio BDA, fotoperíodo de 24 horas, após seis dias da repicagem nas seis temperaturas.

Isolados	Temperaturas °C						Médias
	10	15	20	25	30	35	
19C	3,50 bA	23,50 bAB	98,50 aA	86,00 aB	2,75 bB	1,50 bA	35,96 a
27M	8,25 dA	39,00 cA	70,00 bB	131,25 aA	0,50 dB	0,50 dA	41,58 a
9S	1,00 bA	24,00 abAB	38,00 aD	11,25 bD	3,00 bB	0,75 bA	13,00 c
77S	6,00 bcA	23,00 bcAB	68,75 aBC	27,00 bD	15,50 bcB	0,25 cA	23,42 b
78S	1,25 bA	14,00 bB	45,50 aCD	52,25 aC	12,50 bB	0,50 bA	21,00 bc
31S	0,25 cA	2,75 cB	43,50 bD	55,50 bC	161,75 aA	0,25 cA	44,00 a
<b>Médias</b>	3,76 d	21,04 c	60,71 a	60,54 a	32,67 b	0,63 d	
<b>CV%</b>	<b>39,49</b>						

Para o fator temperatura e concentração de esporo do isolado as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

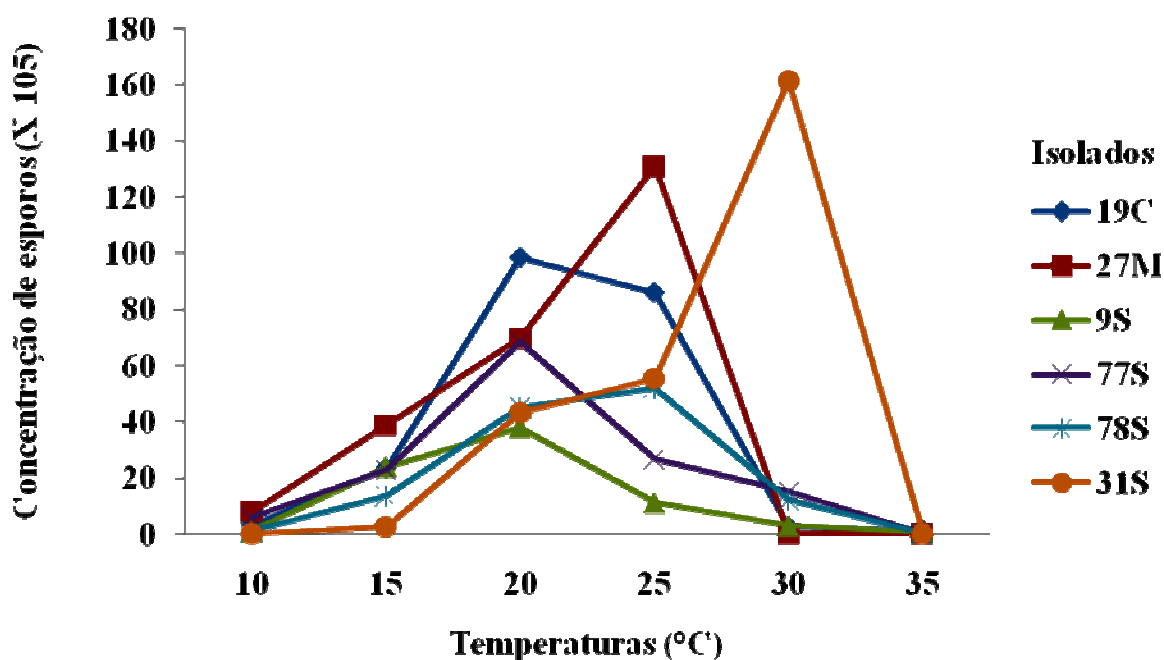


Figura 8. Concentração de esporos ( $\times 10^5$ ) de seis isolados de *Colletotrichum* spp. em seis temperaturas.

## 6.2 Caracterização morfológica

Os resultados mostraram três tipos de formatos, tendo uma média geral para cada tipo (Tabela 8). A média foi de 42% (I), 48% (II) e 10 % (III).

Os isolados padrões 1P, 2P 19C e 27M se ajustam as respectivas espécies. Só que quando se quer identificar os isolados da seringueira, existe uma faixa de sobreposição de dimensões entre as espécies.

Vários autores descrevem estas duas espécies da seguinte forma quanto ao tamanho dos conídios: *C. acutatum* 8 – 16 x 2,5 – 4 µm (Dyko; Mordue, 1979), 8,5 – 10 x 4,5 – 6,0 µm (Sutton, 1980), 8,5 – 16,5 x 2,5 – 4 µm (Sutton, 1992) enquanto que *C. gloeosporioides* 5,0 x 47,5 x 2,5 – 7,5 (Mordue, 1971), 9 – 24 x 3 – 4,5 µm (Sutton, 1980) e 12 – 17 x 3,5 – 6 µm (Sutton, 1992).

Com relação à morfologia dos conídios tem sido utilizada por vários autores (Veras; Gasparoto; Menezes 1997, Furtado, *et al.*, 1999, Tozze Júnior 2006 e 2007, Takahashi 2008, Bueno 2005).

Segundo Sutton (1992), *C. acutatum* apresenta conídios fusiformes com ápices afilados e *C. gloeosporioides* apresenta conídios em forma cilíndrica e com ápices arredondados.

O isolado 3C e 4C de citros apresentaram características que se ajustam à *C. acutatum*, quanto a seu formato e a suas dimensões.

Tendo como base as dimensões e os formatos. Os isolados da seringueira que se ajustam à *C. acutatum* são os seguintes: 9S, 18S, 36S, 60S, 64S, 65S, 68S, 75S, 76S e 77S. Para *C. gloeosporioides* são: 11S, 17S, 29S, 31S, 37S, 51S, 59S, 63S, 66S, 67S, 69S, 70S, 71S, 72S, 73S, 78S, 79S e 80S.

Quando estes isolados são comparados com a caracterização cultural, mostram que só os isolados 9S, 11S, 18S, 36S, 37S, 51S, 60S, 64S, 65S e 68S, coincidem com as características descritas para *C. acutatum* e para *C. gloeosporioides*.

Dentro destes isolados foi grande a variação estudada, dificultando a identificação das espécies.

Este fato tem sido relatado por outros autores e é verdadeiro especialmente para o gênero *Colletotrichum*. Formas intermediárias são comuns principalmente, devido à influência do ambiente (Tozze Júnior, 2006).

Tabela 8. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ), largura ( $\mu\text{m}$ ), Amplitude ( $\mu\text{m}$ ), e formato dos conídios de *Colletotrichum* spp.

Isolados	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Amplitude ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Amplitude ( $\mu\text{m}$ )	Médias	(continua)		
						Formato %		
						I	II	III
<b>1P</b>	12,99 já	(11,1 – 15,25)	3,58 aB	(3,26 – 3,96)	8,28 efghij	100	0	0
<b>2P</b>	12,11 A	(9,69 – 14,47)	2,64 aB	(2,02 – 2,95)	7,37 il	20	75	5
<b>3C</b>	13,62 fghijA	(9,54 – 18,68)	3,70 aB	(3,26 – 4,39)	8,66 defgh	50	20	30
<b>4C</b>	14,09 efghijA	(11,73 – 18,05)	3,81 aB	(2,96 – 4,38)	8,95 cdefg	90	10	0
<b>8S</b>	15,21 bcdefA	(12,79 – 25,05)	3,32 aB	(2,94 -3,82)	9,27 abcdef	10	25	65
<b>9S</b>	14,35 defghijA	(9,8 – 17,67)	3,35 aB	(2,45 – 4,22)	8,85 cdefg	60	35	5
<b>11S</b>	12,29 A	(9,19 – 14,69)	2,66 aB	(2,02 – 2,99)	7,48 hil	0	100	0
<b>17S</b>	11,04 A	(8,22 – 16,06)	2,98 aB	(2,28 – 3,64)	7,01 l	30	70	0
<b>18S</b>	17,07 aA	(15,27 -18,65)	3,23 aB	(2,77 – 3,81)	10,15 ab	100	0	0
<b>19C</b>	13,90 fghijA	(10,60 – 19,43)	3,20 aB	(2,36 – 4,19)	8,55 efghi	35	50	15
<b>27M</b>	12,47 A	(8,92 – 15,22)	3,78 aB	(2,95 – 4,52)	8,13 fghil	90	10	0
<b>29S</b>	15,61 abcdeA	(11,89 – 18,07)	4,14 aB	(3,30 – 4,67)	9,87 abc	15	65	20
<b>31S</b>	14,66 cdefghijA	(12,34 – 17)	4,09 aB	(2,98 – 5,20)	9,37 abcde	20	80	0
<b>36S</b>	13,17 hijA	(9,57 -20,57)	2,80 aB	(2,36 – 3,37)	7,98 ghil	55	40	5
<b>37S</b>	11,12 A	(7,31 -15,05)	2,92 aB	(2,11 – 4,38)	7,02 l	20	80	0
<b>51S</b>	12,70 A	(9,47 – 16,04)	3,56 aB	(2,71 – 4,87)	8,13 fghil	30	70	0
<b>59S</b>	16,83 abA	(13,33 – 24,02)	3,83 aB	(2,52 – 5,20)	10,33 a	20	75	5
<b>60S</b>	14,30 defghijA	(11,91 – 16,78)	3,88 aB	(2,70 – 4,66)	9,09 bcdefg	60	35	5
<b>63S</b>	13,74 fghijA	(11,61 – 16,54)	3,23 aB	(2,46 – 3,79)	8,49 efghi	35	50	15
<b>64S</b>	13,11 ijA	(10,81 – 19,09)	3,41 aB	(2,70 – 4,17)	8,26 efghij	55	25	30
<b>65S</b>	13,71 fghijA	(10,87 – 16,17)	3,13 aB	(2,77 – 3,68)	8,42 efghi	75	10	15
<b>66S</b>	15,23 bcdefA	(12,34 – 18,38)	3,45 aB	(2,80 – 4,42)	9,34 abcde	30	55	15
<b>67S</b>	14,14 defghijA	(8,53 – 17,29)	3,74 aB	(2,60 – 4,47)	8,94 cdefg	20	60	20
<b>68S</b>	13,89 fghijA	(12,27 – 15,94)	3,34 aB	(2,71 – 4,13)	8,61 efgh	50	45	5
<b>69S</b>	13,29 ghijA	(10,40 – 15,58)	3,63 aB	(2,88 – 4,55)	8,46 efghi	30	40	30
<b>70S</b>	14,52 defghijA	(12,15 – 16,32)	3,69 aB	(2,48 – 5,06)	9,11 bcdefg	15	80	5

Tabela 8. Comprimento ( $\mu\text{m}$ ), largura ( $\mu\text{m}$ ), amplitude ( $\mu\text{m}$ ), e formato dos conídios de *Colletotrichum* spp.

Isolados	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Amplitude ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Amplitude ( $\mu\text{m}$ )	Médias	Formato %		
						I	II	III
71S	15,74 abcdeA	(12,6 – 18,89)	3,89 aB	(3,14 – 4,82)	9,82 abcd	35	55	10
72S	13,66 fghijA	(10,68 – 17,23)	3,04 aB	(2,71 – 3,64)	8,35 efghi	45	50	5
73S	14,72 cdefghiA	(10,34 – 20,98)	3,62 aB	(3,03 – 4,41)	9,17 abcdefg	40	55	5
75S	15,81 abcdA	(13,43 – 17,28)	3,89 aB	(3,29 – 4,71)	9,85 abcd	50	35	15
76S	14,52 defghijA	(12,28 – 18,66)	3,23 aB	(2,78 – 3,56)	8,87 cdefg	65	25	10
77S	11,50 A	(8,33 – 14,49)	2,77 aB	(2,12 – 3,27)	7,14 I	65	30	5
78S	16,22 abcA	(13,61 -18,27)	3,43 aB	(2,75 – 3,96)	9,82 abcd	25	75	0
79S	14,96 cdefgA	(12,88 – 16,85)	3,64 aB	(2,88 – 4,42)	9,30 abcdef	30	70	0
80S	14,81 cdefghA	(10,81 – 18,54)	3,74 aB	(2,64 – 4,27)	9,27 abcdef	10	75	15
<b>Médias</b>	14, 03 a		3,44 b			42	48	10
<b>CV%</b>			<b>16</b>					

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Formato: I = < > (ponte agudo, ponte agudo); II = < □ (ponte agudo, arredondado) e III = C □ (arredondado, arredondado).

### 6.3 Caracterização monospórica

As culturas monospóricas foram obtidas a partir de um único conídio (Figura 9) com a finalidade de identificar molecularmente os isolados e verificar se existem diferenças quanto à amplificação da PCR de um isolado para outro. Dados que são discutidos no item 7.6. Na Figura 10 pode-se ver o aspecto da colônia, pertencentes aos seis isolados testados (1P, 2P, 9S, 77S, 78S e 31S).

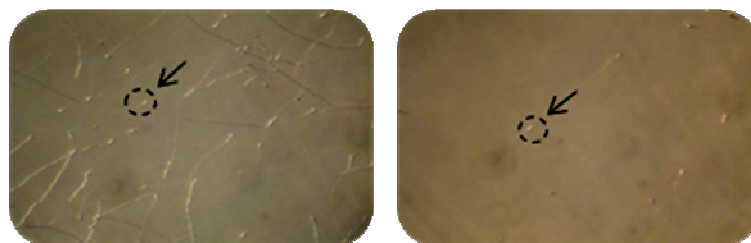


Figura 9. Germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. após o período de incubação, e observados por meio de um estereoscópio. O círculo representa um único conídio presente na placa de Petri.

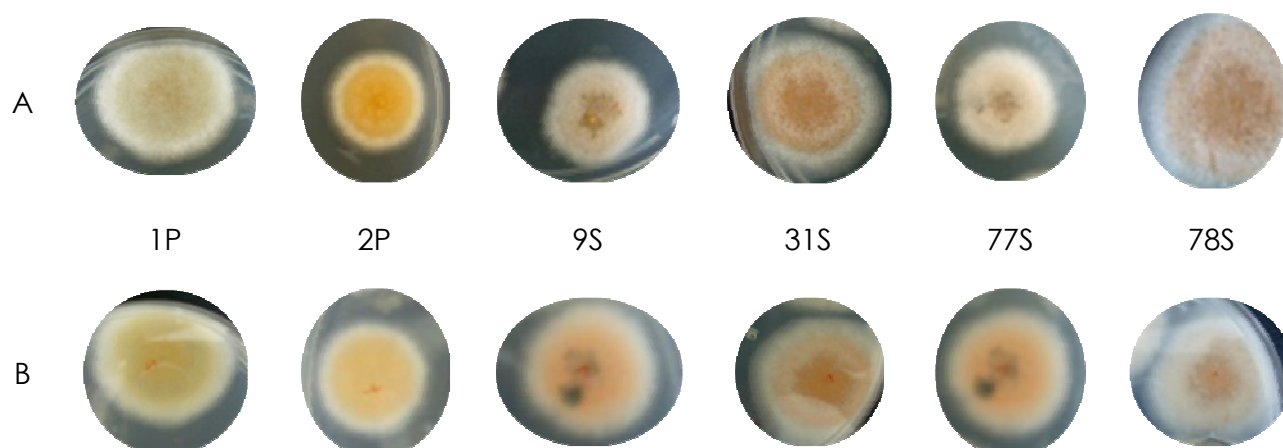


Figura 10. Aspecto das colônias de *Colletotrichum* spp. obtidas a partir de um conídio germinado. A = verso; B = reverso.

Quando se observa a coloração da colônia, vemos que o isolado padrão 1P (*C. gloeosporioides*) é diferente do 2P (*C. acutatum*). Tendo como base os critérios de identificação cultural, eles se ajustam aos critérios mesmos da espécie Sutton (1992).

Enquanto que os isolados da seringueira, quando comparados com os isolados padrões, mostram diferenças entre si. Sendo os isolados mais laranjas que o isolado 2P que é amarelo.

Quando se compara os isolados monospóricos com os multispóricos do ponto de vista da coloração, vemos que as diferenças são poucas.

Segunda Serra (2008), quando se compara os isolados monospóricos com multispóricos não se observou variação expressiva na morfologia da colônia. Só conseguiu observar com dois isolados monospóricos, que mostraram características morfológicas diferentes dos multispóricos.

## 6.4 Caracterização patogênica

### 6.4.1 Caracterização patogênica de folíolos destacados

Todos os isolados foram patogênicos, quando inoculados em folíolos de seringueira (Figura 11). Os Isolados 3C e 4C obtidos de citros foram patogênicos às folhas de seringueira. A testemunha apresentou 0 % de lesão.

Não foi aplicado o teste de comparação porque o f da interação não foi significativo.

O isolado 9S apresentou maior grão de lesão em comparação com os outros tratamentos (Tabela 9).

A incidência foi determinada pela ausência (-) e presença (+) da lesão na folha. O isolado 9S e 78S foram patogênicos nas oito repetições, sendo 4 abaxial e 4 adaxial (Tabela 10).

Isolados de *Colletotrichum* provenientes de citros, mamão, manga, pimentão e seringueira apresentam uma ampla gama de patogenicidade e virulência quando inoculados em frutos de abacate, mamão, maçã, pimentão, folhas de mangueira e folíolos de seringueira (Stradioto, 1992).

Folíolos jovens, 8 a 9 dias após a emissão foliar de seringueira foram suscetíveis a *C. gloeosporioides*.

Para o teste de patogenicidade de folíolo destacado de seringueira demonstra que folíolos de seringueira são suscetíveis a isolados provenientes de Citros e a isolados provenientes da mesma planta.



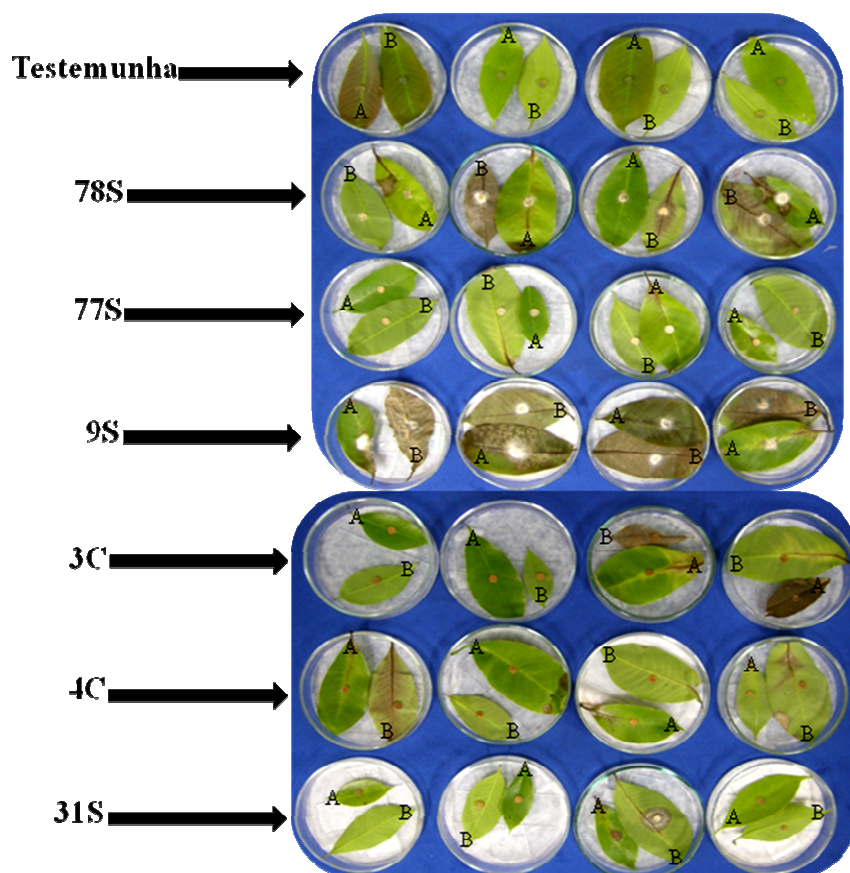


Figura 11. Tratamentos em folíolos destacados. Testemunha e isolados (78S, 77S, 9S, 3C, 4C, e 31S). A = Adaxial e B = Abaxial.

Tabela 9. Patogenicidade em folíolos destacados, na superfície abaxial e adaxial, tendo como inóculo seis isolados e uma testemunha.

Isolado/Hospedeiro	Face do folíolo (%)		
	Abaxial	Adaxial	Médias
4C	26,25	28,75	27,50 bc
3C	26,25	12,50	19,38 bc
9C	98,75	60,00	79,38 a
77C	3,75	7,50	5,63 bc
78C	65,00	27,50	46,25 ab
31C	11,25	7,50	9,38 bc
Testemunha	0,00	0,00	0,00 c
<b>Médias</b>	33,04 a	20,54 a	
<b>CV%</b>		101,53	

Para o fator isolado e fator folha, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10. Incidência e ausência de seis isolados, mas uma testemunha na fase abaxial e adaxial de folíolos destacados.

Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8
Isolado/Hospedeiro	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
3C	-	-	-	-	+	+	+	+
4C	+	+	-	+	+	+	+	+
9S	+	+	+	+	+	+	+	+
77S	-	-	+	-	-	+	-	+
78S	-	+	+	+	+	+	+	+
31S	-	-	-	-	+	+	-	-
Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 6.4.2 Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. pelo método de discos de folíolos de seringueira

A testemunha teve 0% de lesão, quando comparados com os isolados onde todos foram patogênicos (Figura 12).

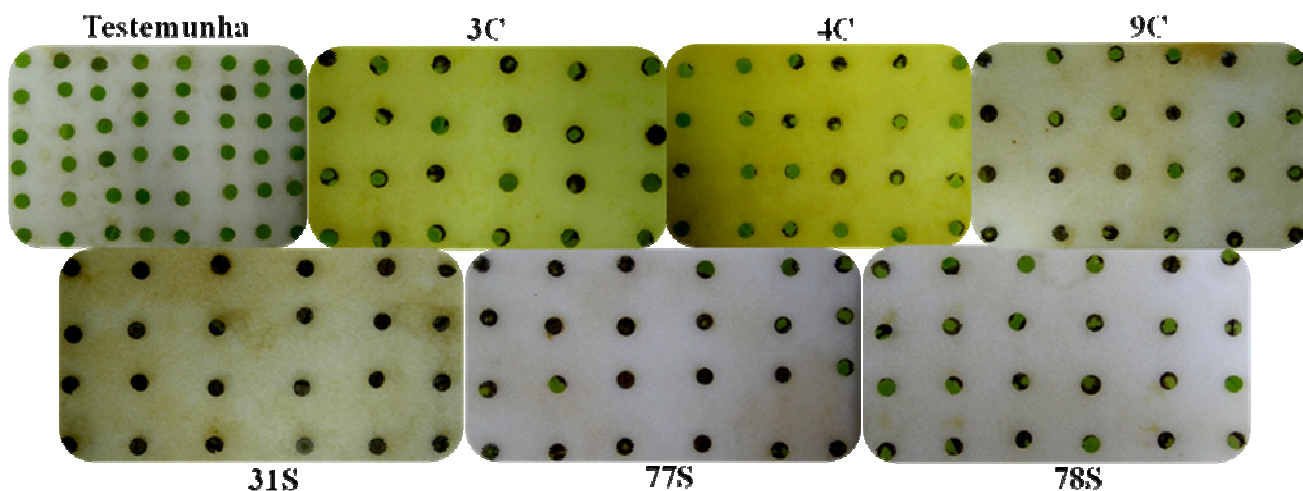


Figura 12. Aspecto de discos de folíolos de seringueira inoculados com esporos de seis isolados de *Colletotrichum* spp. Testemunha e isolados (78S, 77S, 9S, 3C, 4C, e 31S).

Em relação às avaliações feitas, os isolados e as faces dos folíolos abaxial e adaxial foram significativos. Enquanto que a interação não foi significativa (Tabela 11).

O isolado 31S mostrou-se como um isolado bastante agressivo, já que atingiu 100 % da lesão, quando comparados com os outros isolados. Este mesmo isolado foi o que cresceu no teste de temperatura.

A incidência foi determinada pela ausência (-) e presença (+) da lesão no disco de folíolo. O isolado 9S e 77S e 31S mostraram-se como os mais patogênicos nas 24 repetições, sendo 12 abaxial e 12 adaxial (Tabela 12).

O teste foi bastante eficiente para os experimentos com *Colletotrichum* na seringueira. Outros autores verificam a eficiência deste método de inoculação (Xavier, 1997; Kamikoga, 2001; Rios *et al.*, 2001; Souza, 2008).

Tabela 111. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. em discos de folíolos de seringueira, na superfície abaxial e adaxial. Tendo como inoculo seis isolados e uma testemunha.

Isolados	Fase do folíolo (%)		
	Abaxial	Adaxial	Médias
4C	60,00	35,83	47,92 d
3C	50,83	21,25	36,04 d
9S	80,83	61,67	71,25 bc
77S	87,08	72,92	80,00 ab
78S	60,83	49,17	55,00 cd
31S	100,00	100,00	100,00 a
Testemunha	0,00	0,00	0,00 e
<b>Médias</b>	62,80 a	48,69 b	
<b>CV%</b>		<b>48,23</b>	

Para o fator isolado e fator folha, as médias seguidas pela mesma não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 122. Incidência e ausência de lesões de *Colletotrichum* spp. em discos de folíolos de seringueira, inoculados com seis isolados, mas uma testemunha nas superfícies abaxial e adaxial.

Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
do/Hospedeiro	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD
3C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
4C	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
9S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
77S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78S	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Faces do folíolo: abaxial (AB); adaxial (AD).

### 6.5 Suscetibilidade ao fungicida benomyl de isolados de *Colletotrichum* spp.

Os isolados têm como ponto de partida 0,7 cm, referente ao disco de micélio depositado. O isolado padrão 1P pertencente à espécie de *C. gloeosporioides* apresentou uma alta suscetibilidade ao fungicida benomyl em todas as concentrações, quando comparados com os outros isolados. O isolado padrão 2P pertencente à espécie de *C. acutatum* foi menos sensível que o isolado 1P (Tabela 13).

*C. acutatum* é relatado como resistente ao benomyl, enquanto que *C. gloeosporioides* é suscetível ao fungicida (Vinnere, 2004).

Peres (2002) verificou o crescimento micelial de *Colletotrichum* de citros. Isolados de *C. acutatum* da cultura de citros não são completamente inibido, mesmo nas concentrações de 1000 µg/ml. No caso de *C. gloeosporioides*, o crescimento micelial dos isolados sensíveis ao fungicida é reduzido em mais de 90 % na concentração de 0,1 µg/ml, enquanto que aos isolados resistentes apresentam uma redução significativa na área da colônia somente nas concentrações maiores do que 100 µg/ml.

Takahashi (2008) verificou o crescimento dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de atemóia em meio contendo 10 mg/L de fungicida benomyl.

O teste de benomyl para isolados de seringueira, não permitiu descrever a espécie de *Colletotrichum*, já que em todas as concentrações os isolados de *Colletotrichum* cresceram (Tabela 13) (Figura 13). Alguns isolados de *C. gloeosporioides* conseguem crescer em meio de cultura com 1 µg/ml de benomyl (Peres, 2002).

Só que quando se quer comparar entre isolados daria para pensar que o isolado 31S que apresenta uma alta agressividade em velocidade de crescimento e em patogenicidade. Para este teste ele mostra uma suscetibilidade quando comparado com os isolados padrões. O isolado no teste de temperatura e na caracterização morfológica mostrou ser *C. gloeosporioides*.

Concluí-se que dentro da seringueira temos duas espécies que predominam *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Tabela 133. Crescimento micelial de seis isolados de *Colletotrichum* spp. em cinco doses de benomyl.

Isolado/Hospedeiro	Doses ( $\mu\text{g/i.a/ml}$ )					Médias
	0	1	10	100	1000	
9S	4,21 bcA	2,66 aB	2,70 aB	2,67 aB	1,67 aC	2,78 a
77S	4,51 bA	2,66 aB	2,66 aB	2,31 abB	1,31 abC	2,69 a
78S	3,35 dA	2,47 abB	2,49 abB	2,22 bB	1,52 aC	2,41 b
31S	5,46 aA	1,31 cB	1,13 cB	1,13 cB	1,10 bB	2,02 c
1P	5,20 aA	1,57 cB	0,80 cC	0,72 dC	0,70 cC	1,80 d
2P	3,83 cA	2,10 bB	2,10 bB	2,17 bB	1,55 aC	2,35 b
<b>Médias</b>	4,43 a	2,13 b	1,98 bc	1,87 c	1,31 d	
<b>CV%</b>	<b>9,09</b>					

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

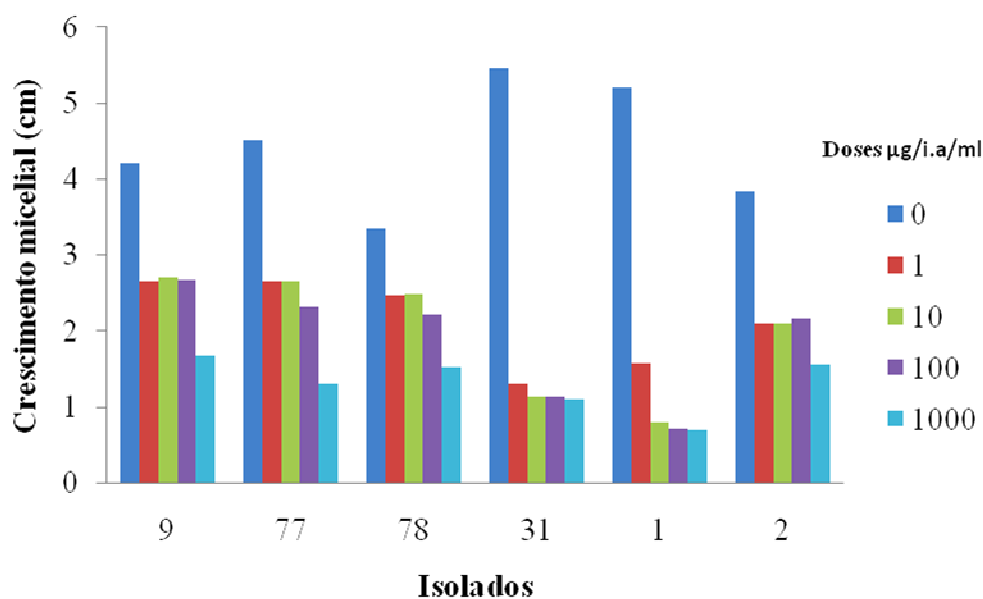


Figura 13. Crescimento micelial de seis isolados de *Colletotrichum* spp. em cinco doses de Benomyl.

Enquanto a concentração de esporos mostrou que a maior produção foi na dose de 1  $\mu\text{g/i.a/mL}$  (Tabela 14). Este fator de concentração não é fator determinante da espécie como já mencionado em parágrafos anteriores.

Tabela 144. Concentração de esporos de seis isolados de *Colletotrichum* spp. em cinco doses de benomyl.

Isolado/Hospedeiro	Concentração de esporos ( $\times 10^5$ ) / $\mu\text{g/i.a/ml}$					Médias
	0	1	10	100	1000	
9S	2,90 cA	1,95 bB	1,28 bBC	1,23 aC	0,38 abD	1,55 b
77S	5,43 bA	1,45 bB	1,30 bB	0,40 bcC	0,23 abC	1,76 b
78S	5,20 bA	4,23 aB	2,08 aC	0,95 abD	0,88 aD	2,67 a
31S	0,50 dA	0,20 cA	0,00 cA	0,20 cA	0,03 bA	0,19 c
1P	0,65 dA	0,18 cA	0,00 cA	0,05 cA	0,00 bA	0,18 c
2P	7,05 aA	1,40 bB	0,60 bcC	0,13 cC	0,13 bC	1,86 b
<b>Médias</b>	3,62 a	1,57 b	0,88 c	0,49 d	0,27 d	
<b>CV%</b>	<b>26,06</b>					

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 6.6 Identificação Molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.

O par de *pimers* específicos para a espécie de *C. acutatum* (Calnt2 + ITS4) amplificaram fragmentos de DNA para determinados isolados, permitindo assim a identificação de dois isolados da cultura de citros (3C e 4C) e quarenta e seis isolados da seringueira (Figura 14).

Este é o primeiro relato de *Colletotrichum acutatum* no Brasil causando antracnose na seringueira. Sendo também relatada no Sri Lanka Jayasinghe (1997) e na Índia Saha (2002).

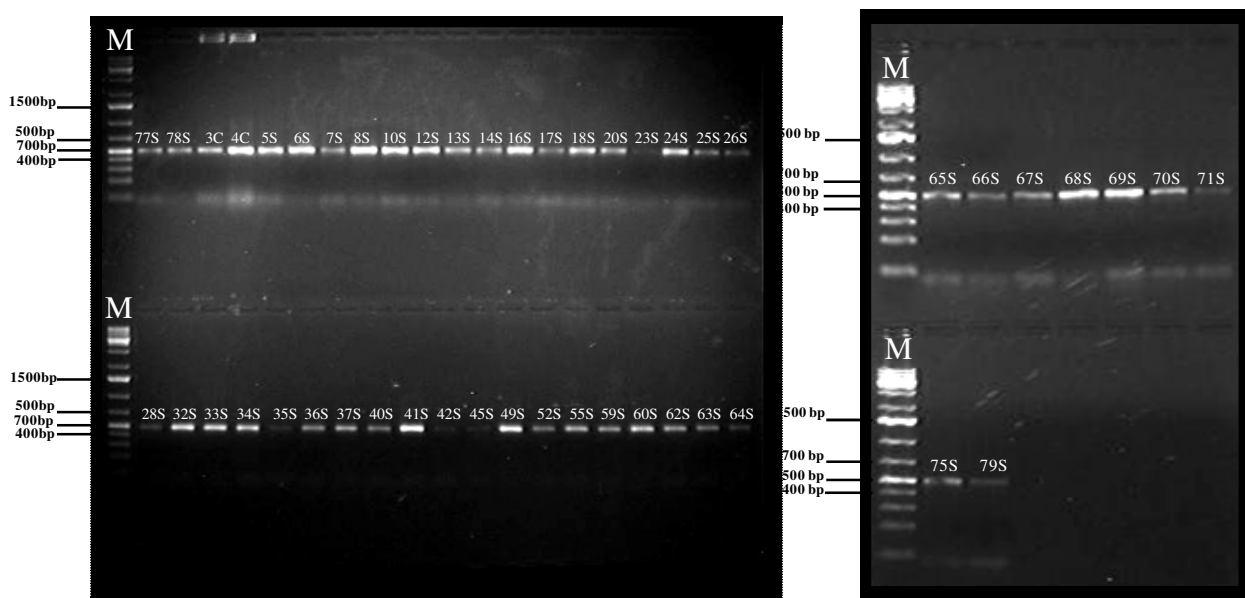


Figura 14. Amplificação por PCR dos isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com primer específicos de *C. acutatum*. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder.

O par de *primers* específico para *C. gloeosporioides* (CgInt + ITS4) foi positivo para oito isolados pertencentes à cultura da seringueira (Figura 15). O isolado 31S apresentou características semelhantes à espécie de *C. gloeosporioides* nos testes de temperatura, caracterização morfológica e patogenicidade. Os resultados foram similares quando se realizou a identificação molecular.

Os resultados na identificação de *C. gloeosporioides* corroboram ainda ao relato de Silveira (1987), que descreve à espécie como causadora de antracnose da seringueira.



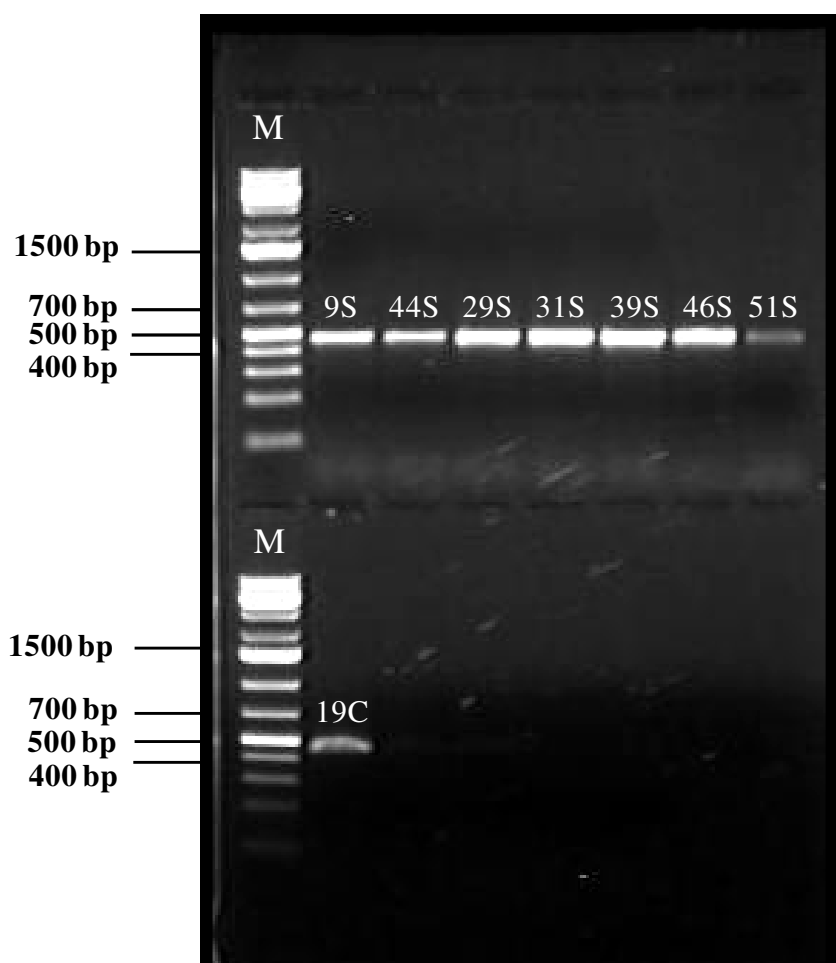


Figura 15. Amplificação por PCR dos isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com primer específicos de *C. gloeosporioides*. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder.

O par de *primers* específico para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* mostraram-se positivos para seis isolados de culturas monospóricas, onde os isolados 1P, 9S e 31S pertencem às espécies de *C. gloeosporioides* e os isolados 2P, 77S e 78S à *C. acutatum* (Figura 16).

Os pares de *primers* específicos amplificaram da mesma forma culturas monospóricas e culturas multispóricas.

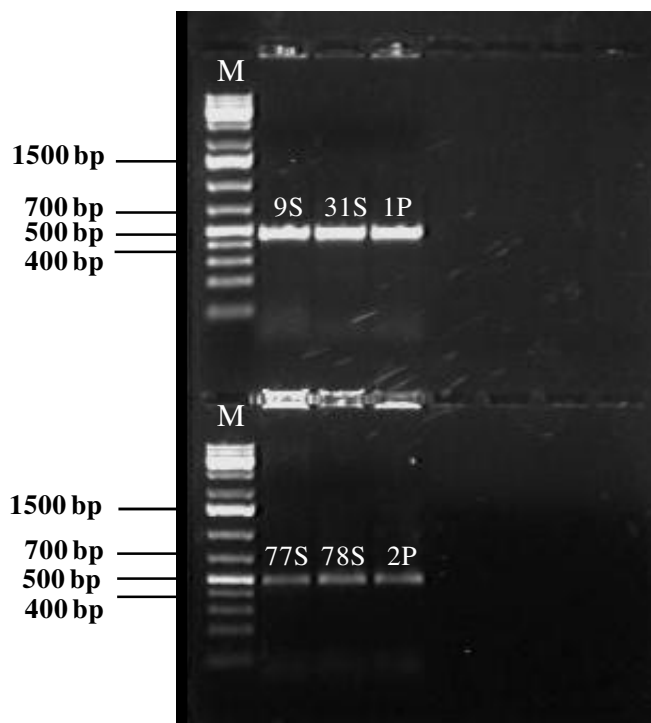


Figura 16. Amplificação por PCR de isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp., com *primers* específicos de *C. gloeosporioides* (9S, 31S, 1P) e *C. acutatum* (77S, 78S, 2P). M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder.

Os primers ITS foram utilizados com objetivo de sequenciar a região ITS. Trabalho que será continuado no doutorado. Até o momento obteve-se oitenta isolados multispóricos e seis isolados monospóricos amplificados (Figura 17) e (Figura 18) e devidamente conservados.

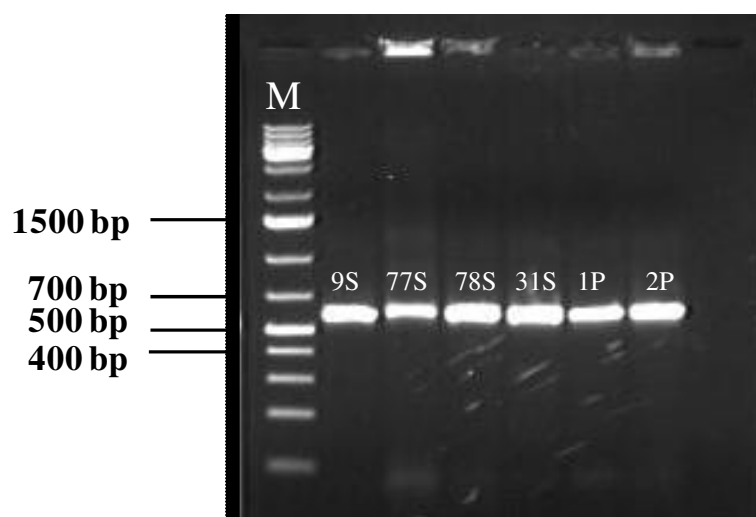


Figura 17. Amplificação por PCR dos isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com *primers* ITS. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder.

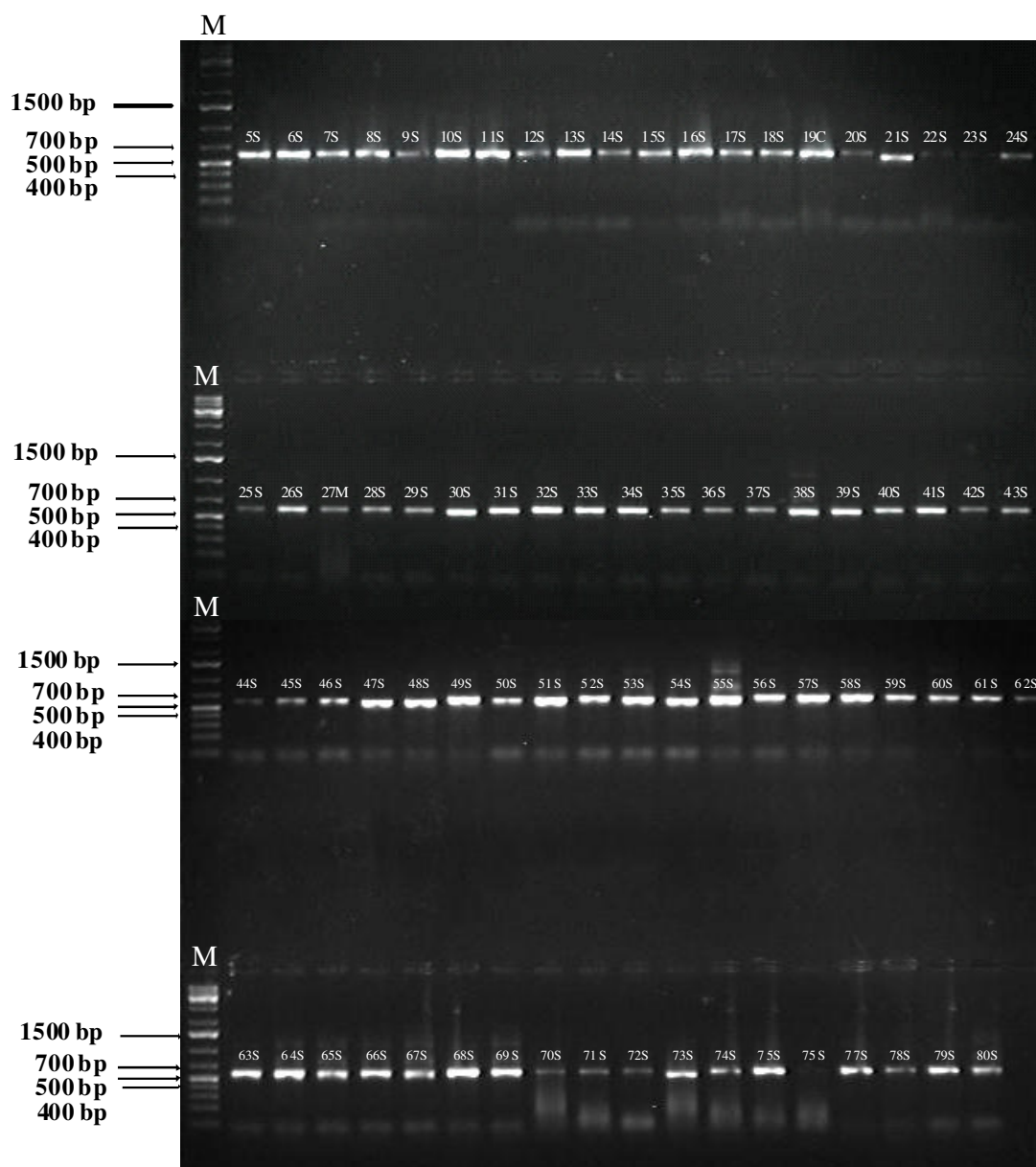


Figura 18. Amplificação por PCR dos isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos em diferentes localidades de São Paulo, com *primers* ITS. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder.

No presente trabalho foram obtidos mediante interpolação gráfica para as amostras multispóricas e monospóricas de *C. acutatum* fragmentos de 500 pb e 470 pb para *C. gloeosporioides* (Figura 19), corroborando aos de Tozze Júnior (2007) que obteve fragmentos de 490 pb para isolados de pimentão com *primers* específicos de *C. acutatum*, e 450 pb para *C. gloeosporioides*.

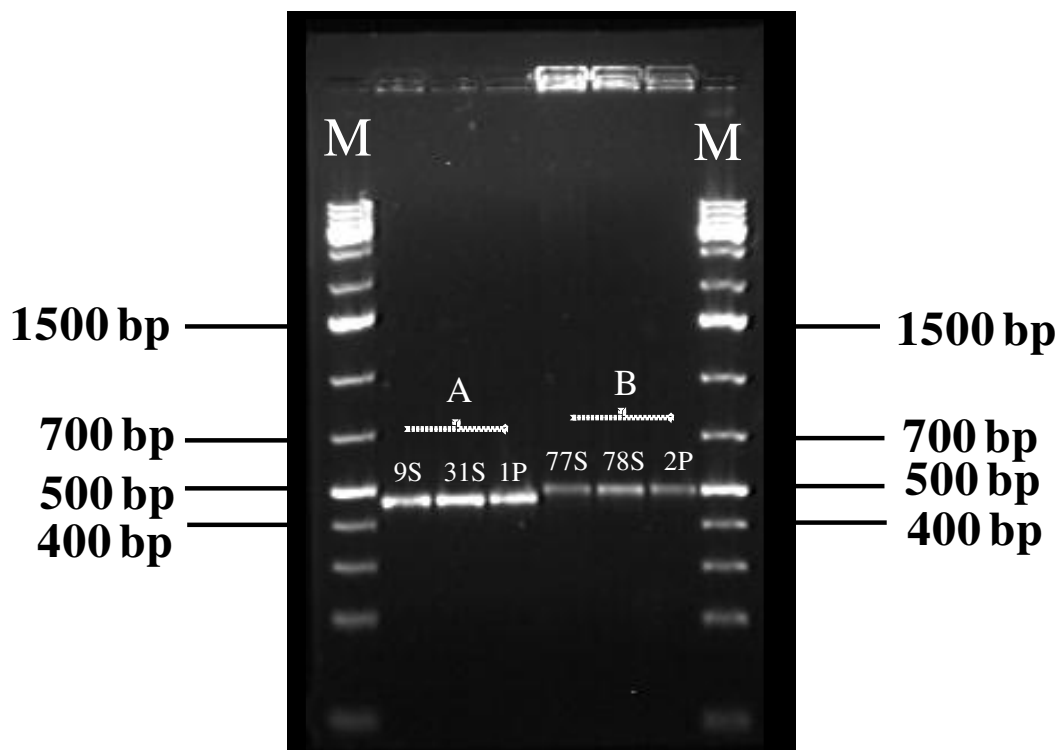


Figura 19. Diferenciações de bandas de *Colletotrichum gloeosporioides* (A) e *C. acutatum* (B) a partir de PCR. M: Marcador 1kb Plus DNA Ladder.

### 6.7 Testes com extratos aquosos

Os resultados obtidos com extratos aquosos foram negativos, já que os mesmos favoreceram o crescimento micelial do isolado 12S (*C. acutatum*), quando comparados com a testemunha (Tabela15) e (Figura 20). Só o extrato 8 (Pimenta do reino) na doses de 10000  $\mu\text{g/i.a/mL}$  conseguiu reduzir o crescimento em relação aos outros extratos.

Determinou-se que para isolados de seringueira, o uso de extratos aquosos como ferramenta alternativa no controle não é efetiva quando se utilizam na concentração de 5% do extrato aquoso.

Tabela 155. Crescimento micelial (cm) do isolado 15S de *Colletotrichum* spp., submetido a oito extratos aquosos, em seis concentrações.

Extratos	Doses ( $\mu\text{g/i.a/mL}$ )						Médias
	0	1	10	100	1000	10000	
1 (Santa Barbara)	4,70 aC	8,04 aA	7,28 abAB	6,91 aAB	6,77 abAB	5,79 bBC	6,58 ab
2 (Eucalipto citrodora)	4,70 aC	7,97 aA	8,37 aA	5,86 abBC	8,37 aA	7,21 abAB	7,08 ab
3 (Catiguá)	4,70 aB	7,59 aA	7,25 abA	7,47 aA	8,12 aA	8,50 Aa	7,27 a
4 (Pau-de-ervilha)	4,70 aB	7,42 aA	7,30 abA	7,47 aA	7,24 abA	6,00 bAB	6,69 ab
5 (Nim)	4,70 aB	5,19 bB	7,51 aA	7,35 aA	7,81 aA	7,84 aA	6,73 ab
6 (Santa maria)	4,70 aB	4,99 bB	7,33 abA	5,97 abAB	5,64 bcB	5,94 bAB	5,76 c
7 (Coentro)	4,70 aB	4,34 bB	7,22 abA	7,27 aA	7,29 abA	8,07 aA	6,48 b
8 (Pimenta do reino)	4,70 aBC	6,93 aA	5,63 bAB	4,87 bBC	4,78 cBC	3,47 cC	5,06 c
<b>Médias</b>	4,70 c	6,56 b	7,24 a	6,65 b	7,00 ab	6,60 b	
<b>CV%</b>	<b>13,73</b>						

Para o fator extratos e fator doses as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

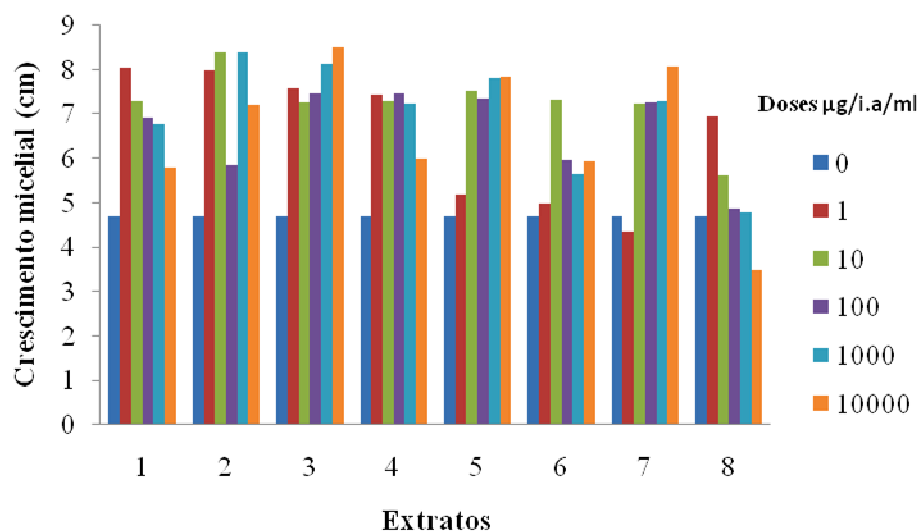


Figura 20. Crescimento micelial do isolado 15S, em seis concentrações e oito extratos aquosos.

## 6.8 Testes com fungicidas

Todos os isolados têm como ponto de partida 0,7 cm, referente ao disco de micélio depositado.

O isolado 9S (*C. gloeosporioides*) em relação as médias o melhor fungicida foi o 3, e em relação às doses a de 1000 µg/i.a/mL. Em relação a cada fungicida dentro das doses os melhores fungicidas que atingiram o controle 100 % foram os seguintes: na dose de 10 µg/i.a/mL (2 e 3); na dose de 100 µg/i.a/mL (1, 2, 3, 8 e 9) e na dose de 1000 µg/i.a/mL (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9) (Tabela 16) e (Figura 21).

Tabela 166. Crescimento micelial do isolado 9S de *C. gloeosporioides*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

Isolado 9S	Doses (µg/i.a/mL)					Médias
	Fungicida	0	1	10	100	
1 (Flutriafol)	4,06 aA	2,61 cdB	1,71 cC	0,70 dD	0,70 bD	1,96 d
2 (Tebuconazol)	4,06 aA	1,32 fB	0,70 dC	0,70 dC	0,70 bC	1,50 e
3 (Epoconazol+Piraclostrobina)	4,06 aA	1,15 fB	0,70 dC	0,70 dC	0,70 bC	1,46 e
4 (Clorotalonil+Tiofanato-metílico)	4,06 aA	3,98 bA	2,01 bB	1,66 cC	0,70 bD	2,48 c
5 (Captana)	4,06 aAB	4,31 aA	3,92 aB	1,56 cC	0,70 bD	2,91 b
6 (Mancozebe)	4,06 aA	4,13 abA	3,78 aB	2,90 aC	0,70 bD	3,11 a
7 (Carbendazim)	4,06 aA	2,21 eB	1,81 bcC	2,24 bB	1,60 aC	2,38 c
8 (Azoxistrobina+Ciproconazol)	4,06 aA	2,35 deB	1,56 cC	0,70 dD	0,70 bD	1,87 d
9 (Propiconazol)	4,06 aA	2,81 cB	0,99 dC	0,70 dD	0,70 bD	1,85 d
<b>Médias</b>	4,06 a	2,76 b	1,91 c	1,32 d	0,80 e	
<b>CV%</b>						<b>6,95</b>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

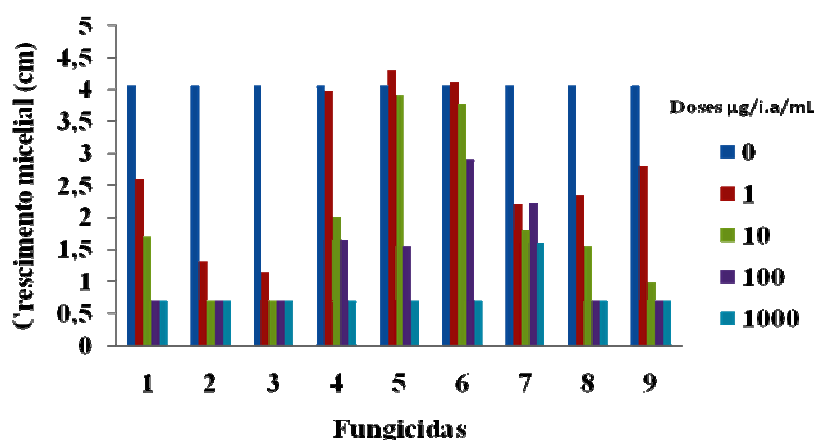


Figura 21. Inibição do crescimento micelial do isolado 9S de *C. gloeosporioides*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

No isolado 77S (*C. acutatum*) em relação as médias o melhor fungicida foi o 8, e em relação às doses a de 100  $\mu\text{g}/\text{i.a}/\text{mL}$ . Em relação a cada fungicida dentro das doses os melhores fungicidas que atingiram o controle 100 % foram os seguintes: na dose de 1  $\mu\text{g}/\text{i.a}/\text{mL}$  (8); na dose de 10  $\mu\text{g}/\text{i.a}/\text{mL}$  (1, 2 e 3); na dose de 100  $\mu\text{g}/\text{i.a}/\text{mL}$  (1, 2, 3, 6, 8 e 9) e na dose de 1000  $\mu\text{g}/\text{i.a}/\text{mL}$  (1, 2, 3, 8 e 9) (Tabela 17) e (Figura 22).

Tabela 177. Crescimento micelial do isolado 77S de *C. acutatum*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

Isolado 77S	Doses ( $\mu\text{g}/\text{i.a}/\text{mL}$ )					Médias	
	Fungicida	0	1	10	100		1000
1 (Flutriafol)		3,75 aA	2,88 bB	0,70 cC	0,70 cC	0,70 cC	1,75 c
2 (Tebuconazol)		3,75 aA	1,29 dB	0,70 cC	0,70 cC	0,70 cC	1,43 d
3 (Epoconazol+Piraclostrobina)		3,75 aA	1,06 deB	0,70 cB	0,70 cB	0,70 cB	1,382 d
4 (Clorotalonil+Tiofanato-metílico)		3,75 aA	3,52 aA	1,58 bB	0,87 bcC	1,32 bB	2,21 b
5 (Captana)		3,75 aA	2,14 cB	3,59 aA	1,30 bC	1,54 abC	2,46 a
6 (Mancozebe)		3,75 aA	3,27 abB	3,70 aA	0,70 cD	1,88 aC	2,66 a
7 (Carbendazim)		3,75 aA	1,07 deD	1,93 bBC	2,08 aB	1,56 abC	2,08 b
8 (Azoxistrobina+Ciproconazol)		3,75 aA	0,70 eB	0,82 cB	0,70 cB	0,70 cB	1,33 d
9 (Propiconazol)		3,75 aA	1,17 dB	1,05 cBC	0,70 cC	0,70 cC	1,47 d
<b>Médias</b>		3,75 a	1,90 b	1,64 c	0,94 e	1,09 d	
<b>CV%</b>							<b>12,57</b>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

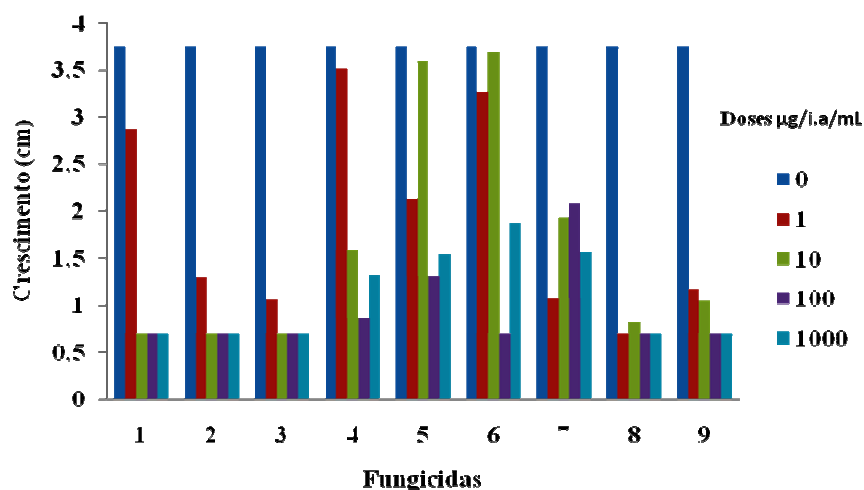


Figura 22. Crescimento micelial do isolado 77S de *C. acutatum*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

No isolado 78S (*C. acutatum*) em relação as médias o melhor fungicida foi o 2, e em relação às doses a de 1000 µg/i.a/mL. Em relação a cada fungicida dentro das doses os melhores fungicidas que atingiram o controle 100 % foram os seguintes: na dose de 10 µg/i.a/mL (2, 3, 4 e 9); na dose de 100 µg/i.a/mL (1, 2, 3, 8 e 9) e na dose de 1000 µg/i.a/mL (1, 2, 3, 6, 8 e 9) (Tabela 18) e (Figura 23).

Tabela 188. Crescimento micelial do isolado 78S de *C. acutatum*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

Isolado 78S	Doses (µg/i.a/mL)					Médias
	0	1	10	100	1000	
1 (Flutriafol)	3,85 aA	2,55 cB	1,59 bC	0,70 dD	0,70 cD	1,88 d
2 (Tebuconazol)	3,85 aA	1,26 dB	0,70 dC	0,70 dC	0,70 cC	1,44 e
3 (Epoconazol+Piraclostrobina)	3,85 aA	1,35 dB	0,70 dC	0,70 dC	0,70 cC	1,46 e
4 (Clorotalonil+Tiofanato-metílico)	3,85 aA	3,38 bB	0,70 dE	1,49 cC	1,23 bD	2,13 c
5 (Captana)	3,85 aA	3,99 aA	3,12 aB	1,39 cC	1,33 abC	2,74 a
6 (Mancozebe)	3,85 aA	3,53 bB	0,98 cdD	2,79 aC	0,70 cE	2,37 b
7 (Carbendazim)	3,85 aA	2,39 cB	1,72 bC	2,45 bB	1,61 aC	2,40 b
8 (Azoxistrobina+Ciproconazol)	3,85 aA	2,31 cB	1,22 cC	0,70 dD	0,70 cD	1,76 d
9 (Propiconazol)	3,85 aA	1,53 dB	0,70 dC	0,70 dC	0,70 cC	1,50 e
<b>Médias</b>	3,85 a	2,48 b	1,27 c	1,29 c	0,93 d	
<b>CV%</b>						<b>7,66</b>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



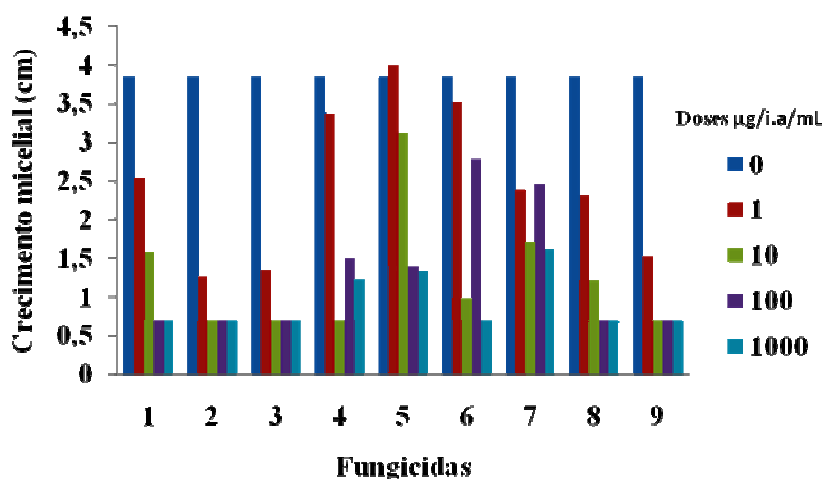


Figura 23. Crescimento micelial do isolado 78S de *C. acutatum*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

No isolado 31 (*C. gloeosporioides*) em relação as médias o melhor fungicida foi o 9, e em relação às doses a de 100 µg/i.a./mL. Em relação a cada fungicida dentro das doses os melhores fungicidas que atingiram o controle 100 % foram os seguintes: na dose de 10 µg/i.a./mL (4 e 9); na dose de 100 µg/i.a./mL (1, 2, 3, 4, 6 e 9) e na dose de 1000 µg/i.a./mL (1, 2, 3, 8 e 9) (Tabela 19) e (Figura 24).

Tabela 19. Crescimento micelial do isolado 31S de *C. gloeosporioides*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

Isolado 31S	Doses (µg/i.a./mL)					Médias
	0	1	10	100	1000	
1 (Flutriafol)	5,46 aA	3,70 bB	1,83 cC	0,70 bD	0,70 cD	2,48 c
2 (Tebuconazol)	5,46 aA	2,22 dB	0,83 dC	0,70 bC	0,70 cC	1,98 ef
3 (Epoconazol+Piraclostrobina)	5,46 aA	3,01 cB	0,99 dC	0,70 bC	0,70 cC	2,17 de
4 (Clorotalonil+Tiofanato-metílico)	5,46 aA	3,73 bB	0,70 dC	0,70 bC	0,98 cC	2,31 cd
5 (Captana)	5,46 aA	5,12 aA	3,90 aB	1,19 abD	1,99 bC	3,53 a
6 (Mancozebe)	5,46 aA	5,18 aA	4,23 aB	0,70 bD	2,57 aC	3,63 a
7 (Carbendazim)	5,46 aA	1,81 dB	1,11 dC	0,98 bC	1,01 cC	2,07 def
8 (Azoxistrobina+Ciproconazol)	5,46 aA	4,10 bB	2,79 bC	1,63 aD	0,70 cE	2,94 b
9 (Propiconazol)	5,46 aA	1,89 dB	0,70 dC	0,70 bC	0,70 cC	1,89 f
<b>Médias</b>	5,46 a	3,42 b	1,90 c	0,89 e	1,12 d	
<b>CV%</b>						<b>11,37</b>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

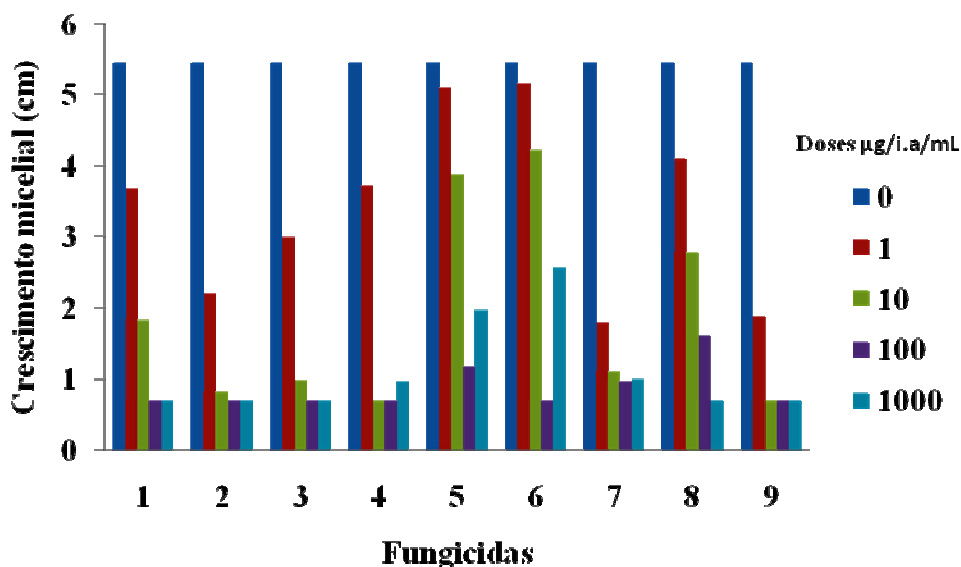


Figura 24. Crescimento micelial do isolado 31S de *C. gloeosporioides*, pelo uso de nove fungicidas em cinco concentrações.

Com base na análise estatística efetuada para cada isolado, os fungicidas que controlaram em cada situação na dose de 1000 µg/i.a./mL foram: Flutriafol, Tebuconazol, Epoxiconazol + Piraclostrobina, Azoxistrobina + Ciproconazol e Propiconazol. Estes permitiram o controle 100 % dos quatro isolados que pertencem as espécies de *C. acutatum* (77 e 78) e *C. gloeosporioides* (9 e 31).

Furtado & Silveira (1990) recomendaram para o controle da antracnose no painel de sangria os seguintes fungicidas: Chlorothalonil, Tiofanato metílico + Chlorothalonil e Benomyl.

Bernardes *et al.* (1995) recomendaram para o controle da antracnose do painel de sangria os seguintes fungicidas: Chlorothalonil + Tiofanato metílico, Zineb, Chlorothalonil, Propiconazole e Tebuconazole.

Furtado (2008) recomenda aplicações para o controle da antracnose, em viveiro e jardins clonais, com fungicidas à base de Chlorotalonil ou Oxicloreto de cobre.

Poucos são os trabalhos realizados com o controle da antracnose da seringueira. Este trabalho permitiu a avaliação de novos fungicidas e a sua eficiência no controle de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ *Colletotrichum acutatum* é uma nova espécie causadora de antracnose na seringueira;
- ✓ A temperatura ótima para crescimento dos isolados provenientes de seringueira foi 25 °C;
- ✓ A coloração da colônia não é critério para determinar uma espécie;
- ✓ A concentração de esporos não é fator que vem correlacionado com o crescimento micelial;
- ✓ Houveram diferenças patogênicas entre as espécies causadoras de antracnose na seringueira;
- ✓ A sensibilidade ao fungicida benomyl não foi eficiente para diferenciar as espécies de *Colletotrichum* em seringueira;
- ✓ A inibição do crescimento micelial com extratos aquosos foi nula;
- ✓ A identificação molecular mediante primers específicos permitiram identificar 46 isolados para *C. acutatum* e 8 para *C. gloeosporioides*;

- ✓ Não existiu diferença na identificação molecular entre culturas monospóricas e multispóricas;
- ✓ Os fungicidas Flutriafol, Tebuconazol, Epoxiconazol + Piraclostrobina, Azoxistrobina + Ciproconazol e Propiconazol foram eficientes no controle *in vitro* de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons/](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons/)>. Acesso em: 12/08/2008.

BALARDIN, R. S.; RODRIGUES, J. C. V. Sensibilidade 'in vitro' de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas sistêmicos e protetores. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 494-497, 1994.

BERNARDES, M.S. *et al.* **Manual de sangria da seringueira**. Bridgestone/Firestone, São José do Rio Preto, p. 17, 1995

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

CARPENTER, J. B; STEVENSON, J. A. A secondary leaf spot of the Hevea rubber tree caused by *Glomerella cingulata*. **Plant Disease Reporter**, v. 38, n. 7, p. 494-499, 1954.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 1, p. 19-21, 1983.

DIAS, M. S. C.; PERES, N. A. R.; SOUZA, N. L. Efeito de fungicida 'in vitro' no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da queda prematura de frutos jovens em laranja Pêra (*Citrus sinensis*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 355, 1995.

DYKO, B. J.; MORDUE, J. E. M. *Colletotrichum acutatum*. **CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. Kew, n. 630, p. 1-2, 1979.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **O setor produtivo da borracha natural**. edição May-June, 2007. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25/08/2009

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, MG: p.570, 1989.

FREEMAN, S. *et al.* Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 6, p. 586-592, 2001.

FREEMAN, S. *et al.* Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 608-614, 2000.

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

FURTADO, E.L. Doenças das folhas e do caule da seringueira. In: ALVERENGA, A.P.; FERREIRA DE SANTANA DO CARMO, C.A: Seringueira. Viçosa, EPAMIG, 2008. p. 499-534.

FURTADO, E. L. *et al.* Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 3, p. 222-228, 1999.

FURTADO, E.L; SILVEIRA, A.P. **Doenças do painel de sangria da seringueira**. In: BERNARDES, M.S. Sangria da seringueira. ESALQ/USP: FEALQ, Piracicaba, 1990. p. 111-125.

FURTADO, E. L.; SILVEIRA, A. P. Doenças da seringueira em viveiros e jardins clonais e seu controle. In: MEDRADO, M. J. S. et al. **Formação de mudas e plantio de seringueira**. Piracicaba: ESALQ, 1992. p. 52-64.

FURTADO, E. L.; TRINIDADE, D. R. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 559-569.

GASPAROTTO, L. *et al.* **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CPAA, 1997. 168 p.

GASPAROTTO, L. *et al.* **Reabilitação de seringais de cultivo da Amazônia**. Manaus, EMBRAPA-CNPSD, 1985. 27p.

GASPAROTTO, L.; RODRIGUES, T. D.; MARTINS, H. **Doenças da seringueira**. Manaus: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê, 1984. p. 24-34.

GUNNEL, P. S.; Gubler, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, Lancaster, v. 84, n. 2, p. 157-165, 1992.

JAYASINGHE, C. K.; FERNANDO, T. H. P. S.; PRIYANKA, U. M. S. *Colletotrichum acutatum* is the main cause of *Colletotrichum* leaf disease of rubber in Sri Lanka. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, p. 53-56, 1997.

JOHN, K. P. A hitherto undescribed leaf disease of hevea rubber caused by a species of *Colletotrichum*. **J. Rubber Res. Inst. Malaya**, Kuala Lumpur, v. 14, p. 11-19, 1952.

KAMIKOGA, A. T. M. **Método da folha destacada para avaliar resistência da soja ao oídio**. 2001. 86 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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

MARTINS, D. O clima da região de Botucatu. In: ENCONTRO DE ESTUDOS SOBRE A AGROPECUÁRIA NA REGIÃO DE BOTUCATU, 1989, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 1989. p. 8-19.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 23-24, 2002.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997. 106 p.

MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical crops. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, United Kingdom: CAB international, p. 269-288. 1992a.

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, 1992b.

MORDUE, J. E. M. *Colletotrichum gloeosporioides*: CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, n. 315, 1971.

NENE, Y. L.; THAPLIYAL, P. N. **Systemic fungicides**: fungicides in plant disease control. Oxford & IBH Publishing Co. 2nd ed. New Delhi, p. 507, 1979.

PACOLA, A. A. **Transformações e neogênese de minerais em um latossolo vermelho escuro por ação antrópica de cultivo e adição química**. 1997. 177f. Tese (Livre Docência em Geologia Agrícola)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

PERES, N. A. R. **Modelo de previsão e controle da podridão floral dos citros causada por *Colletotrichum acutatum***. 2002. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.



PETCH, T. Description of new Ceylon fungi. Annual report of botanical gardens, Peradeniya, 3: 1-10, 1906.

REIS, D. M. L. **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro**. Belém: EMBRAPA, 1999.

RIOS, G. P.; ANDRADE, E. M.; COSTA, J. L. S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens do feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, Goiás, v. 26, p. 28-133, 2001.

SAHA, T. *et al.* Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycol. Res.** Kerala, India, v. 106, n. 20, p. 215-221, 2002.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Recife, PE, v. 34, n. 2, p. 113-120, 2008.

SILVEIRA, A. P.; CARDOSO, R. M. G. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em Seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, n. 1/2:19, 1987. Resumo.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L.; LOPES, M. E. B. M. **Antracnose: nova doença do painel de sangria da Seringueira da seringueira**. São Paulo: Instituto Biológico, v. 18, p. 196-200, 1992a.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L.; LOPES, M. E. B. M. **Antracnose da seringueira no Estado de São Paulo**. CAMPINAS: Instituto Biológico, 1992b. 3 p (Comunicativo técnico, 1).

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

SONODA, R. M.; PELOSI, R. R. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. **Proceedings of Florida State Horticulture Society**, Winter Haven, v. 101, p. 36-38, 1988.

SOUZA, R. R. S. **Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem.** 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. PCR: based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 650-655, 1996.

STRADIOTO, M. F. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* e resistência de seringueira (*Hevea brasiliensis*) ao patógeno.** 1992. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

SUTTON, B. C. **The *Coelomycetes*.** Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 236 p.

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

TAKAHASHI, L. M. **Identificação de *Colletotrichum gloeosporioides* atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica.** 2008. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

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

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JUNIOR, 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.

TRINDADE, D. R.; GASPAROTTO, L. **Escaldadura no caule da seringueira jovem.** Manaus: EMBRAPA, CNPSD, 1982. 3 p. (Comunicado técnico, 20).

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

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi**: a study on two extreme cases. Faculty of Science and Technology, 2004. 72 p.

WASTIE, R. L. Nursery screening of hevea for resistance to Gloeosporium leaf disease. **Rubbe. Res. Inst. Malaya**, v. 23, n. 5, p. 339-350, 1973.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. (Eds.). **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.

WORTING, C. R. **The pesticide manual**: a world compendium. 6th ed. Croydon: British Crop Protection Council, 1979.

XAVIER, A. A. **Patogênese da ferrugem (*Puccinia psidii*) em folhas de genótipos de *Eucalyptus grandis***. 1997. 42 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.