

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

Vinícius Spolaor Fantinel

**CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA GOIABEIRA-
SERRANA/*Colletotrichum* spp.**

Santa Maria, RS
2020

Vinícius Spolaor Fantinel

**CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA GOIABEIRA-SERRANA/*Colletotrichum*
spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS

2020

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo autor.

Spolaor Fantinel, Vinícius
CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA GOIABEIRA-
SERRANA/Colletotrichum spp. / Vinícius Spolaor Fantinel.-
2020.
171 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2020

1. Feijoa sellowiana 2. Antracnose 3. Análise
Multigênica 4. Resistência/Suscetibilidade 5. Fungos
Endofíticos I. Brião Muniz, Marlove Fátima II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a Vinícius Spolaor Fantinel. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

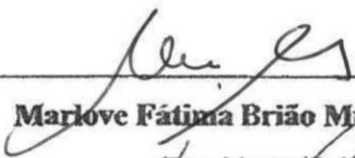
E-mail: vinispofan@hotmail.com

Vinícius Spolaor Fantinel

**CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA GOIABEIRA-SERRANA/*Colletotrichum*
spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

Aprovado em 17 de fevereiro de 2020:

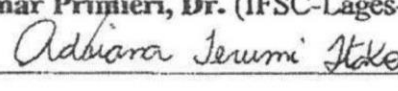


Marlove Fátima Brião Muniz, Dr.^a. (UFSM)

(Presidente/Orientador)



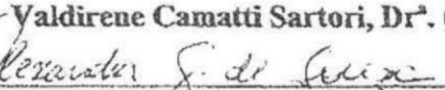
Silmar Primieri, Dr. (IFSC-Lages-SC)



Adriana Terumi Itako, Dr.^a. (UFSC)



Valdirene Camatti Sartori, Dr.^a. (UCS)



Alexandra Goede de Souza, Dr.^a. (IFC-Rio do Sul-SC)

Santa Maria, RS

2020

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Sra. de Fátima por guiarem meus passos durante toda a minha vida;

À Universidade Federal de Santa Maria, por toda a infraestrutura disponível, pelo ensino gratuito e de excelente qualidade. À agência CAPES por viabilizar a execução desse projeto através de apoio financeiro;

À minha orientadora, amiga e professora Dra. Marlove Fátima Brião Muniz, por ter acreditado que o projeto era possível desde o início e por todo apoio e confiança em mim depositado;

À EPAGRI em nome da Dra. Marlise Nara Ciotta que sempre abriu as portas da empresa seja para coleta de material, intercâmbio de informações e apoio no decorrer do trabalho. Esta parceria foi fundamental!

À Prof. Paula Baptista, Prof. Sônia Alexandra, Prof. José Alberto e à Fátima Martins da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pela disponibilidade e ajuda durante o período de estágio sanduíche em Bragança-Portugal;

À Banca examinadora desse trabalho por aceitar o convite e pelas contribuições, que com certeza tornaram este trabalho melhor;

À minha família em especial meus pais Gilberto e Maria Ester pelo apoio incondicional.

À minha companheira Andreia Inês pela paciência, companheirismo, ajuda e apoio em todos os momentos;

Ao amigo e colega Tales Poletto que nunca mediu esforços para auxiliar no desenvolvimento desse trabalho.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Fitopatologia, em especial à Tec. Adm. Maria Nevis pelas conversas e conselhos fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional;

Ao técnico Fernando Saccol que auxiliou na manutenção do laboratório;

À todas as pessoas que auxiliaram abrindo suas casas, sítios, empresas, nos diversos municípios de coleta de amostras vocês também fizeram o trabalho acontecer. Em especial a Sra. Cristiane Tiepo da Prefeitura Municipal de Ibiraiaras, A Sra. Lourdes Maschio (São Jorge) e Stella Maris Nodari (Serafina Corrêa). A toda equipe do centro ecológico de Ipê/RS, obrigado!

Ao Prof. Silmar Primieri de Lages/SC que disponibilizou tempo e conhecimento e aos Produtores Joaquim e Antônio no município de São Joaquim/SC.

Aos demais não mencionados, mas que de igual forma contribuíram para que o trabalho tivesse êxito, meu muito obrigado!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”
Trecho do poema denominado “Exaltação de Aninha” (O Professor)
de Cora Coralina

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA GOIABEIRA-SERRANA/*Colletotrichum* spp.

AUTOR: Vinícius Spolaor Fantinel
ORIENTADORA: Marlove Fátima Brião Muniz

Feijoa sellowiana (O. Berg) O. Berg popularmente conhecida como goiaba-serrana é uma espécie frutífera nativa da região sul do Brasil e do norte do Uruguai, com grande potencial econômico e alimentício. Entretanto, sintomas de antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, foram observados em goiabas-serrana nos três estados do sul do Brasil e no Departamento de Salto no Uruguai. Em virtude disto, estudos a fim de complementar o conhecimento acerca destes patógenos são necessários, pois podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle e prevenção da doença. Diante deste cenário, os objetivos do presente trabalho foram a) comprovar se a infecção de *Colletotrichum* spp. em goiabeira-serrana ocorre de maneira sistêmica via estruturas florais; b) identificar as espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em goiabas-serrana procedentes dos três estados do sul do Brasil e do Departamento de Salto no Uruguai; c) verificar a diversidade e a variabilidade morfofisiológica e genética de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de goiabas-serranas com sintomas de antracnose, através do sequenciamento das regiões, ITS, Actina e β -tubulina; d) confirmar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp., bem como quantificar a incidência e avaliar a reação de suscetibilidade/resistência das cultivares “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” à antracnose; e) avaliar a diversidade de fungos endofíticos existentes em goiabas-serrana de cultivares com diferentes suscetibilidades à antracnose: “Mattos” (resistente) e “Alcântara” (suscetível), e selecionar os isolados que apresentam maior atividade antagonista contra *Colletotrichum* spp.. Para o isolamento do patógeno foram realizadas coletas de frutos sintomáticos em 33 municípios, nos estados do PR, SC, RS e no Departamento de Salto no Uruguai. Os isolados foram caracterizados morfofisiologicamente através do crescimento micelial, esporulação, dimensões e formato de conídios e pigmentação das colônias. Estas variáveis foram utilizadas na análise UPGMA na qual os isolados foram agrupados em um dendrograma de acordo com a similaridade morfológica e, estabelecidos os caracteres que mais contribuíram para a divergência. A incidência do patógeno em flores de goiabeira-serrana indica que a infecção do patógeno ocorre de maneira sistêmica via estruturas florais, desde a formação do fruto. A análise molecular indicou que, nos estados do RS, SC, PR e no Departamento de Salto no Uruguai, a antracnose da goiabeira-serrana é causada por uma espécie do complexo *C. acutatum*: *C. nymphaeae*, três espécies do complexo *C. gloeosporioides*: *C. theobromicola*, *C. fructicola* e *C. siamense*; e por uma espécie que não pertence a nenhum complexo devido às suas características peculiares: *C. pseudoacutatum*. Todas as espécies foram patogênicas à goiabeira-serrana, pois reproduziram os sintomas originais da antracnose. A suscetibilidade das cvs. “Helena” e “Nonante” foi influenciada pela variabilidade específica do patógeno. A cv. “Alcântara” é suscetível e a cv. “Mattos” é resistente à todas as espécies de *Colletotrichum* testadas. As cultivares “Mattos” e “Alcântara” apresentaram comunidade fúngica endofítica semelhante quanto a diversidade, diferindo, entretanto, na abundância. *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Clonostachys rosea* e *Clonostachys rhizophaga* têm ocorrência exclusiva na cv. “Mattos” e *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum* e *Talaromyces amestolkiae* são eficientes no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp..

Palavras-chave: *Feijoa sellowiana*. Antracnose. Análise multigênica. ITS. ACT. β -tub. Resistência/suscetibilidade. Endofíticos. Biocontrole

ABSTRACT

PATHOSYSTEM CHARACTERIZATION FEIJOA/*Colletotrichum* spp.

AUTHOR: Vinícius Spolaor Fantinel
ADVISOR: Marlove Fátima Brião Muniz

Feijoa sellowiana (O. Berg) O. Berg popularly known as feijoa is a fruit species native to southern Brazil and northern Uruguay, with great economic and food potential. However, symptoms of anthracnose, a disease caused by fungi of the genus *Colletotrichum*, were observed in feijoas in the three states of southern Brazil and in the Salto Department in Uruguay. Because of this, studies in order to complement the knowledge about these pathogens are necessary, as they may provide subsidies for the development of strategies for disease control and prevention. Given this scenario, the objectives of the present study were: a) to verify if the mechanism of infection of *Colletotrichum* spp. in feijoa occurs systemically via floral structures; b) identify the anthracnose-causing species of *Colletotrichum* in feijoas from the three southern states of Brazil and from the Salto Department in Uruguay; c) verify the diversity and morphophysiological and genetic variability of isolates of *Colletotrichum* spp. from feijoas with anthracnose symptoms by sequencing the ITS, Actin and β -tubulin regions; d) confirm the pathogenicity of isolates of *Colletotrichum* spp., as well as quantify the incidence and evaluate the susceptibility/resistance reaction of the cultivars "Alcântara", "Helena", "Mattos" and "Nonante" to anthracnose; e) evaluate the diversity of endophytic fungi existing in feijoas of highland cultivars with different susceptibilities to anthracnose: "Mattos" (resistant) and "Alcântara" (susceptible), and select the isolates that present the highest antagonist activity against *Colletotrichum* spp.. Pathogen isolation was collected from symptomatic fruits in 33 municipalities, in the states of PR, SC, RS and in the Salto Department in Uruguay. The isolates were morphophysiological characterized by mycelial growth, sporulation, conidia dimensions and shape and colony pigmentation. These variables were used in the UPGMA analysis in which the isolates were grouped in a dendrogram according to morphological similarity and established the characters that most contributed to the divergence. The incidence of the pathogen in feijoa flowers indicates that the pathogen infection occurs systemically via floral parts, since the fruit formation. Molecular analysis indicated that, in the states of RS, SC, PR and the Department of Salto in Uruguay, anthracnose of feijoa is caused by one species of the *C. acutatum* complex: *C. nymphaeae*, three species of the *C. gloeosporioides* complex: *C. theobromicola*, *C. fructicola* and *C. siamense* and by a species that does not belong to any complex due to their peculiar characteristics: *C. pseudoacutatum*. All species were pathogenic to feijoa, as they reproduced the original symptoms of anthracnose. The susceptibility of cvs. "Helena" and "Nonante" was influenced by the specific variability of the pathogen. The cv. "Alcantara" is susceptible and cv. "Mattos" is resistant to all *Colletotrichum* species tested. The cultivars "Mattos" and "Alcântara" presented similar endophytic fungal community in terms of diversity, however differing in abundance. *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Clonostachys rosea* and *Clonostachys rhizophaga* occur exclusively in cv. "Mattos" and *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum* and *Talaromyces amestolkiae* are efficient *in vitro* control of *Colletotrichum* spp..

Keywords: *Feijoa sellowiana*. Anthracnose. Multigenic analysis. ITS. ACT. β -tub. Resistance/susceptibility. Endophytic. Biocontrol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

FIRST REPORT OF *Colletotrichum siamense* CAUSING ANTHRACNOSE ON *Acca sellowiana* FRUITS IN BRAZIL

Figura 1 - A, Fruit with symptom of anthracnose naturally infected. B, Healthy Fruit inoculated with 100 µL of pathogen. C, Fruit after pathogenicity test (red arrows indicating the place of inoculation). D, Superior part of colony in V8 medium. E, Inferior part of colony in V8 medium. F, Guttulate conidia formed *in vitro*.....34

CAPÍTULO 2

INFECÇÃO DE *Colletotrichum* spp. EM FRUTOS DE *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg

Figura 1 - Estágios Fenológicos do florescimento de goiabeira-serrana.....37

Figura 2 - Estágios fenológicos de florescimento de goiabeira-serrana avaliados no presente estudo. B: Botão floral fechado; E: Desabrochar das peças florais; F₂: Flor completa após antese; H: Flor com estilete já com pétalas caídas.39

Figura 3 - Teste de sanidade com flores de goiabeira-serrana acondicionadas em caixas plásticas transparentes do tipo *Gerbox*. A: botão floral fechado/estágio B; B: Peças florais desabrochando/estágio E; C: Flores completas/estágio F₂; D: presença de estilete e sépalas/estágio H.40

Figura 4 - Incidência de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana. A: Infecção de *Colletotrichum* spp. em pétalas de flores do estágio E. B: Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos, no detalhe frutos já aparentando sintomas de antracnose. C: estames de flores em estágio F₂ de florescimento infectados com *Colletotrichum* spp.....44

Figura 5 - Incidência de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana em estágio H de fenologia floral. A: Infecção de *Colletotrichum* spp. em sépalas e estilete de flores. B/C/D: Incidência de *Colletotrichum* spp. em fruto.....45

Figura 6 - Ciclo da antracnose em *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg causada por *Colletotrichum* spp.46

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM GOIABEIRA-SERRANA

Figura 1 - Municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e do Uruguai onde foram realizadas coletas de isolados de *Colletotrichum* spp.....56

- Figura 2** - Áreas de coleta de goiaba-serrana. A: Exemplares em área de arborização urbana; B: Exemplar em área de Floresta Ombrófila Mista; C: Exemplar na beira de córrego; D/E: Áreas Experimentais; F/G: Plantios comerciais de goiaba-serrana.....59
- Figura 3** - Diversidade Fenotípica de goiaba-serrana em alguns locais de coleta. Barra = 3 cm.....60
- Figura 4** - Coleta de frutos de goiaba-serrana. A: coleta de frutos na árvore; B: lesão típica de antracnose em fruto após a queda.....60
- Figura 5** - A: Caixas plásticas do tipo *Gerbox* com frutos de goiaba-serrana em câmara úmida; B: Frutos após sete dias de armazenamento com acérvulos na coloração salmão com as manchas coalescendo; C: Visualização das estruturas fúngicas em microscópio estereoscópico em câmara de fluxo laminar; E: Corte da lesão com auxílio de bisturi para isolamento pelo método indireto. Barra = 2cm.....61
- Figura 6** - Coloração das colônias para o isolado PEL-1 em diferentes meios de cultura. Na parte superior cores do micélio aéreo. Na parte inferior coloração do reverso. Em que: os meios CA (Cenoura-ágar); V8 (suco de tomate V8 + ágar); Mathur e Aveia correspondem ao código 2,5y 5/1 e o meio BDA (batata-dextrose-ágar) ao código Gley 1 N 3/1 da carta de cores de Munsell.....71
- Figura 7** - Aspecto dos acérvulos, setas e conídios de *Colletotrichum* spp. A: Acérvulo com a presença de setas; B: Acérvulo sem a presença de setas; C: Conídios de tamanho médio com a extremidade afilada; D: Conídios de tamanho grande com extremidade afilada; E: Conídios de tamanho grande com extremidade arredondada; F: Conídios pequenos com extremidade arredondada. Ac.: Acérvulo de *Colletotrichum* sp. Barras = 12 µm.76
- Figura 8** - Coloração das colônias de *Colletotrichum* spp. em meio Mathur após incubação aos oito dias sob temperatura de 25°C e 12 horas de fotoperíodo. Na parte superior: os isolados padrão dos grupos A, B, C, D e E. Na parte inferior: Ar: Reverso da placa A; Br: Reverso da placa B; Cr, Dr: Reverso com a mesma coloração para as placas C e D; Er: Reverso da placa E.77
- Figura 9** - Formas de esporulação de *Colletotrichum* spp. observadas em meio Mathur, após incubação aos oito dias. A: Massa conidial de coloração laranja no centro da placa; B: esporulação na forma de anéis concêntricos e C: Acérvulos de *Colletotrichum* spp. espalhados por toda placa.79
- Figura 10** - Dendrograma das medidas e percentagem de dissimilaridade entre os 49 isolados *Colletotrichum* spp. baseado nas características morfofisiológicas (IVCM, DFC, TCM, Largura e comprimento dos conídios e esporulação), utilizando como método de agrupamento UPGMA. A linha tracejada, refere-se ao “ponto de corte” de 10% de dissimilaridade para a obtenção dos grupos. Os números indicam os oito grupos gerados através da análise.81
- Figura 11** - Dendrograma filogenético baseado no método Neighbor-joining a partir de sequências de DNA da região ITS, com base em 1000 réplicas de bootstrap. Os

números sobre os ramos representam o número de bootstrap. ● Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos no presente estudo.....89

Figura 12 - Dendrograma filogenético baseado no método Neighbor-joining a partir de sequências de DNA da região Actina (ACT), com base em 1000 réplicas de bootstrap. Os números sobre os ramos representam o número de bootstrap. ● Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos no presente estudo.....91

Figura 13 - Dendrograma filogenético baseado no método Neighbor-joining a partir de sequências de DNA da região β -tubulina (β -tub) com base em 1000 réplicas de bootstrap. Os números sobre os ramos representam o número de bootstrap. ● Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos no presente estudo.....92

CAPÍTULO 4

PATOGENICIDADE E REAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE/RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA À ANTRACNOSE

Figura 1 - Inoculação de *Colletotrichum* sp. em frutos de goiabeira-serrana para o teste de patogenicidade e reação de cultivares. A: frutos em água para remoção do álcool e do hipoclorito de sódio; B: frutos sobre papel filtro secando em temperatura ambiente. C: frutos com suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp. no exocarpo. D: Bandejas dispostas em prateleiras em sala climatizada. Barras = 2 cm.....107

Figura 2 - Sintomas de antracnose em frutos de goiabeira-serrana após inoculação artificial de isolados de *C. fructicola*. A: Frutos da cultivar “Mattos” no quarto dia após a inoculação de *C. fructicola*; B: Frutos da cv. “Mattos” no 15º dia após a inoculação de *C. fructicola*; C: Frutos da cultivar “Mattos” no vigésimo dia após a inoculação; D: Frutos da cv. “Helena” no quarto dia após a inoculação; E: Lesões em processo de coalescimento causadas por *C. fructicola* em fruto de goiabeira-serrana da cv. “Helena” no 15º dia após a inoculação; F: Fruto da cv. “Helena” no vigésimo dia após a inoculação com as lesões totalmente coalescidas causadas por *C. fructicola*. Barras = 2cm.....109

Figura 3 - Lesões típicas de antracnose em frutos de goiabeira-serrana da cultivar “Mattos” aos 20 dias após a inoculação. A: Massa conidial de coloração salmão causada por *C. nymphaeae*. B: Massa conidial de coloração salmão produzida pelo fungo *C. nymphaeae*; C: Massa conidial de coloração alaranjada produzida por *C. theobromicola*. D: Lesões de coloração escura resultantes da infecção de *C. pseudoacutatum*. Barras = 2cm.110

Figura 4 - *Colletotrichum* sp. Isolado de lesões sintomáticas de frutos de goiabeira-serrana após inoculação artificial. A: Colônia em meio Mathur com a formação de setores; B: Acérvulos (Ac) e a seta indica a presença de setas acervulares; C: Conídios em aumento de 40 x. Barras = 12 μ m.....110

CAPÍTULO 5

FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A FRUTOS DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA COM DIFERENTES SUSCETIBILIDADES À ANTRACNOSE E SELEÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE

- Figura 1** - Disposição em placa de Petri dos fungos utilizados no teste de confronto direto. À esquerda (em vermelho) o patógeno e à direita (em verde) o fungo endofítico testado.....127
- Figura 2** - Curvas de acúmulo de espécies para os fungos endofíticos isolados de goiabaserrana coletadas de indivíduos de *Feijoa sellowiana* das cultivares “Mattos”, “Alcântara” e total.....131
- Figura 3** - Gráficos de Escala Multidimensional Não-Métrica (NMDS) correspondentes ao agrupamento de comunidades de fungos endofíticos agrupados por cultivar de goiabeira-serrana: “Mattos” e “Alcântara”. À esquerda o coeficiente de Bray-Curtis e a direita o Índice de Jaccard representando duas medidas diferentes de similaridade. Valores de estresse de Kruskal inferiores a 0,2 representam gráficos bem ordenados.....136
- Figura 4** - Diagramas de Venn representando o número total de espécies fúngicas endofíticas compartilhadas entre as cultivares de goiabeira-serrana: “Mattos” e “Alcântara”.....136
- Figura 5** - Abundância relativa de fungos endofíticos associados a goiaba-serrana das cultivares “Mattos” e “Alcântara”.....138
- Figura 6** - Interações entre *Colletotrichum siamense* (Cs) e fungos endofíticos isolados de goiabeira-serrana das cultivares “Mattos” e “Alcântara”. Em que, A: *C. siamense* x *Fusarium oxysporum* em interação do tipo A; B: *C. siamense* x *Clonostachys rosea* em interação do tipo CA₁ onde o endofítico cresce parcialmente sobre o patógeno após o contato micelial entre os fungos. A seta indica exatamente o limite até onde o fungo endofítico cresceu sobre o patógeno; em C: *C. siamense* x *Trichoderma harzianum* em interação do tipo CA₂ onde o fungo endofítico cresce totalmente sobre o patógeno.....141
- Figura 7** - Interações entre *Colletotrichum siamense* (Cs) e isolados fúngicos endofíticos obtidos das cvs. “Mattos” (*Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea*) e “Alcântara” (*Fusarium oxysporum* e *Talaromyces amestolkiae*) no sétimo dia de incubação em meio batata-dextrose-ágar. Na parte superior o micélio aéreo e na parte inferior o reverso das placas. Cs está à esquerda na placa de Petri; e isolados fúngicos endofíticos, à direita. Em A, o crescimento total de *Trichoderma harzianum* sobre *C. siamense* (A) e o escurecimento do patógeno na zona de interação com o antagonista (Ar); Em B, *Fusarium oxysporum* inibe por contato o crescimento de *C. siamense*; Em C e Cr, observa-se a coloração avermelhada na zona de contato entre o patógeno e o antagonista *Talaromyces amestolkiae*; Em D, crescimento parcial de *Clonostachys rosea* sobre *C. siamense*.....142

Figura 8 - Detalhe da Interação entre *Colletotrichum siamense* (Cs) na parte esquerda da placa de Petri e *Talaromyces amestolkiae* à direita no sétimo dia de incubação em meio de cultura batata-dextrose-ágar. A seta indica a coloração avermelhada na zona de contato entre os dois fungos. Em Ar, a seta indica a coloração avermelhada na zona de contato no reverso da placa de petri.....142

Figura 9 - Morfologia das hifas de *Colletotrichum siamense* e de fungos endofíticos obtidos de frutos de goiabeira-serrana de duas cultivares: “Mattos” e “Alcântara”. Clamidósporos de *Trichoderma harzianum* (setas) (A); Hifa de *Talaromyces amestolkiae* na coloração vermelha (seta maior) e hifa de *C. siamense* (hialina) na zona de interação (seta menor)(B); Hifas de *C. siamense* em co-cultura com *Clonostachys rosea* deformadas e em estresse (setas) (C); Hifa de *C. siamense* em colapso (seta) (D). Barra = 10 µm.....144

Figura 10 - Porcentagem de inibição (valores positivos) e promoção (valores negativos) da esporulação e germinação de conídios de *Colletotrichum siamense* e *Colletotrichum nymphaeae* em confronto direto com fungos endofíticos isolados das cvs. de goiabeira serrana: “Mattos” e “Alcântara”. Cada valor é expresso como média (n=5). Barras com diferentes letras maiúsculas (esporulação) e minúsculas (germinação) indicam diferenças significativas (p <0,05) entre isolados endofíticos.....145

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

INFECÇÃO DE *Colletotrichum* spp. EM FLORES DE *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg

- Tabela 1** - Incidência (%) de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana em diferentes estágios fenológicos de florescimento oriundas de Lages (SC), submetidas ao teste de sanidade através do método de “Blotter Test”41
- Tabela 2** - Incidência (%) de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana em diferentes estágios fenológicos de florescimento oriundas de São Joaquim (SC), submetidas ao teste de sanidade através do método de “Blotter Test”42

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM GOIABEIRA-SERRANA

- Tabela 1** - Áreas de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de pomares de goiaba-serrana no RS, SC e PR e Uruguai.....56
- Tabela 2** - Isolados utilizados para análise molecular, conforme a análise multivariada UPGMA e seus respectivos códigos de depósito no Herbário SMDB da UFSM.....66
- Tabela 3** - Médias de Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) dos isolados de *Colletotrichum* spp. SPS; ANG e PEL-1 nos meios de cultura: Mathur, V8, BDA, Cenoura e Aveia aos oito dias após incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.....68
- Tabela 4** - Médias de crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp. SPS; ANG e PEL-1 nos meios de cultura: Mathur, V8, BDA, Cenoura e Aveia aos oito dias após incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.69
- Tabela 5** - Médias de produção de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. SPS; ANG e PEL-1 nos meios de cultura: Mathur, V8, BDA, Cenoura e Aveia aos oito dias após incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.....70
- Tabela 6** - Características das colônias de *Colletotrichum* spp. crescidos em meio Mathur, após 8 dias de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.....72
- Tabela 7** - Classificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. quanto a coloração observada em meio Mathur, após incubação.76
- Tabela 8** - Características das colônias dos 49 isolados de *Colletotrichum* spp. observadas em meio Mathur, após incubação aos oito dias.....77

Tabela 9 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento da região ITS.....83

Tabela 10 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento das regiões Actina (ACT) β -tubulina (β -tub).....85

CAPÍTULO 4

PATOGENICIDADE E REAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE/RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA À ANTRACNOSE

Tabela 1 - Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de antracnose, no sul do Brasil e no Uruguai, selecionados para o teste de patogenicidade e reação de cultivares.....105

Tabela 2 - Valores médios de notas de severidade e incidência (%) de antracnose induzida por inoculação artificial de espécies de *Colletotrichum* spp. em frutos de goiabeira-serrana nas cultivares “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante”.....112

CAPÍTULO 5

FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A FRUTOS DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA COM DIFERENTES SUSCETIBILIDADES À ANTRACNOSE E SELEÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE

Tabela 1 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos fungos endofíticos isolados de frutos de goiabeira-serrana de duas cultivares com diferentes graus de suscetibilidade à antracnose. Os acessos estão descritos conforme dados do *GenBank*, através de sequenciamento da região ITS.....130

Tabela 2 - Frequência de colonização (FC %) e abundância relativa (AR%) de cada endofítico isolado de goiaba-serrana das cultivares “Mattos” e “Alcântara”132

Tabela 3 - Diversidade e Abundância de fungos endofíticos isolados de goiabas-serranas de duas cultivares Mattos e Alcântara. Os resultados são apresentados como valores totais ou médios (valor médio \pm DP, n=10)135

Tabela 4 - Índice de antagonismo e interações de fungos endofíticos isolados de frutos de goiabeira-serrana com os fitopatógenos *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum siamense*.....139

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO A** - Gêneros fúngicos associados à flores de goiabeira-serrana em diferentes estágios de florescimento oriundas dos municípios de Lages (sc) e São Joaquim (sc), submetidas ao teste de sanidade através do método de “Blotter Test”169
- ANEXO B** - Coleta de frutos sintomáticos de goiaba-serrana.....171

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	27
CAPÍTULO 1 - FIRST REPORT OF <i>Colletotrichum siamense</i> CAUSING ANTHRACNOSE ON <i>Acca sellowiana</i> FRUITS IN BRAZIL.....	33
References.....	34
CAPÍTULO 2 - INFECÇÃO DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM FLORES DE <i>Feijoa sellowiana</i> (O. Berg) O. Berg.....	35
Resumo	35
Introdução	36
Material e métodos	38
Resultados e discussão.....	40
Conclusão	47
Agradecimentos.....	47
Referências bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Colletotrichum</i> spp. AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM GOIABEIRA-SERRANA	51
Resumo.....	51
Introdução.....	52
Material e métodos.....	55
Coleta e Preparação dos isolados.....	55
Caracterização Morfofisiológica de <i>Colletotrichum</i> spp.....	62
Seleção de meio de cultura para esporulação de <i>Colletotrichum</i> spp.....	62
Caracterização morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio Mathur.....	64
Procedimentos Estatísticos.....	65
Caracterização Molecular dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	66
Resultados e Discussão.....	68
Caracterização Morfofisiológica de <i>Colletotrichum</i> spp.....	68
Seleção de meio de cultura para esporulação de <i>Colletotrichum</i> spp.....	68
Caracterização morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp.....	71
Caracterização Molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	83
Conclusões.....	94
Agradecimentos.....	94
Referências Bibliográficas.....	95
CAPÍTULO 4 - PATOGENICIDADE E REAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE/RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA À ANTRACNOSE.....	101
Resumo	101
Introdução	102
Material e métodos	104
Resultados e discussão.....	108
Conclusão	115
Agradecimentos.....	115
Referências bibliográficas.....	166

CAPÍTULO 5 - FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A FRUTOS DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA COM DIFERENTES SUSCETIBILIDADES À ANTRACNOSE E SELEÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE	119
Resumo.....	119
Introdução.....	120
Material e métodos.....	122
Colheita de fruto para isolamento de fungos endofíticos.....	122
Isolamento de fungos endofíticos.....	123
Identificação dos Isolados Fúngicos.....	124
Composição de comunidades fúngicas.....	125
Testes de Antagonismo.....	126
Estabelecimento de co-culturas.....	126
Variáveis analisadas.....	127
Resultados e Discussão.....	129
Descrição da comunidade fúngica.....	129
Comparação da comunidade fúngica endofítica entre as cultivares “Mattos” e “Alcântara”	135
Interação entre <i>Colletotrichum</i> spp. e isolados de fungos endofíticos.....	138
Conclusão.....	146
Agradecimentos.....	147
Referências Bibliográficas.....	147
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	157
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
ANEXO A - Gêneros fúngicos associados à flores de goiabeira-serrana em diferentes estágios de florescimento oriundas dos municípios de Lages (SC) e São Joaquim (SC), submetidas ao teste de sanidade através do método de “Blotter Test”.....	169
ANEXO B – Coleta De Frutos Sintomáticos De Goiaba-serrana.....	171

INTRODUÇÃO

A flora brasileira apresenta a maior biodiversidade do planeta abrigando inúmeras espécies com potencial alimentício. Mesmo assim, segundo Claridge e Franklin (2002) estas espécies são negligenciadas em detrimento de recursos vegetais importados que são cultivados em maior escala, pois se adaptam facilmente aos diferentes biomas em virtude da maior plasticidade fenotípica.

A partir de 1980, principalmente em razão da erosão genética acelerada pela revolução verde, da necessidade de atender um mercado em crescente expansão e exigente e de se buscar alternativas para pequenos agricultores, algumas iniciativas despertaram a importância do uso de espécies nativas sob o foco da agricultura sustentável (VALLE, 2002; AKINNIFESI et al., 2008).

Após essa quebra de paradigma, o governo brasileiro apresentou algumas iniciativas governamentais, tal como a proposta pelo Ministério do Meio Ambiente no ano de 2010 denominada de “Plantas para o Futuro”. Esta iniciativa, visou promover o uso sustentável de espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual e potencial, utilizadas local e regionalmente, com vistas à definição de novas opções em unidades de produção familiares, contribuindo para a redução da vulnerabilidade do sistema alimentar brasileiro (CORADIN, 2011).

Por apresentar frutos com grande potencial organoléptico e ricos em vitaminas e flavonoides e por se tratar de uma espécie nativa adaptada as condições edafoclimáticas brasileiras, *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg ganhou destaque e reconhecimento no projeto “Plantas para o Futuro”.

Feijoa sellowiana é nativa das regiões fisiográficas da Serra do Sudeste, Planalto Médio, Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul, do Planalto Serrano de Santa Catarina e do norte do Uruguai. A espécie pertence à família Myrtaceae, que é uma família botânica com ampla distribuição, principalmente, nas zonas tropicais e subtropicais (MARCHIORI, 1997) e é conhecida popularmente por goiabeira-serrana, goiaba-do-campo, goiaba-da-serra, goiabinha, goiaba-serrana ou feijoa. Existem indícios de que os indígenas Kaingang a chamam de *kanê kriyne*, o que deu origem ao nome quirina. No Uruguai, é conhecida como guayabo-verde ou guayabo-del-pais e, na língua inglesa é denominada como pineapple-guava (DUCROQUET et al., 2000).

Os frutos da goiabeira-serrana apresentam características peculiares que os diferem da goiaba-comum, tais como: coloração da casca que permanece verde mesmo o fruto estando

maduro além na polpa de coloração gelo, com sabor e aroma doce-acidulados, apresentando flores com pétalas brancas carnosas e comestíveis e estames vermelhos sendo muito atrativas para polinizadores, e próprias para consumo humano. A espécie é largamente empregada na arborização urbana devido a sua beleza cênica, sobretudo em municípios da Serra Gaúcha e Catarinense.

Os primeiros programas de melhoramento genético com goiabeira-serrana, segundo Dawes e Pringle (1983), aconteceram na década de 1950 na Califórnia com o desenvolvimento das cultivares “Coolidge”, “Choiceana” e “Superba” e pouco tempo depois, na Nova Zelândia iniciaram-se os programas de melhoramento tendo sido lançadas as cultivares “Apollo”, “Unique” e “Gemini”. Posteriormente, as cultivares norte americanas e da Nova Zelândia foram introduzidas no Brasil, porém, foi constatado um baixo desempenho, fato que impulsionou o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético a partir de genótipos coletados no centro de origem (SANTOS et al., 2011).

Mesmo com grande potencial econômico e alimentício, somente a partir da década de 1980 a espécie passou a ser estudada em programas de melhoramento no seu centro de origem, especialmente no estado de Santa Catarina. Várias atividades de seleção, conservação e caracterização estão sendo atualmente desenvolvidas visando ampliar as informações a respeito das características genotípicas e fenotípicas da goiabeira-serrana. O melhoramento participativo, por exemplo, que relaciona o valioso conhecimento local dos agricultores com o conhecimento científico, vem sendo amplamente empregado como uma forma de disseminação, conservação e valorização da goiabeira-serrana (DONAZZOLO et al., 2020).

Apesar de ser o centro de dispersão da espécie, no Brasil, apenas no ano de 2007 e 2008 foram lançadas as primeiras cultivares de goiabeira-serrana denominadas de “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante”. Estes materiais foram desenvolvidos pela Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) do município de São Joaquim (SC), em um esforço conjunto com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e representam um passo importantíssimo na organização do sistema de cultivo da espécie no país (DUCROQUET et al., 2007; DUCROQUET et al., 2008).

A maioria dos plantios comerciais da espécie no Brasil foi incentivado pela própria EPAGRI em Unidades de Produção Familiares na região do Planalto Serrano Catarinense e por iniciativas vinculadas ao Centro Ecológico Serra, na região da Serra Gaúcha (CARDOSO, 2009).

Segundo dados do Centro de Sécio Economia e Planejamento Agrícola (2013), quase 90 toneladas de goiabeira-serrana foram produzidas na safra 2012/2013, no entanto de acordo

com Amarante et al. (2017) as plantações de goiabeira-serrana estão em processo de expansão no Brasil. Se destacam como maiores produtores mundiais de goiaba-serrana a Colômbia e a Nova Zelândia, respectivamente. Na Colômbia, no ano de 2014, a área cultivada era de 240 hectares nos quais foram produzidas aproximadamente 2600 toneladas (AGRONET, 2017). Na Nova Zelândia, existem cerca de 220 produtores, cultivando aproximadamente 220 hectares, com produção média de 1.000 t. O comércio de frutos de goiaba-serrana, na Nova Zelândia, movimentou um montante de US\$ 600 mil, dos quais US\$ 150 mil são provenientes da exportação dos frutos (THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT E FOOD RESEARCH, 2015).

Conforme pesquisa realizada por Santos (2009) com produtores de goiaba-serrana da região do Planalto Serrano Catarinense, entre as principais dificuldades encontradas por eles na instalação e condução dos pomares, estão a falta de informações no que tange ao controle de pragas e doenças, e dessa forma, o manejo dos problemas fitossanitários tem sido realizado utilizando técnicas e fungicidas químicos registrados para outras frutíferas, especialmente a maçã.

Nesse sentido, a principal doença que atinge os pomares de goiabeira-serrana no Brasil é a antracnose que tem como agente causal fungos do gênero *Colletotrichum*. Esta doença, quando não manejada corretamente, pode causar perdas de até 100% na produção dos frutos (FANTINEL et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018). Os sintomas da antracnose nos frutos são manchas escuras deprimidas, com a parte central de coloração salmão/alaranjada que se formam devido aos sinais de multiplicação do agente patogênico.

Embora a antracnose tenha sido observada em goiabeira-serrana pela primeira vez no Brasil no ano de 1985, no pomar experimental da EPAGRI no município de Videira-SC (DUCROQUET et al., 1993), não existiam estudos que comprovassem molecularmente a existência de espécies de *Colletotrichum* associadas a este hospedeiro nas condições ambientais brasileiras. Assim, com o advento das técnicas de análises multigênicas foi possível a publicação do primeiro relato no Brasil de *Colletotrichum siamense* como agente causal da antracnose em frutos de goiaba-serrana (**Capítulo 1**) (FANTINEL et al., 2017). A mesma doença também já havia sido relatada na Nova Zelândia, (LARDNER, 1999) e mais recentemente na Itália (CAMELE, 2018) em ambos os países o agente causal é *C. acutatum* *sensu lato*.

Após o primeiro relato do patógeno no Brasil em nível *sensu stricto* (táxon definido), torna-se de extrema importância elucidar a maneira como ocorre seu processo infeccioso em goiabeira-serrana. O conhecimento a respeito do real mecanismo de infecção do fungo auxiliará

no desenvolvimento de estratégias eficientes de controle da antracnose nos pomares.

Da mesma maneira, é essencial caracterizar morfofisiologicamente e identificar os isolados de *Colletotrichum* através de análises filogenéticas a fim de conhecer a sua variabilidade na área de ocorrência natural da goiabeira-serrana. As informações genótípicas possibilitam identificar indivíduos e suas diferenças que, muitas vezes, são causadas por alterações em um único par de base (SOUTO et al., 2000). Tais informações, são fundamentais para o estudo da epidemiologia da doença, pois são base para o programa de melhoramento genético de *F. sellowiana*.

O conhecimento quanto à resistência natural das cultivares comerciais de goiabeira-serrana frente a principal doença que acomete esta cultura auxilia os produtores ainda na fase de planejamento para implantação dos pomares, possibilitando aos mesmos a escolha de cultivares resistentes à antracnose reduzindo os gastos com tratamentos culturais. Segundo Bessalho et al. (2007), a utilização de cultivares resistentes constitui, nesse sentido, uma das mais eficientes formas de controle de doenças das plantas cultivadas. É menos agressiva ao meio ambiente (comparado com o uso de agrotóxicos), ao agricultor (que fica menos exposto aos agrotóxicos) e ao consumidor, que pode consumir produtos saudáveis.

Considerando o manejo integrado da antracnose, o controle biológico é considerado uma excelente estratégia de controle pois mantém mediante suas práticas, o equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora exercida pelos organismos não patogênicos no sistema (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

Nesse contexto, a população microbiana presente na filosfera das plantas tem despertado a atenção da comunidade científica com o intuito da sua exploração em nível agrícola e alimentar. Na agricultura, existe um particular interesse na detecção e seleção destes microrganismos para promover o crescimento e a proteção de plantas contra agentes de estresse bióticos (pragas e doenças) e abióticos. Os microrganismos associados aos frutos podem ser explorados, em uma perspectiva integrativa, para projetar novas estratégias para o controle biológico da antracnose da goiabeira-serrana atuando como agentes de biocontrole dos patógenos sendo base para o desenvolvimento de biopesticidas.

Dentre estes microrganismos, destacam-se os fungos endofíticos que vivem no interior das plantas, habitando de modo geral a filosfera, como folhas e frutos, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros (ASSUMPTIÃO et al., 2010).

O conhecimento da composição e função da comunidade endofítica em goiabas-serrana certamente contribuirá para o desenvolvimento de uma proteção integrada, bem-sucedida e sustentável da cultura contra a antracnose.

Diante do exposto, foram elaboradas as seguintes hipóteses/suposições:

- O mecanismo de infecção de *Colletotrichum* em frutos de goiabeira-serrana é via sistêmica;
- A antracnose em goiabeira-serrana é causada por várias espécies do gênero *Colletotrichum*;
- Cultivares de goiabeira-serrana apresentam resistência à antracnose;
- A comunidade fúngica endofítica difere na sua composição entre cultivares e fungos endofíticos são eficientes no biocontrole in vitro de *Colletotrichum* spp..

Nesse sentido, para comprovar estas hipóteses, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de: a) verificar o mecanismo de infecção de *Colletotrichum* spp. em goiabeira serrana; b) avaliar a variabilidade morfofisiológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. associados antracnose em goiabeira-serrana, verificando sua distribuição em sua área de ocorrência natural; c) confirmar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. e selecionar cultivares resistentes como forma de controle para a doença; d) avaliar a diversidade de fungos endofíticos existentes em goiabas-serrana de duas cultivares, e selecionar os isolados que apresentam maior atividade antagonista contra *Colletotrichum* spp.

CAPÍTULO 1

FIRST REPORT OF *Colletotrichum siamense* CAUSING ANTHRACNOSE ON *Acca sellowiana* FRUITS IN BRAZIL

PLANT DISEASE JOURNAL: Publicado em Junho de 2017, Volume 101, Número 6
Página 1035.

V. S. Fantinel, M. F. B. Muniz, E. Blume, M. M. Araújo, T. Poletto, T. T. da Silva, A. F. Dutra, and C. G. Maciel, Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, Brasil; and R. Harakava, Biological Institute of São Paulo, Brazil.

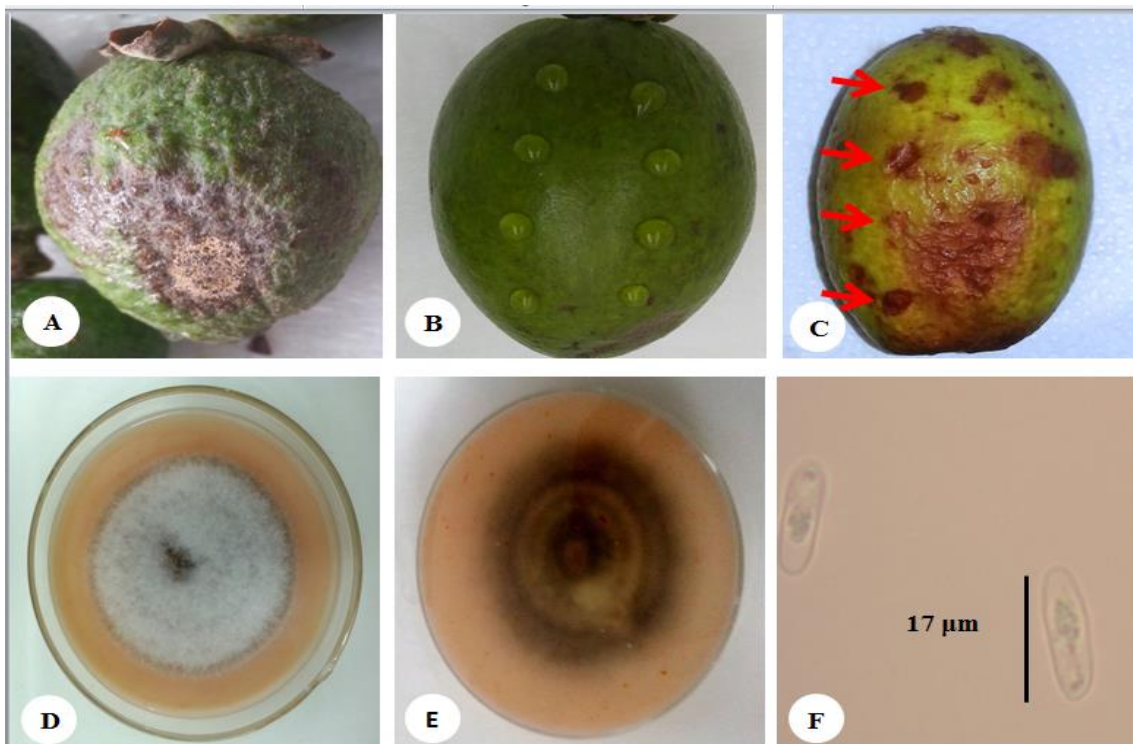
Acca sellowiana (O. Berg) Burret (feijoa) is a fruit species from the South region of Brazil and Northeast of Uruguay and presents economical importance due to the high organoleptic potential. Fruits with symptoms of anthracnose were observed in March of 2012, in orchards of the municipality of São Pedro do Sul, Rio Grande do Sul-RS state, Brazil. The disease caused well defined dark spots of irregular shape that, after increasing in size, became depressed and coalesced, resulting in rotten fruit. On the spots acervuli of light-pink coloration were observed. The disease affected approximately 75% of the fruits in the orchard and became more intense after post-harvest. Fruits with the symptom of anthracnose were collected in the municipality of São Pedro do Sul – RS (29°59'32"S and 54°10'84"W). Disinfestation was performed with ethanol at 70% during 30 s and then with 1% sodium hypochlorite during 5 min and, finally, washed three times in sterilized distilled water. The fruits were placed in moist chamber in trays and incubated at 25 ± 1°C with a photoperiod of 12 hours. The purified isolate was cultivated in V8 medium at 25 ± 1°C for eight days. The colony presented dark green coloration with white aerial mycelium, with daily average growth of 9 mm in diameter. The conidia were hyaline, without septa, spindle-shaped with obtuse ends, smooth walls, guttulate, measuring from 7.5 to 17.5 x 2.5 to 7.5 µm compatible with the morphological characteristics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex. The elongation factor genes 1- α (TEF1- α), β -tubulin (β -TUB) and actin (ACT) were amplified. The sequences of genes TEF1- α (No. KX845557), β -TUB (No. KX858806) and ACT (No. KX858807) were deposited in *GenBank* and had similarity of 99%, 100% and 100% with *Colletotrichum siamense* KC 790614, KU 252165, and JX 009435, respectively. A pathogenicity test was carried out to fulfill the Koch principles. Twenty healthy fruit in intermediate stage of development were inoculated with a spore suspension (10^6 conidia mL⁻¹), where each fruit received 100 µL divided in eight drops distributed separately. In the control treatment, only sterilized water was used. The fruits remained in sterilized plastic boxes with two moisten sheets of filter paper at 25 ± 1°C and 12 h of photoperiod. The test was repeated three times. The original symptoms of the disease were observed in the inoculated fruit after four days. The pathogen was re-isolated from the injuries and identified as *C. siamense* belonging to the *C. gloeosporioides* complex. Although, in Brazil, *C. siamense* has already been reported in *Coffea arabica* (coffee) (Silva et. al. 2012) and *Fragaria x ananassa* (strawberry) (Capobianco et. al. 2016), to our knowledge this is the first report of this pathogen causing rotting of fruits (anthracnose) in *Acca selowiana* in the country.

References

Capobiango, N.P., et al. 2016. *Plant Dis.* 100:859.

Silva, D. N., et al. 2012. *Mycologia* 104:396. 10.3852/11-145.

Figure 1 - A, Fruit with symptom of anthracnose naturally infected. B, Healthy Fruit inoculated with 100 μL of pathogen. C, Fruit after pathogenicity test (red arrows indicating the place of inoculation). D, Superior part of colony in V8 medium. E, Inferior part of colony in V8 medium. F, Guttulate conidia formed *in vitro*.



Fonte: Autor.

CAPÍTULO 2

INFECÇÃO DE *Colletotrichum* spp. EM FLORES DE *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg

Resumo - *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg (Myrtaceae), popularmente conhecida como goiabeira-serrana ou feijoa, é uma frutífera nativa do sul do Brasil e Uruguai e seus frutos apresentam grande potencial econômico e alimentício. Considerando a necessidade da boa aparência do fruto para comercialização, as doenças podem ser um entrave na produção, pois interferem na qualidade e podem inviabilizar o consumo dos frutos *in natura*. A principal doença que atinge pomares de goiabeira-serrana e que pode levar a consideráveis perdas nas fases pré e pós-colheita é a antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*. Os conhecimentos acerca das relações patógeno-hospedeiro, tanto através da elucidação do(s) mecanismo(s) de infecção de *Colletotrichum* spp. nas cultivares de interesse comercial como também pela caracterização dos isolados através de análises multigênicas são fundamentais para o estabelecimento de estratégias eficientes e seguras para o controle da antracnose. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo verificar a incidência de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana de quatro cultivares em diferentes estágios fenológicos de florescimento e constatar se o mecanismo de infecção deste patógeno ocorre de maneira sistêmica, via estruturas florais. Para a análise, foram selecionadas aleatoriamente 10 plantas adultas, das quais foram coletadas 100 flores para cada um dos estágios fenológicos de floração: B, E, F₂ e H por cultivar (“Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante”) em pomares localizados nos municípios de Lages/SC e São Joaquim/SC. O material foi analisado através de testes de sanidade pelo método de papel filtro, comparando a incidência do patógeno presente nas flores nos quatro estágios fenológicos. Em ambas as procedências (Lages e São Joaquim) as maiores incidências média de *Colletotrichum* spp. ocorreram no último estágio floral analisado (H) e a cv. “Alcântara” foi a cv. mais suscetível à antracnose. A infecção de *Colletotrichum* spp. nas flores foi confirmada pela sua esporulação em pétalas, ovário e estames. A incidência do patógeno em flores de goiabeira-serrana indica que a infecção do patógeno ocorre de maneira sistêmica via peças florais, desde a formação do fruto.

Palavras-chave: mecanismo de infecção; flores; antracnose; goiabeira-serrana.

Abstract - *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg (Myrtaceae), popularly known as feijoa, is a native fruit from southern Brazil and Uruguay and its fruits have great economic and food potential. Considering the necessity of good appearance of the fruit for commercialization, the diseases can be a hindrance in the production, because they interfere in the quality and can make the consumption of the fruits *in natura* unfeasible. The main disease affecting guava and mountain orchards that can lead to considerable losses in the pre and postharvest stages is anthracnose, caused by fungi of the genus *Colletotrichum*. Knowledge about pathogen-host relationships, both by elucidating the mechanism (s) of infection of *Colletotrichum* spp. In cultivars of commercial interest as well as the characterization of isolates through multigenic analyzes are fundamental for the establishment of efficient and safe strategies for the control of anthracnose. In this sense, the present study aimed to verify the incidence of *Colletotrichum* spp. in feijoa flowers of four cultivars in diferentes phenological stages of flowering and to verify if the mechanism of infection of this pathogen occurs systemically via floral structures. For the analysis, 10 adult plants were randomly selected, from which 100 flowers were collected for each of the flowering phenological stages: B, E, F₂ and H by cultivar (“Alcântara”, “Helena”, “Mattos” and “Nonante”) in orchards located in the municipalities of Lages/SC and São Joaquim/SC. The material was analyzed through health tests by the filter paper method,

comparing the incidence of the pathogen present in the flowers in the four phenological stages. In both provenances (Lages and São Joaquim) the highest average incidence of *Colletotrichum* spp. occurred in the last floral stage analyzed (H) and cv. “Alcântara” was cv. more susceptible to anthracnose. The infection of *Colletotrichum* spp. in flowers was confirmed by its sporulation in petals, ovary and stamens. The incidence of the pathogen in guava-serrana flowers indicates that the pathogen infection occurs systemically via floral parts, since the fruit formation.

Keywords: infection mechanism; flowers; anthracnose; feijoa.

Introdução

A espécie *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg, popularmente conhecida por feijoa, goiaba-serrana, goiabeira-serrana, goiaba do campo ou goiaba da serra é uma espécie frutífera de grande interesse econômico e, por isso, está em intenso processo de domesticação (SOUZA; LORENZI, 2012). No Brasil, a ocorrência da goiabeira-serrana concentra-se nas regiões fisiográficas da Serra do Sudeste, Planalto Médio e Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul, no Planalto Serrano Catarinense e Campos de Altitude do Paraná, onde habita a orla da mata e vegetações de fisionomia savânica (MARCHIORI; SOBRAL, 1997). Ocorre também no norte do Uruguai (MATTOS, 1986; THORP; BIELESKI, 2003) e alguns autores afirmam a sua presença no Paraguai (MORTON, 1987) e na Argentina (KELLER; TRESSENS, 2007).

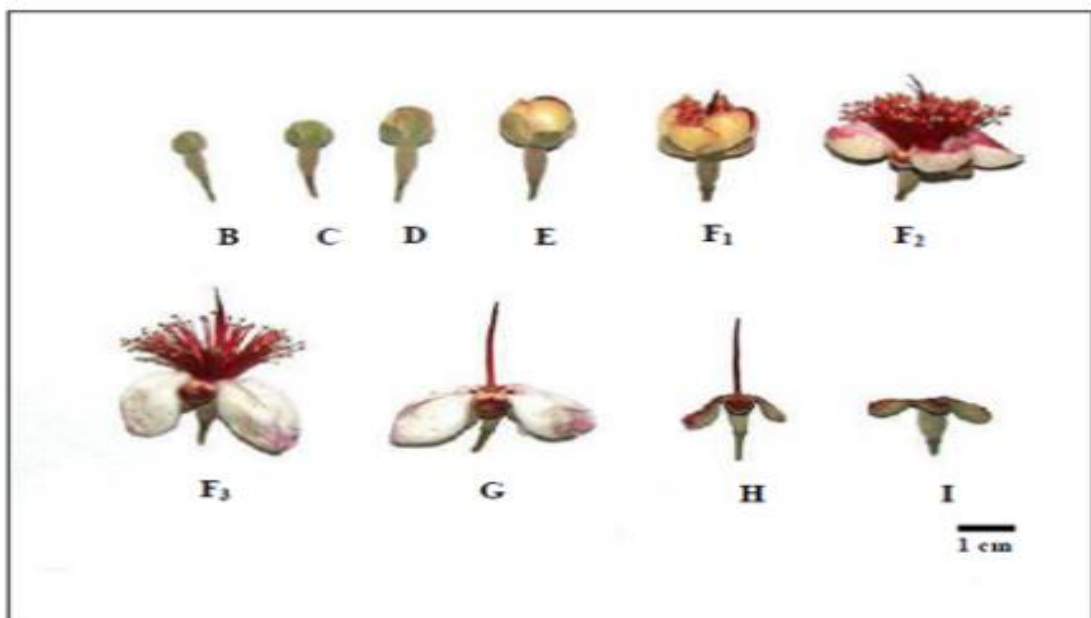
De acordo com Ducroquet et al. (2000), a espécie é hermafrodita e o florescimento ocorre entre os meses de outubro a dezembro quando em condições normais em sua área de ocorrência natural. Devido a sua arquitetura floral, a espécie apresenta mecanismos de polinização com barreiras fisiológicas que incentivam a alogamia (DUCROQUET, et al., 2000). Dentre esses mecanismos, está a autoincompatibilidade, devido a distância entre estigma e antera e a dicogamia por protoginia, em função da separação temporal das estruturas reprodutivas, em que o estigma se encontra receptivo 24 horas antes da deiscência das anteras (MATTOS, 1986; STEWART, 1987).

Além dos frutos, as pétalas das flores podem ser destinadas para consumo humano (decoração de pratos, saladas, doces) em razão do seu agradável sabor e seu colorido intenso. As flores são formadas por quatro pétalas subcarnosas, avermelhadas por dentro e cerosas por fora, estames de cor escarlata, saindo até 2 cm acima da flor, e estigma ligeiramente engrossado (LEGRAND; KLEIN, 1977).

Conforme Ducroquet e Hickel (1991), são descritos dez estágios fenológicos de floração com duração total de cerca de 40 dias (Figura 1), iniciando com pequenos botões globosos a partir das gemas floríferas (estágio B), que logo atingem o tamanho de uma pequena ervilha

(estágio C). Após 10 a 15 dias as pétalas tornam-se visíveis neste botão compacto (estágio D), ocorrendo o desabrochar no estágio seguinte (estágio E), chamado balão. Este ponto antecede a abertura das pétalas para exposição das anteras (estágio F1). Com a abertura total as anteras tornam-se totalmente visíveis e o estigma receptivo ao pólen (estágio F2). A deiscência das anteras ocorre somente no estágio seguinte, quando as pétalas ficam no sentido horizontal (estágio F3). Ocorre, então, a queda das pétalas (estágio G), dos estames (estágio H) e, por fim, do estilete (estágio I), no entanto geralmente as flores caem antes mesmo de atingirem o último estágio fenológico.

Figura 1 - Estágios Fenológicos do florescimento de goiabeira-serrana



Fonte: (DUCROQUET et al., 2000).

Desta forma, os principais prejuízos para a cultura, considerando o aspecto fitossanitário, são decorrentes da antracnose, doença fúngica causada por espécies dos complexos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum pseudoacutatum*, conforme descrito nos capítulos 3 e 4. Fungos do gênero *Colletotrichum*, além de infectarem os frutos, são responsáveis pela podridão do pedúnculo e podem gerar perdas de até 100% em plantas em plena frutificação (ARAÚJO; PINTO, 2018).

Recentemente, no Brasil, Fantinel et al. (2017) identificaram *Colletotrichum siamense* patogênico à goiabeira-serrana (Capítulo 1) causando manchas nos frutos de coloração escuras bem definidas de formato irregular que, após aumentarem de tamanho se tornaram deprimidas

e coalescidas, levando os frutos ao apodrecimento e, conseqüentemente, ocasionando diminuição de produtividade nos pomares.

Uma das características importantes de *Colletotrichum* spp. é a sua capacidade de sobreviver em estado de quiescência nas flores e nos frutos. A ocorrência e a manutenção do patógeno em quiescência sobre o hospedeiro ou dentro do mesmo indicam um equilíbrio dinâmico entre hospedeiro, patógeno e meio ambiente (JARVIS, 1994).

Conforme descrevem Agarwal e Sinclair (1996), a infecção de um patógeno em um determinado hospedeiro pode ocorrer principalmente através de duas maneiras: a) infecção local - via pericarpo e tegumento (no fruto) ou b) via sistêmica - através da flor, tanto através do sistema vascular pelo pedicelo, ou pela da colonização de estigmas, seguindo até a semente via tubo polínico. Considerando a goiabeira-serrana, não se conhece, até o momento, o mecanismo de infecção de *Colletotrichum* spp., a despeito do que ocorre com a goiaba-comum (*Psidium guajava* L.), onde a penetração de *Colletotrichum* spp. ocorre tanto via ferimentos no fruto como também pela cavidade floral (JUNQUEIRA, et al., 2001).

Estudos que envolvam o processo infeccioso de *Colletotrichum* spp., poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias eficientes de controle da antracnose em pomares de goiabeira-serrana de modo a evitar que os danos, em decorrência da doença, resultem na erradicação desta cultura que, cultivada em pequenas propriedades, apresenta grande importância social e econômica nas regiões em que seu plantio é difundido.

Nesse sentido, buscou-se através do presente estudo, verificar a incidência de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana das quatro cultivares comerciais: “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” em quatro diferentes estágios fenológicos de florescimento e constatar se o mecanismo de infecção deste patógeno acontece de maneira sistêmica, via estruturas florais.

Material e métodos

Foram coletadas flores sadias no mês de novembro na safra de 2017/2018 das quatro cultivares com potencial comercial: “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” nos dois Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de goiabeira-serrana existentes no Brasil. Os BAG's pertencem a EPAGRI e estão localizados no município de São Joaquim (SC), com altitude de 1415 m, latitude 28° 17' 25'' S e longitude 49° 56' 56'' W e no município de Lages (SC) com altitude de 926 m, latitude 27°48'27.6"S e longitude 50°19'46.3"W.

Após a coleta, as flores foram devidamente identificadas e transportadas em sacos de papel até o Laboratório de Fitopatologia- Elocy Minussi pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Em cada pomar das estações experimentais da EPAGRI dos municípios de Lages/SC e São Joaquim/SC, foram selecionadas aleatoriamente 10 goiabeiras-serrana de cada cultivar onde foram coletadas 100 flores sem sintomas aparentes de antracnose nos estágios fenológicos de florescimento B, E, F₂ e H (Figura 2).

Figura 2 - Estágios fenológicos de florescimento de goiabeira-serrana avaliados no presente estudo. B: Botão floral fechado; E: Desabrochar das peças florais; F₂: Flor completa após antese; H: Flor com estilete já com pétalas caídas.



Fonte: Autor.

Posteriormente, as amostras de flores foram desinfestadas através da imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% e água destilada e esterilizada por 1 min (POLETTTO, 2014). Em seguida, as flores foram acondicionadas em caixas plásticas transparentes do tipo *Gerbox* (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) dispostas sobre papel-filtro umedecido em água destilada esterilizada (Figura 3).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram compostos pelos estágios de desenvolvimento floral com 100 flores, divididas em quatro repetições de 25. As flores foram incubadas e mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas por um período de sete dias (POLETTTO et al., 2014).

Figura 3 – Teste de sanidade com flores de goiabeira-serrana acondicionadas em caixas plásticas transparentes do tipo *Gerbox*. A: botão floral fechado/estágio B; B: Peças florais desabrochando/estágio E; C: Flores completas/estágio F₂; D: presença de estilete e sépalas/estágio H.



Fonte: Autor.

A avaliação foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico e óptico aos sete dias para a visualização das estruturas do patógeno em qualquer parte da flor e a identificação dos fungos foi realizada com o auxílio da chave de identificação (BARNETT; HUNTER, 1999).

Fungos do gênero *Colletotrichum* foram contabilizados, expressos em porcentagem e transformados por $ARCSEN [(x+0,5)/(100)]^{1/2}$ para normalização, em seguida, submetidos à análise de variância. Em caso de significância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para estas análises, utilizou-se o programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2008).

Resultados e discussão

Foram identificados 24 gêneros fúngicos associados às flores de goiabeira-serrana nos quatro estágios fenológicos de florescimento. No entanto, como o presente trabalho deu ênfase

ao agente causal da antracnose, somente o gênero *Colletotrichum* foi quantificado. Os demais gêneros fúngicos estão descritos no quadro que consta no Anexo A (Quadro 1).

Foi possível constatar a incidência de *Colletotrichum* spp. infectando flores de goiabeira-serrana nas fases B, E, F₂ e H em ambos os locais de coleta (Lages e São Joaquim). Considerando a procedência Lages, a maior incidência média de *Colletotrichum* spp. ocorreu na cv. “Alcântara” independentemente do estágio floral analisado (32,5%). O estágio B apresentou a menor incidência média de *Colletotrichum* spp. entre as cultivares de goiabeira-serrana (3,25%), seguido dos estágios E e F₂ com 9 e 23,25% respectivamente. O estágio H diferiu significativamente dos demais nas duas procedências analisadas apresentando a maior incidência média de *Colletotrichum* spp. (74,25%) (Tabela 1).

A menor incidência média de *Colletotrichum* spp. ocorreu para a cv. “Helena” independentemente do estágio floral analisado (25%), seguido das cvs. “Mattos” e “Nonante” com 25,5 e 26,75% respectivamente.

Tabela 1 – Incidência (%) de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana em diferentes estágios fenológicos de florescimento oriundas de Lages (SC), submetidas ao teste de sanidade através do método de “Blotter Test”.

Estágios Florais	Cultivares				Média
	Helena	Mattos	Nonante	Alcântara	
B	5,0 Ac*	3,0 Ac	0,0 Bd	5,0 Ac	3,2
E	8,0 Ac	7,0 Ac	9,0 Ac	12,0 Ab	9,0
F ₂	25,0 Ab	16,0 Bb	29,0 Ab	23,0 Ab	23,2
H	62,0 Ba	76,0 Ba	69,0 Ba	90,0 Aa	74,2
Média (%)	25,0	25,5	26,7	32,5	
CV (%)					25,0

Fonte: Autor.

* Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Da mesma maneira, quando foram analisadas flores coletadas no município de São Joaquim, a cv. “Alcântara” apresentou maior incidência média de *Colletotrichum* spp. (38%), enquanto que a cv. com menor incidência média de *Colletotrichum* spp. foi “Mattos” (26,5%), seguida de “Nonante” e “Helena” (Tabela 2).

O estágio H diferiu significativamente dos demais em todas as procedências analisadas com incidência média de (88%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Incidência (%) de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana em diferentes estágios fenológicos de florescimento oriundas de São Joaquim (SC), submetidas ao teste de sanidade através do método de “Blotter Test”.

Estágios Florais	Cultivares				Média
	Helena	Mattos	Nonante	Alcântara	
B	5,0 Ac*	0,0 Bc	2,0 Ab	2,0 Ac	2,2
E	9,0 Ac	6,0 Bb	10,0 Ab	14,0 Ab	9,7
F ₂	17,0 Bb	10,0 Cb	24,0 Bb	40,0 Ab	22,7
H	86,0 Aa	90,0 Aa	80,0 Aa	96,0 Aa	88,0
Média (%)	29,2	26,5	29,0	38,0	
CV (%)					36,0

Fonte: Autor.

* Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A maior incidência média de *Colletotrichum* spp. em flores da cv. “Alcântara” pode estar relacionada com o fato dessa cultivar ser suscetível à antracnose quando comparada com as demais cultivares com potencial comercial, conforme estudo detalhado no capítulo 4.

Seguindo essa premissa, a cv. “Mattos” apresentou a menor incidência média de *Colletotrichum* spp. nas flores, foi a que se mostrou resistente à antracnose para todas as espécies de *Colletotrichum* testadas no estudo do capítulo 4 (*C. nymphaeae*, *C. theobromicola*, *C. fructicola* e *C. pseudoacutatum*).

É importante destacar que a incidência do patógeno desde as fases iniciais da floração até as finais, presume que a presença do inóculo já está homoganeamente distribuída nas áreas de coleta.

Considerando os estágios fenológicos de florescimento, as maiores infecções por *Colletotrichum* spp. se deram no último estágio floral analisado (H) para ambas as procedências (Lages e São Joaquim). Este resultado, pode estar relacionado com o maior tempo de permanência dessas flores (em estágio mais avançado de florescimento) nos locais de coleta.

Segundo Michailides e Elmer (2000), de maneira geral, o processo de infecção de *Colletotrichum* spp. pode ocorrer durante o período de floração onde pétalas e anteras são infectadas e o patógeno passa a se desenvolver até atingir as sépalas e o receptáculo. Como estas partes florais estão diretamente em contato com os frutos, acabam infectando-o e provocando seu apodrecimento nas fases pré e pós-colheita.

Poletto et al. (2014), em estudo conduzido com fungos associados à flores de nogueira-pecã (*Carya illinoensis*), evidenciaram a importância do conhecimento dos patógenos que se

associam com as flores, na medida que os mesmos podem infectar os frutos, e levar a perdas diretas na produção.

De fato, em vários outros patossistemas, as flores são consideradas porta de entrada de muitos patógenos, que posteriormente podem infectar os frutos. Como ocorre nos citros (*Citrus* spp.) onde a ocorrência da podridão floral dos citros (PFC), causada pela infecção de flores por *C. acutatum*, acarreta a abscisão de frutos jovens (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Segundo Batista e Barbosa (2008) que estudaram a antracnose em mangueira (*Mangifera indica* L.), os períodos críticos de infecção de *Colletotrichum* spp. correspondem justamente as fases de florescimento. Em inflorescências, os sintomas se iniciam com pontuações escuras, que se tornam alongadas e profundas e provocam a morte de flores e queda de frutos.

Na cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), a incidência de *Colletotrichum* spp. em flores acarreta uma doença conhecida como flor preta. Os sintomas em condições de campo são a necrose progressiva dos pedúnculos e demais partes dos órgãos florais, culminando com a seca e morte das flores (WILSON et al., 1993). Os frutos pequenos e em crescimento também podem ser atacados adquirindo coloração escura e tornam-se mumificados (HENZ; REIFSCHNEIDER, 1990).

Mais recentemente, Carvalho e Amaral (2018), identificaram *Colletotrichum* spp. associados a botões florais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense*), causando lesões necróticas nas flores, tornando inviável a produção de frutos. Fischer et al. (2019) em estudo de epidemiologia em abacateiro (*Persea americana*), detectaram após cinco dias de incubação, acérvulos e conídios de *Colletotrichum* spp. causando lesões típicas de antracnose, abortamento de flores e infecções quiescentes em abacates.

No presente trabalho, no momento da coleta, nenhuma flor de goiabeira-serrana apresentava sintoma aparente de antracnose. No entanto, como o patógeno foi identificado posteriormente em testes laboratoriais, pode-se inferir que o mesmo se encontrava em período de quiescência/latência ou de maneira endofítica.

Fungos do gênero *Colletotrichum* são comumente conhecidos por apresentar esse tipo de estratégia (MUIRHEAD; DEVERALL 1981; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004;). Não se tem conhecimento a respeito do tempo de duração da fase de quiescência em flores e frutos de goiabeira-serrana. Para a cultura da maçã (*Malus* spp.), a fase quiescente de *Colletotrichum* spp. que infecta flores pode variar de duas a três semanas, enquanto que para os frutos, essa fase pode durar vários meses (DELGADO, 2016).

De acordo com Diéguez-Uribeondo et al. (2005), as etapas iniciais da infecção pelas espécies de *Colletotrichum* são bastante similares. Primeiramente, o conídio aderido à superfície do hospedeiro germina, o tubo germinativo cresce e se desenvolve formando um micélio que forma um conídio secundário ou apressório. Este forma um ‘peg’ de penetração que invade diretamente a cutícula e a parede das células. Segundo Bailey et al. (1992), há dois tipos de estratégias de colonização por espécies de *Colletotrichum*: intracelular hemibiotrófico e subcuticular-intramural necrotrófico. Os patógenos com estratégia intracelular hemibiotrófica invadem as células por um período curto mantendo-as vivas, aparentemente, para a sua nutrição, e então convertem, para a fase necrotrófica matando a célula (PERFECT et al., 1999).

Pode-se inferir, que no presente trabalho, na medida em que o patógeno encontrou condições favoráveis de temperatura e umidade para seu desenvolvimento (condições de incubação), o período de latência foi superado e o mesmo passou a apresentar os seus sinais.

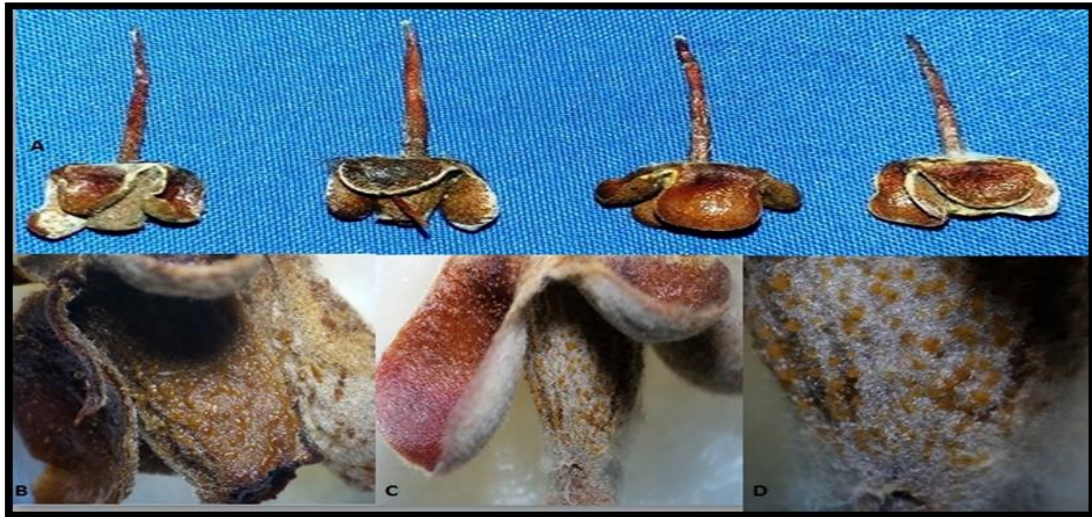
A infecção de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana das cvs. “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” foi confirmada pela sua esporulação em pétalas, ovário, óvulos e estames em flores nos estágios E e F₂ aos sete dias de incubação conforme pode-se observar na Figura 4.

Figura 4 – Incidência de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana. A: Infecção de *Colletotrichum* spp. em pétalas de flores do estágio E. B: Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos, no detalhe frutos já apresentando sintomas de antracnose. C: estames de flores em estágio F₂ de florescimento infectados com *Colletotrichum* spp. no detalhe os acérvulos em coloração alaranjada.



No estágio H de fenologia floral foi verificada a presença de *Colletotrichum* spp. infectando os estiletes bem como sépalas e os frutos formados (Figura 5).

Figura 5 – Incidência de *Colletotrichum* spp. em flores de goiabeira-serrana em estágio H de fenologia floral. A: Infecção de *Colletotrichum* spp. em sépalas e estilete de flores. B/C/D: Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos, no detalhe os pontos alaranjados são acérvulos de *Colletotrichum* spp..



Fonte: Autor.

Essas flores, se em condições de campo, possivelmente não produziriam frutos, ou mesmo que haja o desenvolvimento dos frutos, os mesmos não serão saudáveis. Os mesmos sintomas presentes nas flores apresentadas na Figura 5, foram descritos por Blood et al. (2014), que confirmaram a infecção de *Colletotrichum* spp. em flores de caquizeiro das cvs. “Fuyu” e “Kakimel” através da esporulação em ovários e na base das sépalas.

O conhecimento acerca do mecanismo de infecção de *Colletotrichum* spp. em goiabeira-serrana é fundamental e auxilia no desenvolvimento de estratégias de controle da antracnose uma vez que os sintomas causados por este patógeno se desenvolvem principalmente em pós-colheita (com o fruto maduro), mas refletem, todavia, os fatores que ocorreram em pré-colheita, como, por exemplo, os tratos culturais incorretos.

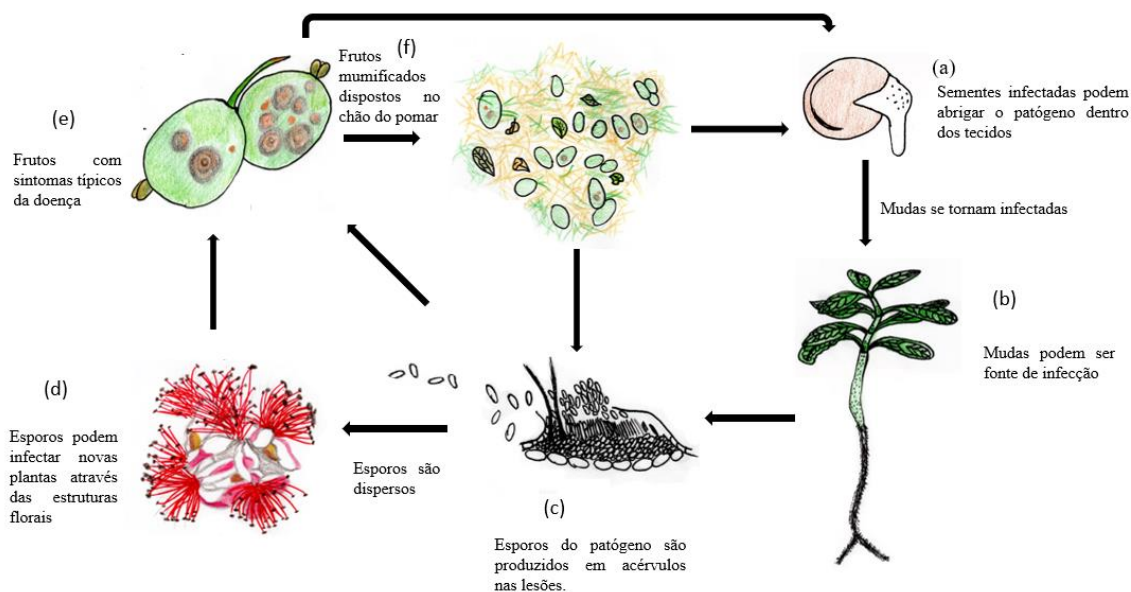
É importante salientar que a principal forma de propagação de goiabeira-serrana é via sexuada (seminal), principalmente quando as mudas são utilizadas para a produção de porta-enxertos na qual são enxertadas as cvs. de interesse comercial (SANTOS et al., 2011).

Considerando que a infecção de *Colletotrichum* spp. em goiabeira-serrana ocorre de maneira sistêmica, via estruturas florais, e que em estudos anteriores Fantinel et al. (2017) constataram a transmissão deste patógeno via semente para plântula, é provável que este fungo

infecte as sementes já no processo de formação das mesmas, através dos óvulos. No entanto, o sucesso de *Colletotrichum* spp. como agentes patogênicos é determinado, quase exclusivamente, pelo modo como infectam e colonizam os tecidos hospedeiros. Os seus modos de ação são muito variáveis, indo desde o endofítico até ao necrotrófico e têm sido alvo de extensas revisões (PERFECT et al., 1999; PERES et al., 2005; DE SILVA et al., 2017).

Uma vez que o ciclo de vida de *Colletotrichum* spp. em goiabeira-serrana não é bem esclarecido (Araújo e Pinto, 2018), sugere-se, com o presente estudo, que a fonte inóculo de *Colletotrichum* spp. em pomares de goiabeira-serrana, em área sem histórico de ocorrência da antracnose, pode ser proveniente de sementes infectadas pelo patógeno através das estruturas florais (Figura 6a e 6b).

Figura 6 – Ciclo da antracnose em *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg. causada por *Colletotrichum* spp.



Fonte: Autor.

Na fase de floração, as flores podem ser infectadas e permanecer infectadas assintomaticamente desde os estádios iniciais de floração até ao desenvolvimento dos frutos. É possível que isolados de *Colletotrichum* spp. estejam presentes no cálice, pétalas, estames e pistilo das flores, sendo capazes de esporular (Figuras 4 e 5).

Nas áreas onde já ocorreu a doença, a fonte de inóculo primário pode ser o próprio solo ou restos de cultura, como frutos infectados ou mumificados (Figura 6e e 6f), onde o patógeno consegue sobreviver por um longo período.

Com o desenvolvimento da doença, as mudas infectadas, as flores e os frutos mumificados servirão como fonte de inóculo para outras plantas (Figura 6b, 6d e 6f).

A disseminação do patógeno pode ser rápida quando não é feito o controle efetivo da doença. Nesse sentido, a utilização de métodos culturais, através da remoção de flores e frutos doentes/mumificados, pode reduzir a pressão do inóculo dentro dos pomares.

Enfim, o conhecimento acerca da variabilidade dos isolados de *Colletotrichum* predominantes em goiabeira-serrana, através da análise multigênica, bem como a utilização de cultivares preferenciais do ponto de vista fitossanitário são fundamentais, pois fornecem subsídios para a construção de modelos epidemiológicos mais detalhados que possam, em breve, ser aplicados por melhoristas para a implementação de estratégias de controle da doença. Nesse sentido, os próximos capítulos versarão sobre estes temas fundamentais na caracterização do patossistema: *Colletotrichum* spp. x goiabeira-serrana.

Conclusão

1. O mecanismo de infecção de *Colletotrichum* spp. ocorre de forma sistêmica via estruturas florais.
2. O estágio H de fenologia floral apresentou a maior incidência de *Colletotrichum* spp.;
3. As cvs. “Alcântara” e “Mattos” apresentaram a maior e a menor incidência média de *Colletotrichum* spp. respectivamente.

Agradecimentos

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida e ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em pesquisa (PQ) para Marlove Fátima Brião Muniz.

À EPAGRI, em nome da Sra. Marlise Ciotta pela parceria e comprometimento em atender às demandas que surgiram na fase de coleta das flores nos BAG's.

Referências Bibliográficas

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. 539 p.

ARAÚJO, L.; PINTO, F.A.M.F. Principais doenças e seu controle. In: CIOTTA, M.N.; ARIOLI, C.J.; PINTO, F.A.M.F.; SANTOS, K. dos; ARAUJO, L.; PASA, M. da S. (Orgs.). **A cultura da goiabeira-serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p. 147-166.

BAILEY, J.A & JEGER, M.J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. **Kew. CAB International**. 1995.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. 1992. *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. England: CAB Internacional Wallingford, 338 p.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustred genera of imperfect fungi**. 3 Ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 241 p.

BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G. Doenças da mangueira. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA, 1.; FEIRA NACIONAL DA AGRICULTURA IRRIGADA - FENAGRI, 2008, Petrolina. Minicursos. Petrolina: Prefeitura Municipal: **Anais**. Embrapa Semiárido, 2008.

BLOOD, R. R. Y.; ROZWALKA, L. C.; MAY DE MIO, L. L.. Antracnose do caqui em campo causada por *Colletotrichum horii*: incidência em ramos, folhas, flores e frutos em campo. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 37, n. 2, p. 335-345, June 2015.

CARVALHO, F.; AMARAL, D. (2018). Ocorrência de antracnose em pequizeiro na região do triângulo mineiro, Minas Gerais. **Agrarian Academy**. 5. 10.18677/Agrarian_Academy_2018a41.

DE SILVA, D.D., CROUS, P.W., ADES, P.K., HYDE, K.D., TAYLOR, P.W.J. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biol Rev**. 2017;31:155–68.

DELGADO MÉNDEZ, ZAMIRA, D., et al. **Caracterização da patogenicidade de isolados de *Colletotrichum fructicola* em frutos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) em diferentes estágios de desenvolvimento**. 2016.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J, FÖRSTER, H; SOTO-ESTRADA, A.; ADASKAVEG, J. E. Subcuticular-Intracellular Hemibiotrophic and Intercellular Necrotrophic Development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. **Phytopatology**, St. Paul, v. 95, n. 7, p. 751-758, Sept. 2005.

DUCROQUET, J. P. H. J.; HICKEL, E. R. Fenologia da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg) no alto vale do Rio do Peixe, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 13, n. 3, p. 313-320, 1991.

DUCROQUET, J.P.H.J., NUNES, E.C., GUERRA, M.P., NODARI, R.O. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. **Agropecuária Catarinense**, 2008, v. 21, p.79-82.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Série frutas nativas 5. Jaboticabal: Funep, 2000, 66p.

DUCROQUET, J.P.H.J.; SANTOS, K.L.; ANDRADE, E.R.; BONETI, J.I.S.; BONIN, V.; NODARI, R.O. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n.1, p. 77-80, 2007.

FANTINEL, V. S., MUNIZ, M. F. B., BLUME, E., ARAÚJO, M. M., POLETTO, T., da Silva, T. T., HARAKAVA, R. (2017). First Report of *Colletotrichum siamense* Causing Anthracnose on *Acca sellowiana* Fruits in Brazil. **Plant Disease**, 101(6), 1035-1035.

FANTINEL, V. S.; DE OLIVEIRA, L. M.; CASA, R. T. et al. Fungos associados às sementes de *Acca sellowiana*: efeitos na qualidade fisiológica das sementes e transmissão. **Agrarian**, v.10, n.38, p.328-335, 2017.

FEICHTENBERGER, E., MÜLLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN, A.F., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v.2, p.280-284.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Minas Gerais, v.6, n. 2, p.36-41, 2008.

FISCHER, I.H., et al. Detection and epidemiological progress of quiescent avocado diseases. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 8, e20180731, 2019.

HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Surto de antracnose em morangueiro no Distrito Federal. **Hort. Bras.**, 8: 28, 1990.

JARVIS, W.R.; Latent infections in the pre and postharvest environment. **HortScience** 29:749-751, 1994.

JUNQUEIRA, N.T.V. et al. (2001). **Doenças da goiabeira no Cerrado**. Circ Téc (Embrapa Cerrados) 15:1–31.

KELLER, H.A.; TRESSSENS, S.G. Presencia en Argentina de dos espécie de uso múltiple: *Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). **Darwiniana**, v.45, n.2, p.204-212, 2007.

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M. **Mirtáceas. Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, p.624-629, 1977.

MARCHIORI, J. N. C. e SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: myrtales**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997. 304p.

MATTOS, J.R. **A goiabeira-serrana**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

MICHAILIDES, T.J., ELMER, P.A.G. *Botrytis* gray mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. **Plant Disease**, 84, 208– 23, 2000.

MORTON, J.F. **Feijoa**. In: Fruits of warm climates. Miami: Julia F. Morton, p.367-370, 1987.

MUIRHEAD, I.F.; DEVERALL, B.J. Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 19, n.1, p. 77–84, July 1981.

PERFECT, S.E., et al.. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. **Fungal Genetics and Biology** 27:186– 198. 1999.

POLETTI, T.; et al.. Fungos associados às flores e frutos da noqueira-pecã (*Carya illinoensis*). **Revista de Ciências Ambientais**, v. 8, n. 1, p. 05-13, 2014.

PRUSKY, D., LICHTER, A. Activation of quiescent infections by postharvest Pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. **FEMS Microbiology Letters**, 268: 1-8, 2007.

SANTOS, K.L. et al. *Acca sellowiana*. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília, MMA, cap.5, p. 111-130, 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III**. 3ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.640p.

STEWART, A.M.; CRAIG, J.L. Factors affecting pollinator effectiveness in *Feijoa sellowiana*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.17, p.145–154, 1987.

THORP, G.; BIELESKI, R. Feijoas: origins, cultivation and uses. Auckland, N.Z.: **HortResearch**. Ed. David Bateman, 2003, 87p.

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

WILSON, L.L.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. Comparison of conidial germination and strawberry fruit infection by three *Colletotrichum* species. **Phytopathology**, 83: 1390, 1993.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE EM GOIABEIRA-SERRANA

Resumo – A goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg) é uma árvore frutífera nativa do sul do Brasil e norte do Uruguai. A espécie possui grande importância econômica devido a produção e comercialização dos seus frutos que são ricos em propriedades nutraceuticas. No Brasil, é cultivada em unidades de produção familiares no planalto serrano catarinense e na serra gaúcha, na qual ganha destaque no processo de diversificação da produção e no desenvolvimento local e regional. Entretanto, a antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum* é o principal problema fitossanitário que afeta a cultura e pode acarretar perdas de até 100% na produção dos frutos. A identificação precisa do agente causal da antracnose é fundamental para compreender a epidemiologia e efetuar o controle desta doença. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi caracterizar morfofisiológica e molecularmente 49 isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de goiaba-serrana com sintomas de antracnose coletados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e no Departamento de Salto no Uruguai. Inicialmente avaliou-se a influência dos meios de cultura Mathur, BDA, V8, cenoura-ágar e aveia no crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum* spp.. A abordagem morfológica foi realizada em culturas monospóricas em meio Mathur, as quais foram avaliadas quanto ao crescimento micelial, tamanho, formato dos conídios, esporulação, cor e aspecto das colônias. Os isolados foram agrupados por meio das características morfológicas quantitativas, em oito grupos distintos. A identificação dos isolados foi confirmada com a análise *multilocus* através da extração do DNA e da amplificação das regiões ITS-rDNA, Actina (ACT) e β -tubulina (TUB2) de ao menos um isolado representativo de cada grupo morfológico. O meio Mathur proporcionou maior média de esporulação e a menor de crescimento micelial. Foi observada alta variabilidade morfométrica e houve sobreposição dos caracteres morfológicos entre os isolados o que inviabilizou a classificação dos mesmos em nível de espécie *sensu stricto*. No entanto, a maioria dos isolados apresentou morfometria dos conídios compatíveis com espécies dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. A análise molecular indicou que, nos estados do RS, SC, PR e no Departamento de Salto no Uruguai, a antracnose da goiabeira-serrana pode ser causada por uma espécie do complexo *C. acutatum*: *C. nymphaeae*, duas espécies do complexo *C. gloeosporioides*: *C. theobromicola* e *C. fructicola* e por uma espécie que não pertence a nenhum complexo devido às suas características peculiares: *C. pseudoacutatum*. Estes resultados são fundamentais para estudos sobre resistência de cultivares e para o manejo integrado da antracnose em pomares de goiabeira-serrana.

Palavras-chave: *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg; antracnose; filogenia

Abstract - *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg, popularly known as feijoa, is a fruit tree native to southern Brazil and northern Uruguay. The species has great economic importance due to the production and marketing of its fruits that are rich in nutraceutical properties. It is grown in family production units in the highlands of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, where it stands out in the process of production diversification and in local and regional development. However, anthracnose, a disease caused by fungi of the genus *Colletotrichum*, is the main phytosanitary problem that affects the crop and can lead to

losses of up to 100% in fruit production. Accurate identification of the causal agent of anthracnose is critical to understanding epidemiology and effectively controlling this disease. Thus, the objective of this study was the morphophysiological and molecular characterization of 49 isolates of *Colletotrichum* spp. associated with fruits of guava-tree with symptoms of anthracnose collected in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná and the Department of Salto in Uruguay. The influence of the Mathur, BDA, V8, carrot agar and oats culture media on the mycelial growth and sporulation of *Colletotrichum* spp. Was evaluated. mycelial size, conidia shape, sporulation, color and appearance of the colonies. Isolates were grouped by quantitative morphological characteristics into eight distinct groups. Identification of the isolates was confirmed by multilocus analysis by DNA extraction and amplification of the ITS-rDNA, Actin (ACT) and β -tubulin (TUB2) regions from at least one representative isolate of each morphological group. Mathur medium provided the highest sporulation average and the lowest mycelial growth. High morphometric variability was observed and morphological characters overlapped among the isolates, which made their classification at sensu stricto level impossible. However, most isolates presented conidia morphometry compatible with *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* species. Molecular analysis indicated that, in the states of RS, SC, PR and the Department of Salto in Uruguay, anthracnose of guava-serrana may be caused by one species of the *C. acutatum* complex: *C. nymphaeae*, two species of the *C. gloeosporioides* complex: *C. theobromicola* and *C. fructicola* and by a species that does not belong to any complex due to their peculiar characteristics: *C. pseudoacutatum*. These results are fundamental for studies on cultivar resistance and for the integrated management of anthracnose in guava-serrana orchards.

Keywords: *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg; anthracnose; phylogeny.

Introdução

Feijoa sellowiana (O. Berg) O. Berg (Myrtaceae), popularmente conhecida como feijoa, goiaba da serra, goiabeira-serrana ou goiaba-serrana, é uma frutífera oriunda do planalto meridional brasileiro e norte do Uruguai (SANTOS et al., 2011). Apresenta frutos aromáticos com polpa clara e doce acidulado, ricos em propriedades nutracêuticas, vitaminas, minerais e metabólitos secundários com propriedades antibacterianas e antioxidantes (WESTON, 2010; PASQUARIELLO et al., 2015).

Segundo Thorp e Bieleski (2002) a espécie já foi introduzida e aclimatada em países como França, Estados Unidos da América, Colômbia e Nova Zelândia, sendo os dois últimos os maiores produtores e exportadores dos frutos. No entanto, no Brasil, os processos de domesticação e caracterização da goiabeira-serrana têm se mostrado cada vez mais promissores, especialmente a partir do ano de 2007 após o lançamento das primeiras cultivares comerciais: “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” (DUCROQUET et al., 2007, 2008).

No Brasil, os pomares de goiabeira-serrana situam-se em maior parte no planalto serrano catarinense e na serra gaúcha em unidades de produção familiares. No entanto, a produção dos frutos é pequena e insuficiente para atender aos consumidores, colocando o Brasil em situação de importador dos frutos produzidos sobretudo na Colômbia (MORETTO, 2014). O estabelecimento de um mercado sólido visando a produção de goiabas-serrana em escala comercial no Brasil, além de outros fatores, está intrinsecamente ligado com a qualidade fitossanitária dos pomares. Nesse sentido, o principal problema fitossanitário que atinge os pomares é uma doença conhecida como antracnose que tem como agente causal fungos do gênero *Colletotrichum*. Esta doença, quando não manejada corretamente, pode causar perdas de até 100% na produção dos frutos (FANTINEL, et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018).

Os sintomas da antracnose são observados rotineiramente em todas as cultivares de goiabeira-serrana e iniciam no final da fase de crescimento dos frutos, embora *Colletotrichum* spp. possa infectar a planta desde a formação dos frutos através das estruturas florais permanecendo em estado latente/quiescente ou endofítico (Capítulo 2). Frutos infectados, quando sintomáticos, exibem manchas marrom escuras, levemente circulares e deprimidas, cujo centro pode apresentar massa de coloração alaranjada contendo esporos fúngicos, que, também, podem progredir para o interior da polpa, causando o seu apodrecimento (FANTINEL et al., 2017).

O gênero *Colletotrichum* compreende várias espécies que causam antracnose em uma série de culturas agrícolas, plantas ornamentais e frutíferas em todo mundo causando graves prejuízos econômicos especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (SUTTON, 1980; HYDE et al., 2009; CAI et al., 2009). Tradicionalmente, a identificação de espécies deste gênero tem se baseado em critérios descritivos clássicos como a forma e tamanho de conídios, presença ou ausência de setas e morfologia da colônia como cor, topografia da colônia e taxa de crescimento (SUTTON, 1980; HYDE et al., 2009).

No entanto, a identificação baseada somente nos critérios morfológicos é inconclusiva para a diferenciação entre as espécies de *Colletotrichum* devido as mesmas apresentarem grande plasticidade morfológica que variam com fatores ambientais, condições de incubação como meio de cultura e temperatura (HYDE et al., 2009; WEIR et al., 2012).

Atualmente, para uma abordagem confiável das espécies de *Colletotrichum*, as análises necessariamente devem incluir a utilização de marcadores genéticos ao nível

molecular (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012; O'CONNELL et al., 2012; WEIR et al., 2012; DAMM et al., 2013; UDAYANGA et al., 2013).

Nesse sentido, a região do Espaço Interno Transcrito (ITS) é útil na construção de relações interespecíficas, mas não é um marcador ideal para inferir relações infraespecíficas (CAI et al., 2009). Dessa maneira, os mesmos autores sugerem o uso de múltiplos marcadores para diferenciar as espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* e várias regiões do genoma do gênero *Colletotrichum* vêm sendo analisadas em conjunto com a região ITS, entre as quais a β - tubulina (TUB2), Fator de alongação (TEF 1 α), Actina (ACT), Calmodulina (CAL), Glutamina sintetase (GS), Quitina sintetase (CHS), Histona (HIS), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (PRIHASTUTI et al., 2009; CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2013; SHARMA et al., 2013).

Embora a antracnose tenha sido observada em goiabeira-serrana pela primeira vez no Brasil no ano de 1989 em um pomar localizado no município de Videira no estado de Santa Catarina por Andrade e Ducroquet (1993), não existiam estudos que comprovassem geneticamente a existência de *Colletotrichum* spp. associados a este hospedeiro nas condições ambientais brasileiras. Assim, com o advento das técnicas de análises multigênicas foi possível a publicação do primeiro relato no Brasil (Capítulo 1) de *Colletotrichum siamense* como agente causal da antracnose em goiabeira-serrana (FANTINEL et al., 2017). A mesma doença também foi relatada na Nova Zelândia (LEARDNER, 1999) e mais recentemente na Itália (CAMELE, 2018) em ambos os países o agente causal é *C. acutatum sensu lato*.

De acordo com Sutton (1980) e Damm et al. (2010) as análises em nível molecular, permitiram constatar que algumas espécies do gênero *Colletotrichum* são estritamente relacionadas (morfológica e filogeneticamente) e são agrupadas em complexos. Cannon et al. (2012) relatam que existem, pelo menos, nove clados neste gênero. Destes clados, se destacaram como mais importantes, os complexos de espécies *C. gloeosporioides* com 22 espécies, *C. acutatum* com 29 espécies, *C. boninense* com 17 espécies e *Colletotrichum truncatum* com 3 espécies. Em todos estes complexos estão incluídas importantes espécies de fitopatógenos. Além dos nove clados neste gênero, há várias espécies que são isoladas em termos filogenéticos e não se agrupam em nenhum dos complexos de espécies estabelecidos, sendo elas *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum trichellum*, *Colletotrichum pseudoacutatum*, *Colletotrichum cliviae*, *Colletotrichum yunnanense* e *Colletotrichum dracaenophilum*.

Inexistem, em nível mundial, estudos sobre a caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiabeira-serrana utilizando uma ampla coleção de isolados, representativa de diferentes regiões de ocorrência. A correta identificação e caracterização da diversidade das espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose em goiabeira-serrana deve aliar técnicas morfológicas e moleculares e é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença.

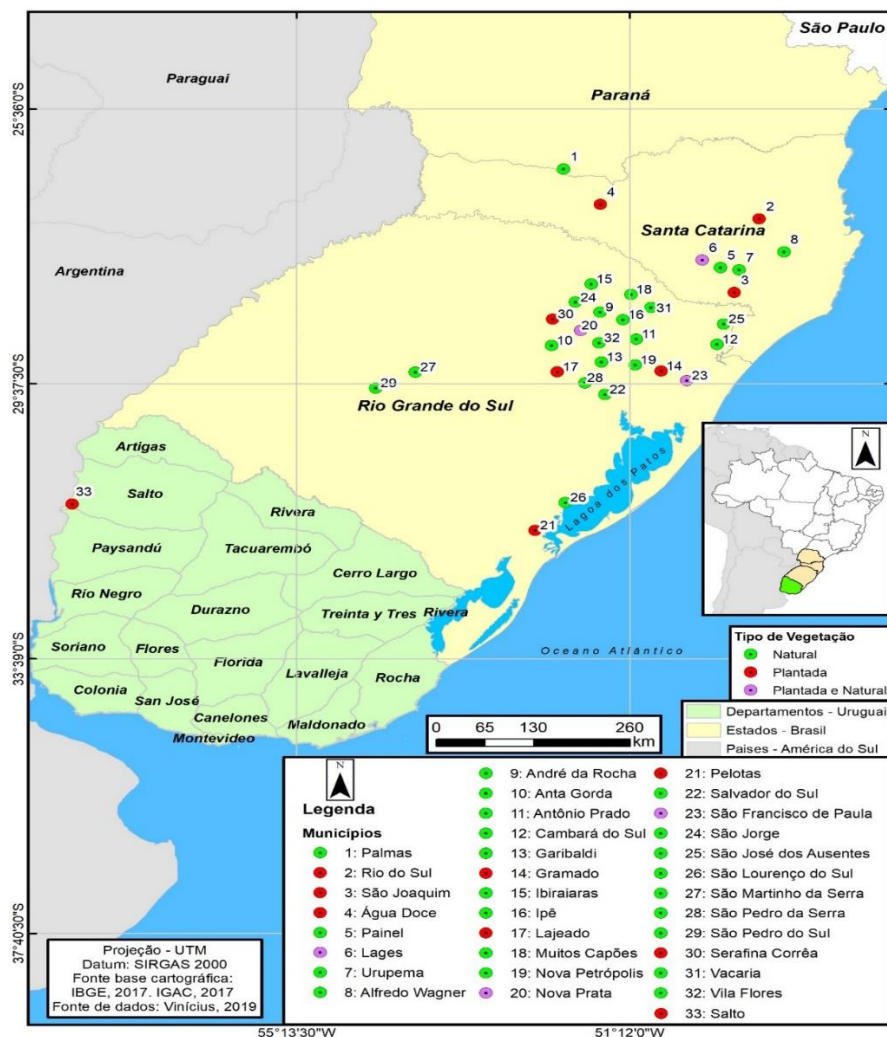
Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade morfofisiológica e molecular as espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose em goiabeira-serrana em sua área de ocorrência natural.

Material e Métodos

Coleta e preparação dos isolados

As coletas dos isolados de *Colletotrichum* spp. foram realizadas em áreas com ocorrência espontânea, pomares comerciais e em áreas experimentais em municípios, localizados nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e no Uruguai, abrangendo, dessa maneira, praticamente toda área de ocorrência natural da goiabeira-serrana (Figura 1).

Figura 1 - Municípios dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e do Uruguai onde foram realizadas coletas de isolados de *Colletotrichum* spp.



Fonte: (IBGE, 2017).

Foram coletados 49 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos sintomáticos de goiaba-serrana e a identificação dada a cada um encontra-se na Tabela 1. As letras maiúsculas fazem alusão ao município em que os isolados foram coletados, se no município houve mais de um local de coleta, a identificação foi acrescentada por número (Tabela 1).

Tabela 1 – Áreas de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de pomares de goiaba-serrana no RS, SC e PR e Uruguai

(continua)

Isolados	Data de coleta	Cidade/Estado/País	Coordenadas (GMS)
SPS	mar/16	São Pedro do Sul - RS/BR	29°59'32"S 54°10'84"W
SMS	mar/16	São Martinho da Serra - RS/BR	29°30'25.3"S 53°53'50.7"W

Tabela 1 – Áreas de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de pomares de goiaba-serrana no RS, SC e PR e Uruguai

				(continuação)
LAJ	fev/17	Lajeado - RS/BR	29°27'35.3"S 51°59'51.9"W	
SPSR	mar/17	São Pedro da Serra -RS/BR	29°25'01.6"S 51°31'15.4"W	
SVS	mar/17	Salvador do Sul - RS/BR	29°26'37.4"S 51°31'12.9"W	
GRA	fev/17	Gramado -RS/BR	29°23'36.9"S 50°53'08.3"W	
IPE-1	fev/17	Ipê -RS/BR	28°45'39.4"S 51°23'06.1"W	
IPE-2	fev/17	Ipê -RS/BR	28°48'20.0"S 51°17'40.5"W	
IPE-3	fev/17	Ipê -RS/BR	28°48'20.3"S 51°17'42.5"W	
NPT-1	fev/17	Nova Prata -RS/BR	28°45'57.7"S 51°37'24.9"W	
NPT-2	fev/17	Nova Prata -RS/BR	28°46'40.8"S 51°36'33.8"W	
ATP	fev/17	Antônio Prado - RS/BR	28°54'23.9"S 51°14'10.9"W	
VIF-1	fev/17	Vila Flores -RS/BR	28°52'11.9"S 51°33'05.7"W	
VIF-2	fev/17	Vila Flores -RS/BR	28°52'38.2"S 51°30'32.5"W	
SEC	fev/17	Serafina Corrêa -RS/BR	28°42'44.5"S 51°55'42.7"W	
NVP	fev/17	Nova Petrópolis -RS/BR	29°20'51.4"S 51°00'07.0"W	
GAR	fev/17	Garibaldi -RS/BR	29°15'45.0"S 51°31'34.8"W	
IBI-1	fev/17	Ibiraiaras -RS/BR	28°16'30.9"S 51°37'23.5"W	
IBI-2	fev/17	Ibiraiaras -RS/BR	28°21'58.1"S 51°33'16.0"W	
IBI-3	fev/17	Ibiraiaras -RS/BR	28°20'28.9"S 51°36'02.3"W	
ANG	mar/16	Anta Gorda -RS/BR	28°57'31.5"S 52°00'40.6"W	
SJG-1	fev/17	São Jorge -RS/BR	28°29'53.3"S 51°43'35.0"W	
SJG-2	fev/17	São Jorge - RS/BR	28°29'16.8"S 51°42'26.9"W	
SJG-3	fev/17	São Jorge - RS/BR	28°28'24.5"S 51°43'58.1"W	
ADR	fev/17	André da Rocha -RS/BR	28°37'50.4"S 51°34'34.5"W	
SFP-1	fev/17	São Francisco de Paula -RS/BR	29°27'56.5"S 50°29'48.8"W	
SFP-2	fev/17	São Francisco de Paula -RS/BR	29°26'24.9"S 50°34'50.8"W	
SJA	fev/17	São José dos Ausentes -RS/BR	28°34'23.0"S 49°54'41.1"W	
CAM	fev/17	Cambará do Sul - RS/BR	28°53'01.3"S 50°01'45.4"W	
VAC	fev/17	Vacaria -RS/BR	28°53'01.3"S 50°01'45.4"W	
MTC	fev/17	Muitos Capões -RS/BR	28°20'13.7"S 51°09'12.0"W	
PEL-1	mar/16	Pelotas - RS/BR	31°40'47.8"S 52°26'21.2"W	
PEL-2	mar/16	Pelotas - RS/BR	31°40'47.7"S 52°26'22.4"W	
SLS-1	mar/16	São Lourenço do Sul - RS/BR	31°10'19.5"S 52°06'19.4"W	
SLS-2	mar/16	São Lourenço do Sul - RS/BR	31°09'53.7"S 52°12'07.1"W	
LAG-1	fev/17	Lages -SC/BR	27°48'27.6"S 50°19'46.3"W	
LAG-2	fev/17	Lages -SC/BR	27°48'28.0"S 50°19'46.3"W	
LAG-3	fev/17	Lages -SC/BR	27°48'50.9"S 50°29'02.1"W	
PNL	fev/17	Painel -SC/BR	27°55'17.0"S 50°05'55.6"W	
UPM	fev/17	Urupema - SC/BR	27°57'02.3"S 49°56'04.6"W	
SJ-1	fev/17	São Joaquim - SC/BR	28°16'29.2"S 49°56'16.8"W	
SJ-2	fev/17	São Joaquim - SC/BR	28°16'30.1"S 49°56'19.7"W	

Tabela 1 – Áreas de coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de pomares de goiaba-serrana no RS, SC e PR e Uruguai

				(conclusão)
SJ-3	fev/17	São Joaquim - SC/BR	28°16'06.7"S 49°55'14.8"W	
SJ-4	fev/17	São Joaquim - SC/BR	28°06'15.3"S 50°03'01.3"W	
RIS	mar/17	Rio do Sul - SC/BR	27°11'03.8"S 49°39'37.2"W	
ALW	mar/17	Alfredo Wagner - SC/BR	27°40'44.3"S 49°10'34.5"W	
AGD	mar/17	Água Doce - SC/BR	26°51'04.5"S 51°33'08.1"W	
PAM	mar/17	Palmas -PR/BR	26°28'31.3"S 51°57'05.9"W	
URU	mar/17	Salto - ST/UY	31°23'29.2"S 57°57'29.2"W	

Fonte: Autor.

Dentre os locais, 31 isolados foram coletados em áreas com ocorrência natural da espécie como, por exemplo, nos cursos de rios, nos remanescentes florestais e na Floresta Ombrófila Mista (Figura 1 e Figura 2).

Os demais isolados (18) foram coletados em áreas experimentais (EPAGRI/SC e UDELAR/Salto UY), áreas com plantios comerciais e ainda na arborização urbana. As coletas em diferentes locais e formas de ocorrência (natural ou plantada) permite a análise de frutos com uma grande diversidade fenotípica com pode ser observado na Figura 3.

Figura 2 – Áreas de coleta de goiaba-serrana. A: Exemplos em área de arborização urbana; B: Exemplo em área de Floresta Ombrófila Mista; C: Exemplo na beira de córrego; D/E: Áreas Experimentais; F/G: Plantios comerciais de goiaba-serrana, no detalhe como são coletadas.



Fonte: Autor.

Figura 3 - Diversidade Fenotípica de goiaba-serrana em alguns locais de coleta. Barra = 3 cm.



Fonte: Autor.

Foram coletados frutos sintomáticos tanto na árvore em estágio intermediário de maturação ou após a queda (Figura 4).

Figura 4 – Coleta de frutos de goiaba-serrana. A: coleta de frutos na árvore; B: lesão típica de antracnose em fruto após a queda, no detalhe as manchas coalescendo.



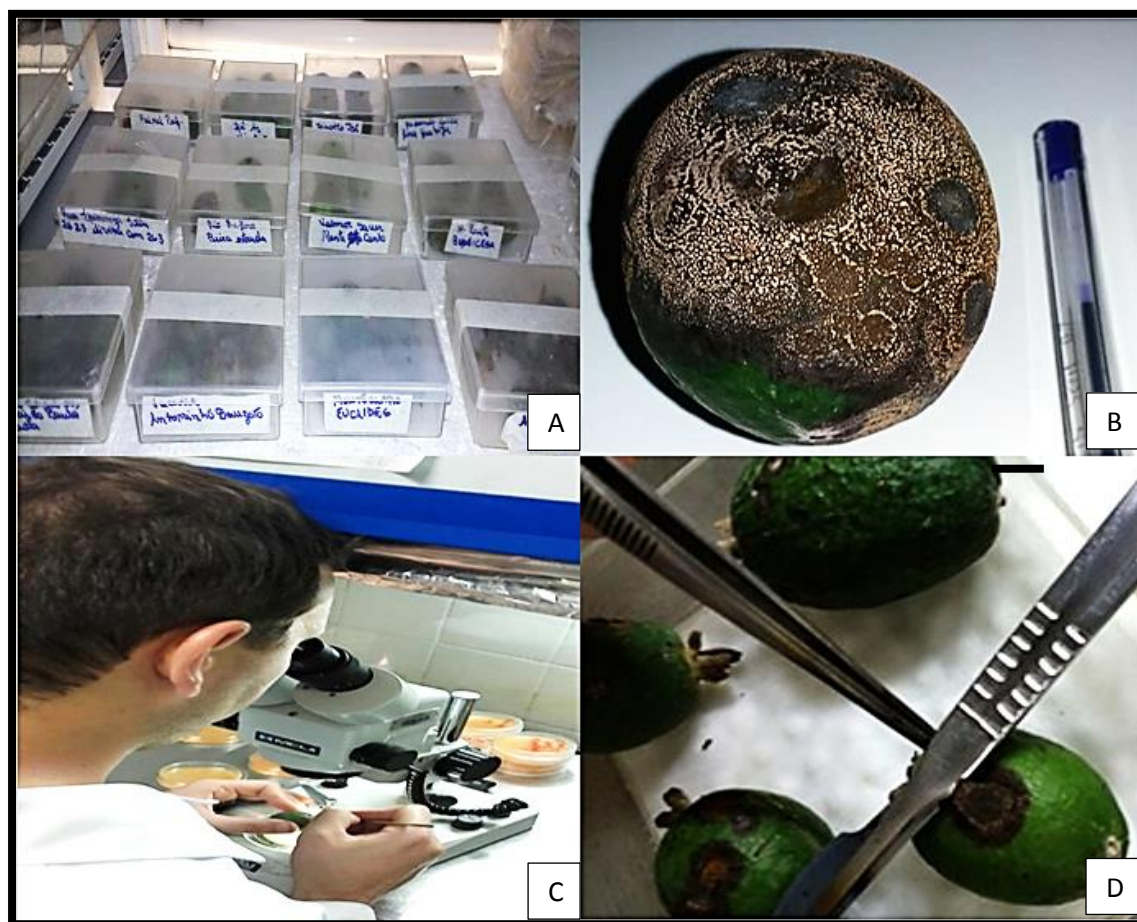
Fonte: Autor.

Após serem coletados, os frutos sintomáticos (com lesões escuras e/ou com presença de acérvulos na cor rosa ou alaranjado), foram devidamente identificados e

colocados em caixas plásticas transparentes do tipo *Gerbox* para crescimento das estruturas fúngicas e posterior isolamento em câmara de fluxo laminar (Figura 5).

O isolamento do patógeno foi feito pelo método indireto, realizado a partir de lesões em frutos contendo estruturas do patógeno, observando-as em microscópio estereoscópico e óptico. Primeiramente, os frutos foram desinfestados superficialmente em uma solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro disponível) durante cinco minutos e, em seguida, lavados três vezes em água destilada autoclavada durante 30 segundos e secos com toalhas de papel estéril. As amostras de tecidos sintomáticas foram cortadas e colocadas em placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz em câmara BOD (*Biochemical Oxygen Demand*).

Figura 5 - A: Caixas plásticas do tipo *Gerbox* com frutos de goiaba-serrana em câmara úmida; B: Frutos após sete dias de armazenamento com acérvulos na coloração salmão com as manchas coalescendo; C: Visualização das estruturas fúngicas em microscópio estereoscópico em câmara de fluxo laminar; D: Corte da lesão com auxílio de bisturi para isolamento pelo método indireto. Barra = 2cm.



Para a obtenção das culturas puras, a repicagem foi realizada com apenas uma Unidade Formadora de Colônia (UFC), ou seja, a partir de um esporo germinado. Para isso, uma porção de micélio de cada isolado desenvolvido foi diluída em 5 mL de água destilada esterilizada, após foi transferida para uma placa de Petri contendo meio AA (Ágar-Água). Após a germinação dos esporos (24 horas), com o auxílio de um microscópio óptico, foi localizado um esporo separado e, com o auxílio de uma agulha histológica, foi retirado o pedaço de ágar contendo o esporo germinado e transferido para uma placa de Petri contendo meio BDA (FERNANDES, 1993).

Caracterização Morfofisiológica de *Colletotrichum* spp.

Seleção de meio de cultura para esporulação de *Colletotrichum* spp.

O desenvolvimento de estudos com fungos em condições artificiais depende primordialmente, da necessidade de cultivá-los em ambientes controlados, induzindo sobretudo, a produção massal de esporos.

Dessa maneira, buscou-se verificar qual meio de cultura é mais adequado para a realização dos trabalhos subsequentes com *Colletotrichum* spp. isolados de frutos sintomáticos de goiaba-serrana. Para isso, foram utilizados três isolados coletados no ano de 2016, selecionados de acordo com critérios geográficos. São eles:

- SPS - Coordenadas: 29°59'32"S, 54°10'84"W; Região Central do RS;
- ANG - Coordenadas: 28°57'31.5"S 52°00'40.6"W; Região da Serra do RS;
- PEL-1 - Coordenadas: 31°40'47.8"S 52°26'21.2"W; Região Sul do RS.

Foram testados os meios de **V8** (100 mL de V8 (Spicy Hot), 20 g de ágar e 900 mL de água destilada), **MATHUR** (2,8 g de dextrose, 2,5 g de MgSO₄.7H₂O, 2,7 g de KH₂PO₄, 1 g de peptona, 0,8g de extrato de levedura, 15 g de ágar, e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL), **CA (Cenoura ágar)** (extrato de 200 g de cenoura, 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL), **AVEIA** (50 g de farinha de aveia, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada) e **BDA** (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL). Todos os meios de cultura preparados foram autoclavados a 120 °C por 30 min.

Na implantação do ensaio, um disco de meio de cultura BDA de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *Colletotrichum* spp., com sete dias de crescimento, foi transferido para o centro das placas de Petri (70 mm de diâmetro), as quais continham os diferentes meios de cultura, conforme o tratamento em questão. Todas as repetições foram mantidas em temperatura de 25 °C.

Estes isolados foram analisados através de caracteres morfológicos quantitativos, como: o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), o Diâmetro Final da Colônia (DFC) e a esporulação, além dos caracteres qualitativos, como a coloração das colônias, através da cartilha de cores de Munsell (MUNSELL SOIL COLOR CHARTS, 2009).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 (Fator F: Isolados de *Colletotrichum* spp.; Fator C: diferentes meios de cultura, totalizando 15 tratamentos, com cinco repetições constituídas por uma placa cada. Os níveis dos fatores foram assim compostos:

Fator F:

F₁: Isolado SPS;

F₂: Isolado ANG;

F₃: Isolado PEL-1.

Fator C:

C₁: Meio de cultura Mathur;

C₂: Meio de cultura V8 (Suco V8-Ágar);

C₃: Meio de cultura BDA;

C₄: Meio de cultura Cenoura-ágar;

C₅: Meio de cultura de aveia.

Os dados obtidos no teste dos diferentes meios de cultura foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{(x+0,5)}$ antes da análise da variância. A comparação das médias entre os tratamentos foi feita pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro utilizando-se o software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2008).

Após a finalização do ensaio, foi constatado que o meio de cultura Mathur permitiu maior esporulação dos isolados. Desta maneira, este meio foi selecionado para caracterizar os 49 isolados de *Colletotrichum* spp. conforme estudo descrito na sequência.

Caracterização morfológica de *Colletotrichum* spp. em meio Mathur

- Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)

Discos de sete milímetros de diâmetro contendo hifas dos isolados de cultura monospórica foram retirados de colônias em placas de Petri e transferidos para placas com sete centímetros de diâmetro (cinco placas por isolado). Estas placas foram acondicionadas em BOD regulada a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas até o final das medições que foram realizadas até que um dos isolados crescesse por toda a superfície da placa de Petri, ao oitavo dia.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada pela medição, a cada 24 h, registrando-se o diâmetro em milímetros das colônias, em posição ortogonal, a partir do segundo dia em que foram colocados os discos de micélio contendo o isolado. O diâmetro das colônias foi medido em milímetros, com auxílio de paquímetro digital. Para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foi empregada a fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991): $IVCM = \sum ((D-D_a)/N)$, em que: D = diâmetro médio atual da colônia e D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior e N = n° de dias após a inoculação.

- Diâmetro Final da Colônia (DFC)

Foi considerado o último valor mensurado na avaliação do IVCM.

- Taxa de Crescimento Micelial (TCM)

Foi obtido através do valor do DFC dividido pelo número de dias em que a colônia do primeiro isolado completasse o tamanho da placa de Petri.

- Esporulação de *Colletotrichum* spp.

Foi avaliada no último dia de incubação (oitavo dia), pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa utilizada para avaliação do crescimento micelial, com posterior raspagem das colônias com alça de Drigalski e peneiramento em camada dupla

de gaze, para a estimativa da concentração de conídios (conídios/mL) com o auxílio da câmara de Neubauer.

- Dimensão dos Conídios

Foram avaliados o comprimento e largura de 50 conídios tomados aleatoriamente em cada repetição. As medições foram realizadas com o auxílio de uma ocular OSM, acoplada ao microscópio de contraste Olympus BX41® na objetiva de 40x. As estruturas foram visualizadas a partir da confecção de lâminas contendo água esterilizada.

- Características das colônias

Os isolados crescidos em câmara de crescimento tipo BOD (fotoperíodo 12h) a 25 °C foram observados entre sete e quinze dias de crescimento e avaliados quanto à coloração com o auxílio da cartilha de cores de Munsell (MUNSELL SOIL COLOR CHARTS, 2009).

Da mesma maneira, a topografia das colônias foi avaliada conforme os parâmetros utilizados por Sawant (2012), quanto a margem de crescimento (regular ou irregular), a aparência (lisa ou rugosa), crescimento da colônia (cotonoso ou plano), modelo de esporulação (massa conidial no centro da placa, anéis concêntricos ou distribuídos por toda a superfície da placa).

Procedimentos Estatísticos

Inicialmente, foi verificado se os dados quantitativos dos caracteres morfológicos apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{(x+0,5)}$ antes da análise da variância. A comparação das médias entre os tratamentos foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro utilizando-se o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2008).

Os dados quantitativos foram testados quanto à multicolinearidade e ajustados pela matriz de distância de Mahalanobis. Um dendrograma de dissimilaridade foi construído utilizando-se o método de agrupamento da distância média não ponderada (UPGMA) sendo que o ajuste entre a matriz de distâncias e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) por meio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013). Este

teste tem como objetivo agrupar os isolados com características morfológicas similares, com isso, foram escolhidos no mínimo um isolado de cada grupo formado para realizar a caracterização molecular.

Caracterização Molecular dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Para a caracterização molecular dos isolados, foram escolhidos de maneira aleatória no mínimo um representante de cada um dos oito grupos formados na análise de agrupamento UPGMA. No total, foram enviados treze isolados ao Laboratório de Bioquímica Fitopatológica (Instituto Biológico, São Paulo) (Tabela 2). Todos os isolados enviados para extração de DNA e sequenciamento foram liofilizados e depositados na coleção de culturas fúngicas do Herbário SMDB da UFSM cujos códigos de depósitos encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Isolados utilizados para análise molecular, conforme a análise multivariada UPGMA e seus respectivos códigos de depósito no Herbário SMDB da UFSM.

Grupo	Isolados	Código de depósito no SMDB
	URU	19207
1	LAG-1	19210
	PAM	19208
2	SJG-3	19211
	SJ-1	19209
3	SPSR	19204
4	SVS	19206
	ADR	19205
5	IBI-1	19200
	SFP-1	19201
6	ANG	19202
7	ATP	19203
8	GRA	19212

Fonte: Autor.

Para a extração do DNA genômico de cada isolado, porções de micélio foram retirados de culturas monospóricas cultivadas em meio BDA por oito dias e foi utilizado o método CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1987).

A amostra de DNA genômico extraído foi submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (White et al., 1990), para o gene da beta-tubulina foram TUB2Fd (5' – GTBCACCTYCARACCGGYCARTG–3') e TUB4Rd (5' – CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC – 3') (Aveskamp et al., 2009) e para o gene da actina foram ACT-512F (5' – ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC – 3') e ACT-783R (5' – TACGAGTCCTTCTGGCCCAT – 3') (CARBONE; KOHN, 1999).

A mistura para a PCR consistiu de 1 µL de DNA, 1 µL de cada primer a 10 µM, 10 µL de tampão para PCR 5X, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase 5U/µL (Promega) e 35,8 µL H₂O MilliQ autoclavada, para um volume final de 50 µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C/2 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/10 s, anelamento a 54 °C/30 s, extensão a 72 °C/45 s, e extensão final a 72 °C/4 min. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. A verificação dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (Schmitz e Riesner, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 xL (Applied Biosystems).

Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando o *software* BioEdit (Hall, 1999). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as já existentes para *Colletotrichum* spp. no *GenBank* através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). As sequências do *GenBank* que apresentaram os maiores “escores” foram selecionadas e alinhadas juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW, além disso, a análise filogenética foi conduzida adotando-se o método “Neighbour-joining” com 1000 replicatas pelo programa MEGA versão 7 (TAMURA et al., 2013).

Após as sequência-consenso obtidas foram depositadas no banco de dados do *GenBank*, sediado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997), onde receberam os códigos de acesso para consultas futuras.

Resultados e Discussão

Caracterização Morfofisiológica de *Colletotrichum* spp.

Seleção de meio de cultura para esporulação de *Colletotrichum* spp.

Na avaliação do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), o isolado PEL-1 apresentou o maior valor (26 mm/dia) para o meio de cultura de V8, diferindo significativamente do isolado SPS o qual não produziu efeito significativo nos diferentes meios de cultura.

“Mathur”, “V8” e “BDA” não diferiram significativamente entre si independentemente do isolado. “Cenoura” e “Aveia” diferiram dos demais meios para o isolado ANG e apenas “Aveia” para PEL-1. Os meios BDA e V8 permitiram um crescimento micelial médio diário maior que “Aveia”, “Cenoura” e “Mathur” apresentando 20.6 e 21.0 % respectivamente (Tabela 3).

Tais dados ratificam os de estudos de Lenné (1978) e López (1999), os quais relataram que o crescimento micelial de diferentes espécies de *Colletotrichum* foi mais intenso em meio BDA do que em Aveia ou Mathur.

Tabela 3 - Médias de Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) dos isolados de *Colletotrichum* spp. SPS; ANG e PEL-1 nos meios de cultura: Mathur, V8, BDA, Cenoura e Aveia aos oito dias após incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

IVCM (mm/dia)						
Meio de cultura						
Isolado	MATHUR	V8	BDA	CENOURA	AVEIA	Média (%)
SPS	13,2 Ab*	15,0 Ab	14,0 Ab	13,6 Ab	12,2 Aa	13,5
ANG	21,0 Aa	22,0 Aa	23,0 Aa	16,3 Bb	15,3 Ba	19,4
PEL-1	22,0 Aa	26,0 Aa	25,1 Aa	23,2 Aa	16,0 Ba	22,4
Média (%)	18,7	21,0	20,6	17,7	14,4	
CV (%)	20,65					

Fonte: Autor.

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. C.V.(%) = coeficiente de variação.

O isolado PEL-1 apresentou maior crescimento micelial médio independente do meio de cultura utilizado (61,4 %) quando comparado com os isolados SPS e ANG (Tabela 4). Os meios de cultura diferiram entre si para os isolados SPS e ANG, no entanto, para o isolado PEL-1 não houve diferença significativa entre os meios testados. Considerando o Diâmetro Final da Colônia dos isolados nos diferentes meios, pode-se inferir que o meio V8 apresentou média superior (62,3 %) sendo que o meio de Aveia proporcionou o menor crescimento micelial (35,8 %).

Tabela 4 - Médias de crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp. SPS; ANG e PEL-1 nos meios de cultura: Mathur, V8, BDA, Cenoura e Aveia aos oito dias após incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Isolado	Diâmetro Final da Colônia (mm)					Média (%)
	Meio de cultura					
	MATHUR	V8	BDA	CENOURA	AVEIA	
SPS	43,3 Ba*	64,7 Aa	62,6 Aa	55,4 Aa	31,7 Cb	51,5
ANG	33,1 Bb	52,2 Aa	48,9 Ab	41,8 Bb	30,2 Bb	41,2
PEL-1	55,4 Aa	70,0 Aa	70,0 Aa	66,3 Aa	45,5 Aa	61,4
Média (%)	43,9	62,3	60,5	54,5	35,8	
CV (%)	15,18					

Fonte: Autor.

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. C.V. (%) = coeficiente de variação.

A diferença de crescimento micelial observada neste estudo pode ser explicada pela composição nutricional dos diferentes meios utilizados. De acordo com Andrade et al. (2007) isolados fúngicos podem apresentar diferenças significativas na velocidade de crescimento micelial dependendo da composição do meio cultura que pode ou não estimular o crescimento micelial. Meios de cultura contendo alta concentração de carboidratos, tais como o de BDA, V8, cenoura e aveia, podem estimular o crescimento micelial (MOORE-LANDECKER, 1972).

Assis et al. (2001), avaliando diferentes fontes de carbono na nutrição de isolados de *C. gloeosporioides*, verificaram que o amido proporcionou o melhor crescimento para a maioria deles, provavelmente por ser lentamente hidrolisável, gerando menor acúmulo de ácidos capazes de alterar sua taxa de desenvolvimento. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que o amido é um composto que se hidrolisa muito lentamente não causando a

deposição dos ácidos no meio, e dessa forma não prejudicando o desenvolvimento de *Colletotrichum* spp. (REBELO, 1989).

Deve-se observar, contudo, que nem todo meio de cultura que contribui para o crescimento micelial favorece a esporulação dos fungos (MOORE-LANDECKER, 1972). Nesse sentido, segundo Dhingra e Sinclair (1995), meios com baixo teor de carboidratos, normalmente estimulam a esporulação de vários fungos.

De fato, no presente trabalho, considerando as médias gerais, o meio Mathur, com maior restrição de nutrientes em relação aos demais meios utilizados, foi o que permitiu maior esporulação independentemente dos isolados (16,36%) enquanto que o de Aveia a menor (3,26 %) (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias de produção de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. SPS; ANG e PEL-1 nos meios de cultura: Mathur, V8, BDA, Cenoura e Aveia aos oito dias após incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Esporulação x 10 ⁶ esporos/mL						
Meio de cultura						
Isolado	MATHUR	V8	BDA	CENOURA	AVEIA	Média (%)
SPS	6,10 Ac*	2,80 Bb	2,35 Bc	5,40 Aa	3,90 Ba	4,11
ANG	12,48 Ab	4,17 Bb	6,64 Ab	3,30 Cb	2,40 Ca	5,79
PEL-1	30,50 Aa	10,80 Ba	11,17 Ba	9,50 Ca	3,50 Ca	13,09
Média (%)	16,36	5,92	6,72	6,06	3,26	
CV (%)	36,67					

Fonte: Autor.

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. C.V.(%) = coeficiente de variação.

O comportamento dos isolados de *Colletotrichum* spp. do presente estudo, quanto a esporulação, estão de acordo com os encontrados por López e Pereira (2010) que ao compararem a esporulação de *C. gloeosporioides* em diferentes meios de cultura, concluíram que o meio Mathur permitiu maior esporulação dos isolados, seguidos do meio BDA. Rabuske (2016) da mesma maneira, observou que a maior concentração de esporos para isolados de *Colletotrichum* spp. foi obtida no meio Mathur.

Dos três isolados analisados, apenas PEL-1 apresentou diferença na coloração da colônia entre os meios testados. O isolado SPS apresentou colônia e reverso de coloração branca e ANG colônia e reverso na coloração cinza claro em todos os meios testados. Para PEL-1 a coloração foi analisada conforme a cartilha de cores de Munsell (Munsell Soil

Color Charts, 2009) e variou de cinza claro (como no meio de cultura CA, V8, Mathur e Aveia) para escuro (em meio de cultura BDA), correspondendo aos códigos 2,5y 5/1 e Gley 1 N 3/1 da carta de cores de Munsell respectivamente (Figura 6).

Figura 6 - Coloração das colônias para o isolado PEL-1 em diferentes meios de cultura. Na parte superior cores do micélio aéreo. Na parte inferior coloração do reverso. Em que: os meios CA (Cenoura-ágar); V8 (suco de tomate V8 + ágar); Mathur e Aveia correspondem ao código 2,5y 5/1 e o meio BDA (batata-dextrose-ágar) ao código Gley 1 N 3/1 da carta de cores de Munsell.



Fonte: Autor.

Haja vista que para o presente estudo é importante ter isolados que apresentem mais estruturas reprodutivas do que vegetativas, optou-se pela utilização do meio Mathur nos ensaios subsequentes para a caracterização morfológica (item 3.1.2), uma vez que o mesmo proporcionou maior esporulação para os três isolados (SPS, ANG e PEL-1) conforme a Tabela 5.

Caracterização morfológica de *Colletotrichum* spp.

Conforme os dados apresentados na tabela 6, através da análise do IVCM pelo teste de comparação de médias, formaram-se três grupos significativamente diferentes, tendo os valores variado de 7,43 mm/dia para o isolado GRA a 19,67 para SVS. Da mesma maneira, foram divididos em três grupos os isolados para a variável Diâmetro Final da Colônia. Os

isolados URU, PEL-1 e AGD apresentaram DFC máximo (70 mm) no oitavo dia de incubação, sendo que o isolado GRA apresentou o menor valor de DFC (37,26 mm). Para a variável Taxa de Crescimento Micelial, os isolados dividiram-se em dois grupos significativamente distintos, sendo que em um grupo foi formado por 48 isolados e o outro apenas com o isolado GRA que apresentou TCM de 4,66 mm/dia.

Quanto ao tamanho dos conídios (largura e comprimento), os isolados foram separados em dois grupos distintos significativamente. A largura dos conídios variou de 2,8 µm a 4,7 µm e o comprimento de 9,30 µm a 16,9 µm.

Considerando o número de esporos, formaram-se cinco grupos significativamente diferentes. O isolado GRA formou um único grupo apresentando a maior esporulação entre os isolados ($55,80 \times 10^6$ conídios/mL), seguido de ALW e PEL-1 que apresentaram $28,85 \times 10^6$ conídios/mL e $25,96 \times 10^6$ conídios/mL respectivamente. O grupo formado pelos isolados: SMS, SPSR, SVS, IPE-1, IPE-3, NVP, GAR, IBI-2, SJG-1, SJG-2, SJG-3, ADR, SFP-2, CAM, VAC, PEL-2, SLS-2, LAG-1, LAG-2, PNL, UPM, SJ-2, SJ-4, AGD, PAM e URU apresentou os menores valores para a esporulação como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 - Características das colônias de *Colletotrichum* spp. crescidos em meio Mathur, após 8 dias de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Identificação dos Isolados	IVCM (mm/dia)	DFC (mm)	TCM (mm/dia)	Largura dos Conídios (µm) Méd. (Mín.-Máx.)	Comprimento dos Conídios (µm) Méd. (Mín.-Máx.)	Esp. ($\times 10^6$)	(continua)
							Formato da extremidade dos conídios
SPS	13,52 b*	55,01 b	6,88 a	3,90 a (2,7-4,1)	14,50 a (11,1-17,1)	7,28 d	AF**
SMS	16,95 a	67,12 a	8,39 a	3,00 b (1,7-3,0)	9,30 b (5,2-10,3)	1,51 e	AE
LAJ	14,92 b	61,32 a	7,66 a	3,20 b (1,3-3,6)	13,10 a (7,3-13,7)	8,86 d	AF
SPSR	11,80 b	51,89 b	6,49 a	3,10 b (1,9-3,7)	13,20 a (9,3-13,3)	2,34 e	AF
SVS	19,67 a	69,58 a	8,70 a	3,60 a (1,6-4,2)	13,00 a (9,1-13,5)	1,09 e	AR
GRA	7,43 c	37,26 c	4,66 b	3,40 a (1,2-3,7)	14,30 a (11,1-14,4)	55,80 a	AF
IPE-1	16,21 a	68,18 a	8,52 a	3,70 a (1,5-4,0)	15,40 a (11,2-15,6)	0,76 e	AR
IPE-2	16,52 a	69,76 a	8,72 a	4,70 a (2,3-5,3)	15,40 a (10,4-15,5)	11,95 c	AF
IPE-3	17,85 a	69,14 a	8,64 a	4,20 a (2,1-4,4)	14,90 a (12,3-15,0)	0,94 e	AR
NPT-1	14,32 b	60,85 a	7,61 a	3,30 a (1,6-3,4)	14,00 a (10,7-14,3)	5,57 d	AF
NPT-2	12,03 b	61,56 a	7,70 a	3,70 a (1,5-3,8)	12,80 a (9,1-13,0)	8,66 d	AF
ATP	15,28 b	65,41 a	8,18 a	3,40 a (1,7-4,2)	11,10 a (8,1-11,6)	11,02 c	AF
VIF-1	16,60 a	63,30 a	7,91 a	4,20 a (2,3-4,3)	13,40 a (9,5-13,6)	7,65 d	AF
VIF-2	13,14 b	58,33 b	7,29 a	3,20 b (2,1-3,5)	13,20 a (8,3-14,3)	5,07 d	AF
SEC	12,76 b	52,19 b	6,52 a	3,60 a (2,3-3,8)	14,00 a (10,1-14,4)	10,55 c	AF

Tabela 6 - Características das colônias de *Colletotrichum* spp. crescidos em meio Mathur, após 8 dias de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

	(conclusão)						
NVP	13,67 b	58,63 b	7,45 a	3,60 a (2,1-4,1)	13,80 a (8,8-14,3)	4,90 e	AF
GAR	15,79 b	69,27 a	8,66 a	3,70 a (1,5-4,0)	13,60 a (9,1-13,7)	1,94 e	AR
IBI-1	15,79 b	63,64 a	7,95 a	3,60 a (1,6-4,3)	14,60 a (11,1-15,0)	6,24 d	AF
IBI-2	15,96 b	66,01 a	8,25 a	2,80 b (1,1-3,1)	11,70 a (6,4-12,3)	3,01 e	AR
IBI-3	13,75 b	56,32 b	7,04 a	3,30 a (1,4-3,4)	11,20 a (8,6-11,8)	12,65 c	AF
ANG	12,32 b	56,70 b	7,09 a	3,70 a (2,1-4,3)	11,20 a (7,3-12,1)	10,90 c	AF
SJG-1	17,01 a	68,82 a	8,60 a	4,00 a (2,3-4,6)	14,30 a (11,7-14,8)	0,99 e	AR
SJG-2	16,24 a	69,76 a	8,69 a	4,15 a (1,8-4,5)	14,40 a (8,9-15,2)	1,78 e	AR
SJG-3	15,12 b	67,11 a	8,39 a	3,80 a (1,6-3,9)	14,60 a (11,3-15,0)	3,03 e	AR
ADR	12,47 b	61,38 a	7,55 a	4,30 a (2,3-4,4)	14,50 a (9,6-15,1)	1,17 e	AF
SFP-1	13,84 b	55,93 b	7,49 a	3,60 a (1,7-4,1)	12,20 a (7,5-12,6)	6,19 d	AF
SFP-2	16,30 a	67,06 a	8,38 a	3,80 a (1,6-3,9)	15,20 a (11,4-15,8)	3,72 e	AR
SJA	15,27 b	63,32 a	7,92 a	3,60 a (2,5-3,9)	13,30 a (9,3-14,0)	7,00 d	AF
CAM	16,54 a	62,77 a	7,85 a	3,80 a (1,6-4,0)	12,10 a (8,6-12,5)	3,61 e	AR
VAC	18,55 a	69,69 a	8,71 a	3,60 a (1,6-3,8)	14,50 a (11,4-14,9)	1,12 e	AR
MTC	14,84 b	66,39 a	8,30 a	3,30 a (1,6-4,6)	13,50 a (9,1-14,0)	10,18 c	AF
PEL-1	15,74 b	70,00 a	8,75 a	4,40 a (2,3-4,7)	17,70 a (15,3-17,8)	25,96b	AR
PEL-2	15,91 b	66,39 a	8,30 a	3,80 a (2,1-4,0)	13,90 a (8,2-14,3)	2,28 e	AF
SLS-1	13,01 b	61,38 a	7,67 a	3,30 a (1,8-4,3)	12,60 a (9,5-13,0)	5,41 d	AF
SLS-2	14,72 b	60,22 a	7,53 a	2,90 b (1,4-3,5)	11,40 a (8,4-11,5)	0,92 e	AF
LAG-1	15,11 b	67,18 a	8,40 a	3,90 a (2,1-4,3)	13,70 a (7,7-13,9)	1,51 e	AR
LAG-2	17,00 a	68,78 a	8,60 a	4,50 a (2,6-5,2)	14,40 a (8,8-15,0)	1,23 e	AR
LAG-3	12,95 b	57,33 b	7,17 a	3,90 a (2,3-4,1)	10,60 b (6,5-12,3)	7,26 d	AF
PNL	14,65 b	66,40 a	8,30 a	3,20 b (1,3-3,7)	13,90 a (8,3-14,1)	0,53 e	AF
UPM	16,67 a	65,71 a	8,21 a	4,10 a (1,6-5,1)	15,40 a (12,4-15,5)	1,35 e	AR
SJ-1	15,40 b	68,16 a	8,52 a	2,80 b (1,3-3,6)	14,70 a (9,6-15,7)	3,71 d	AR
SJ-2	14,61 b	67,86 a	8,48 a	2,80 b (1,1-3,8)	13,80 a (8,4-14,6)	1,49 e	AR
SJ-3	14,28 b	65,69 a	8,21 a	4,40 a (2,3-5,3)	12,20 a (7,4-13,2)	6,67 d	AF
SJ-4	15,82 b	69,45 a	8,68 a	3,70 a (1,4-3,9)	14,50 a (11,3-15,6)	1,21 e	AR
RIS	13,22 b	57,46 b	7,18 a	3,10 b (2,1-4,3)	12,60 a (7,6-14,2)	12,50 c	AF
ALW	14,79 b	63,31 b	7,91 a	3,20 b (1,8-4,1)	11,90 a (7,4-12,9)	28,85 b	AR
AGD	16,91 a	70,00 a	8,75 a	3,40 a (1,5-4,2)	15,90 a (11,6-16,4)	1,56 e	AF
PAM	15,96 b	68,07 a	8,51 a	4,40 a (2,4-5,2)	16,90 a (12,5-17,0)	2,89 e	AR
URU	16,25 a	70,00 a	8,75 a	4,10 a (2,1-4,5)	14,50 a (9,5-15,3)	1,72 e	AR

Fonte: Autor.

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. ** Conídios com extremidade arredondada (AR) e conídios com extremidade afilada (AF).

A diferenciação entre espécies de *Colletotrichum* é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos e fisiológicos, como crescimento micelial, tamanho de conídios e

coloração das colônias (MENEZES, 2006). Entretanto, devido à alta variabilidade genética e instabilidade dos caracteres morfológicos, o uso de técnicas baseadas em características fenotípicas pode não ser suficiente para diferenciar espécies de *Colletotrichum* com precisão, necessitando de métodos complementares e mais sensíveis na identificação de fitopatógenos (TOZZE JÚNIOR et al., 2007).

Da mesma maneira, Hu et al. (2015) e Weir et al. (2012) destacaram que caracteres morfológicos analisados isoladamente não são suficientes para identificar *Colletotrichum* spp., devido a variações nos fenótipos das espécies sob diferentes condições ambientais, além da possível sobreposição dos valores nos caracteres entre os isolados. No presente trabalho, por exemplo, os isolados SPS e SVS, mesmo possivelmente pertencentes a espécies diferentes, devido a diferença significativa para a maioria dos caracteres (IVCM, DFC, esporulação e formato de conídios) apresentaram sobreposição no tamanho dos conídios, o que dificultou a identificação.

Tais resultados estão de acordo com o estudo de Andrade et al. (2007), os quais ao caracterizarem isolados de *Colletotrichum* de mamão (*Carica papaya*), também constataram que a diferenciação entre espécies com base nas dimensões de conídios foi dificultada pela sobreposição dos valores descritos por Sutton (1992), pois a maioria dos isolados apresentou dimensões dentro da faixa de variação descrita para as duas espécies, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Tozze Jr. et al (2007) observaram que isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* oriundos de pimentão (*Capsicum annuum*), apresentaram alta variabilidade e que devido a sobreposição nas dimensões dos conídios descritas para as espécies, baseando apenas nas características morfológicas, não foi possível identificar alguns isolados como sendo pertencentes a uma única espécie.

Segundo Piva (2017), os caracteres morfológicos de *Colletotrichum* spp. quando analisados isoladamente dificultam a identificação dos mesmos sendo possível apenas agrupá-los em complexo de espécies.

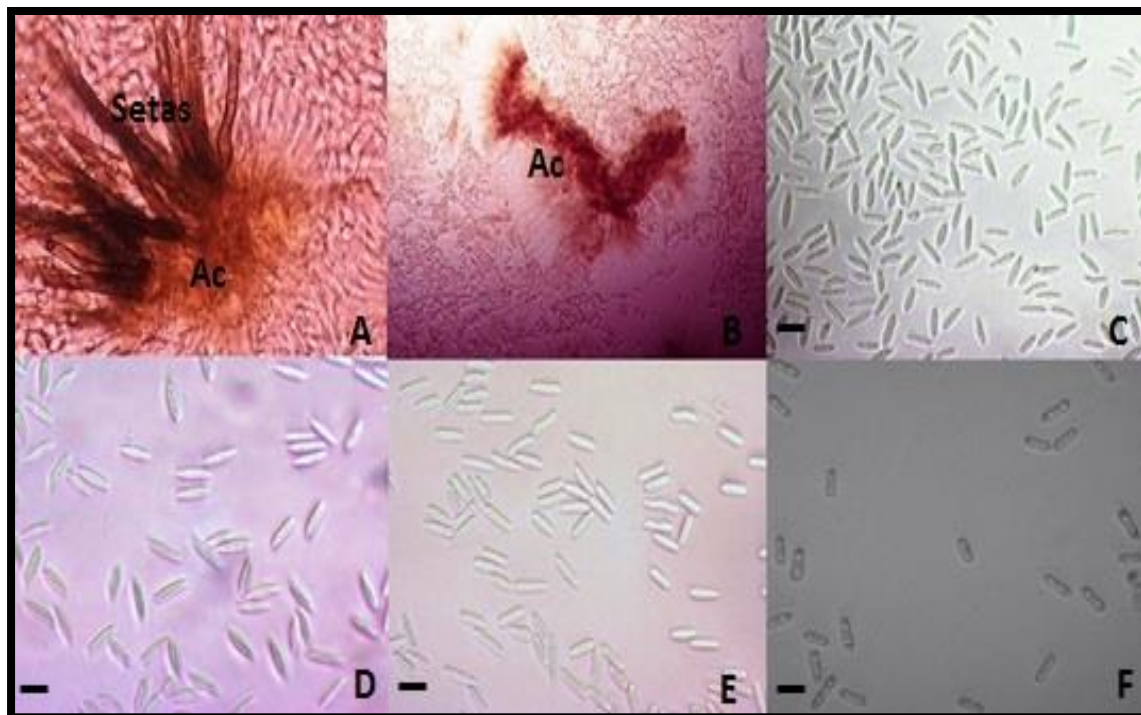
De fato, no presente trabalho, devido a sobreposição dos valores na morfometria dos conídios de *Colletotrichum*, a análise morfológica não permitiu identificá-los em nível de espécies – *sensu stricto*, embora tenha sido uma ferramenta útil no processo de caracterização dos isolados em complexos de espécies.

Nesse sentido, possivelmente os 49 isolados do presente estudo pertençam aos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, uma vez que as características morfológicas dos isolados identificados neste estudo estão de acordo com os encontrados para estes

complexos na literatura (LOPES, 2013; WEIR et al., 2012; DAMM et al., 2012A; DAMM et al., 2012B; MUNIR et al., 2016). Isolados de *C. acutatum* crescem, em geral, mais lentamente bem como produzem conídios de tamanho menor, fusiformes e com extremidades afiladas quando comparado com *C. gloeosporioides*, sendo esses parâmetros amplamente utilizados na caracterização morfológica de fungos desse gênero (SUTTON, 1980; PERES et al., 2005; ANDRADE et al., 2007). Deve-se destacar, todavia, que o isolado GRA apresentou resultados significativamente distintos em relação aos demais isolados para a maioria dos caracteres avaliados.

Além da diversidade nos caracteres quantitativos, os isolados também variaram qualitativamente (Tabela 6, Figura 7). Durante a confecção das lâminas, foi possível a visualização de setas acervulares em alguns isolados (Figura 7), no entanto, elas não foram avaliadas como variável morfológica, uma vez que a sua produção pode variar de acordo com as condições do ambiente físico (temperatura e fotoperíodo) e nutricional, ou seja, um mesmo isolado pode ou não apresentar setas dependendo do meio em que ele é cultivado (CARVALHO, 1997).

Figura 7 - Aspecto dos acérvulos, setas e conídios de *Colletotrichum* spp. A: Acérvulo com a presença de setas; B: Acérvulo sem a presença de setas; C: Conídios de tamanho médio com a extremidade afilada; D: Conídios de tamanho grande com extremidade afilada; E: Conídios de tamanho grande com extremidade arredondada; F: Conídios pequenos com extremidade arredondada. Ac.: Acérvulo de *Colletotrichum* sp. Barras = 12 μ m.



Fonte: Autor.

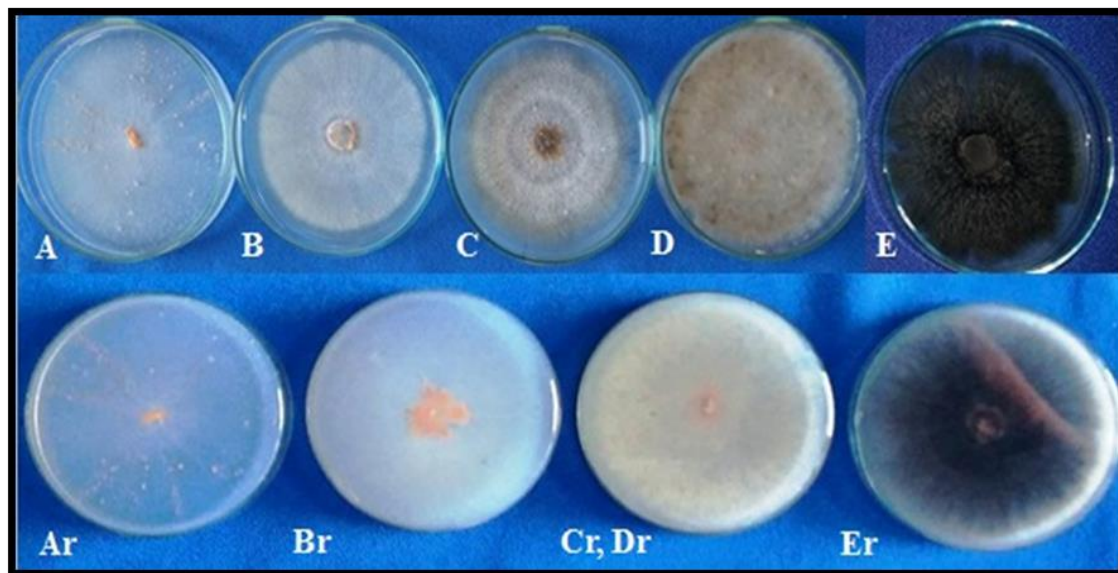
Os 49 isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram, também, diferença na coloração das colônias, dessa forma, foram agrupados em cinco grupos distintos de cores (Tabela 7 e Figura 8). Os dados referentes à coloração das colônias foram analisados, agrupados e estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 7 - Classificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. de goiaba-serrana quanto a coloração observada em meio Mathur, após incubação.

Grupo	Cor da colônia	Reverso da colônia	Código Carta de Munsell
A	Branca	Branca	2.5 y 8/1
B	Creme	Creme	7.5 y R 7/3
C	Cinza Claro	Cinza claro	2.5 y 5/1
D	Cinza Escuro	Cinza claro	gley 1 n 3/1-2.5 y 5/1
E	Castanho Escuro	Castanho Escuro	Very dark greenish gray

Fonte: Autor.

Figura 8 - Coloração das colônias de *Colletotrichum* spp. em meio Mathur após incubação aos oito dias sob temperatura de 25°C e 12 horas de fotoperíodo. Na parte superior: os isolados padrões dos grupos A, B, C, D e E. Na parte inferior: Ar: Reverso da placa A; Br: Reverso da placa B; Cr, Dr: Reverso com a mesma coloração para as placas C e D; Er: Reverso da placa E.



Fonte: Autor.

Os isolados foram separados conforme os grupos de cores, quanto ao aspecto das colônias (margem das colônias, aparência e crescimento) e quanto a forma de esporulação, conforme consta na Tabela 8.

Tabela 8 - Características das colônias dos 49 isolados de *Colletotrichum* spp. observadas em meio Mathur, após incubação aos oito dias.

(continua)

Grupos	Identificação dos Isolados	Margem da colônia	Aparência da colônia	Crescimento da colônia	Massa Conidial
A	SPS	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
A	LAJ	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis Concêntricos
A	SPSR	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis Concêntricos
A	SFP-1	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
A	SJA	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa
A	SLS-1	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa
A	SLS-2	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa
A	SJ-3	Irregular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
A	AGD	Regular	Lisa	Plano	Centro da placa
B	GRA	Irregular	Rugosa	Plano	Anéis Concêntricos

Tabela 8 - Características das colônias dos 49 isolados de *Colletotrichum* spp. observadas em meio Mathur, após incubação aos oito dias.

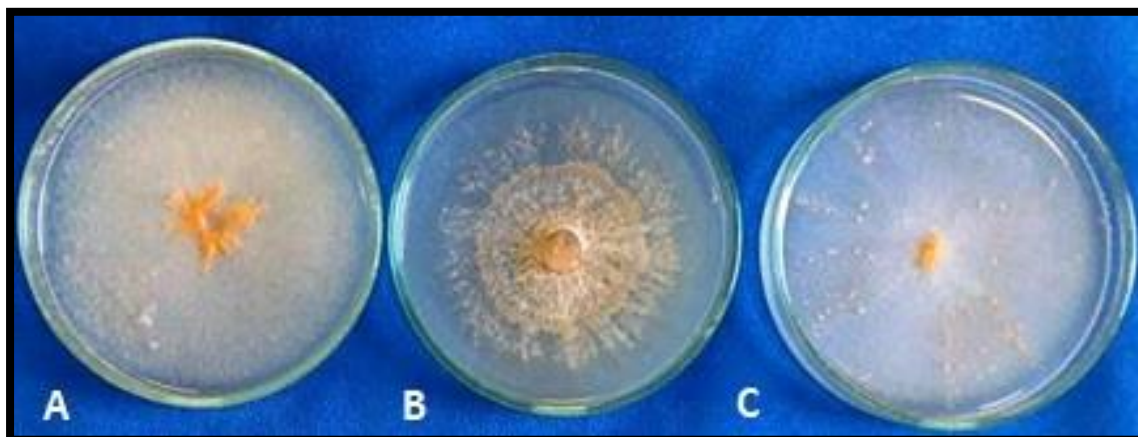
(conclusão)					
B	IBI-1	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
B	ADR	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis Concêntricos
B	SFP-2	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis Concêntricos
B	CAM	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa
B	MTC	Regular	Lisa	Plano	Centro da placa
C	SMS	Regular	Lisa	Cotonoso	Centro da placa
C	SVS	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
C	NPT-1	Regular	Lisa	Cotonoso	Centro da placa
C	NPT-2	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis Concêntricos
C	VIF-1	Regular	Lisa	Plano	Anéis Concêntricos
C	VIF-2	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa
C	SEC	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis Concêntricos
C	NVP	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
C	IBI-2	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa
C	IBI-3	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
C	ANG	Regular	Lisa	Plano	Anéis Concêntricos
C	SJG-1	Irregular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
C	VAC	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa
C	LAG-1	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
C	LAG-2	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
C	LAG-3	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis Concêntricos
C	SJ-2	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
C	RIS	Regular	Lisa	Cotonoso	Centro da placa
C	ALW	Regular	Lisa	Plano	Anéis Concêntricos
D	IPE-2	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	IPE-3	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	ATP	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	GAR	Irregular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	SJG-2	Regular	Lisa	Plano	Anéis Concêntricos
D	SJG-3	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	PEL-1	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	PEL-2	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	PNL	Irregular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	SJ-1	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
D	URU	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
E	IPE-1	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
E	UPM	Irregular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
E	SJ-4	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa
E	PAM	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa

Fonte: Autor.

Quanto à margem das colônias a maioria dos isolados foram classificados como regular, com exceção dos isolados SJ-4, UPM, PNL, SJG-1, GRA e GAR que apresentaram margem irregular. O isolado GRA se diferenciou dos demais quanto a aparência da colônia, sendo o único a apresentar aparência (aspecto) rugoso. Quanto ao crescimento da colônia, 71,42% dos isolados apresentaram crescimento cotonoso (algodão).

Considerando a forma de esporulação, 65,3% dos isolados esporulam por toda placa. No entanto, foram verificadas mais duas formas de esporulação: em anéis concêntricos e formação de massa conidial no centro da placa. Os padrões de esporulação dos isolados do presente estudo podem ser observados na Figura 9.

Figura 9 - Formas de esporulação de *Colletotrichum* spp. observadas em meio Mathur, após incubação aos oito dias. A: Massa conidial de coloração laranja no centro da placa de Petri; B: esporulação na forma de anéis concêntricos e C: Acérvulos de *Colletotrichum* spp. espalhados por toda placa.



Fonte: Autor.

De acordo com as características das colônias fúngicas, de maneira geral, os isolados do presente trabalho apresentaram resultados semelhantes aos descritos para *C. gloeosporioides* que de maneira geral apresentam coloração de colônia escura em relação às demais espécies de *Colletotrichum* (SUTTON, 1992). A coloração de colônia mais clara (brancas e cremes) pode ocorrer tanto em *C. gloeosporioides* quanto em *C. acutatum* (TOZZE JUNIOR, 2007). Andrade (2007) em estudo com isolados de *Colletotrichum* de mamão (*Carica papaya*) variaram de branca a cinza-escura e concluíram que os isolados poderiam ser de *C. gloeosporioides*. Deve-se destacar, porém, que o isolado GRA apresentou comportamento distinto dos demais, pois apresentou margem da colônia

irregular e aparência rugosa. A ocorrência de variabilidade na coloração, topografia e no crescimento micelial das colônias de *Colletotrichum* também foi verificada por Mafacioli et al (2005); Gunawardhana et al (2009); Tozze Jr. (2009); Bonett et al (2010); Tozze Jr. et al (2015).

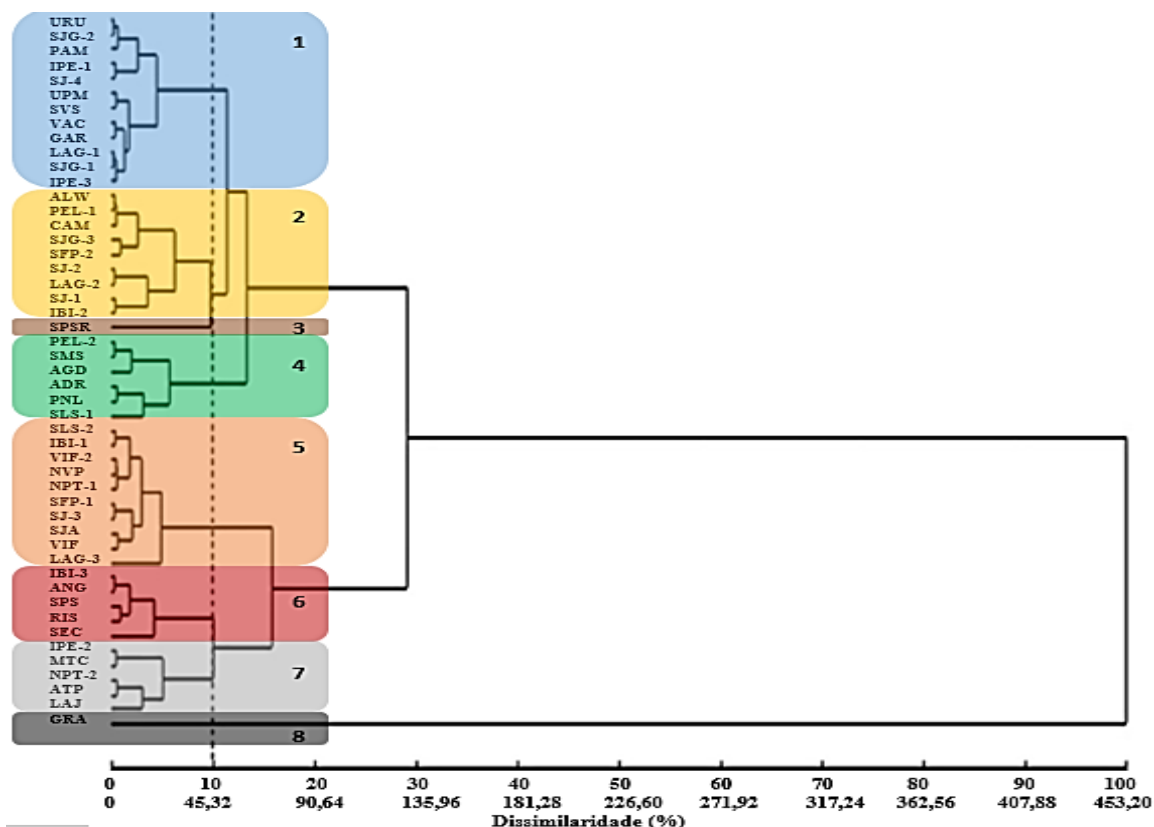
As diferenças nos aspectos morfológicos das colônias de *Colletotrichum* spp., especialmente no que se refere a cor, é um dos principais motivos para a sistemática do gênero não ser possível apenas com base em dados morfológicos (WIKKEE et al., 2011, CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012; O'CONNELL et al., 2012; LIU et al., 2014). Estas diferenças se devem aos genótipos dos isolados serem constituídos por indivíduos que acumularam algumas mutações distintas e a pequenas diferenças no ambiente onde o patógeno se desenvolveu, por exemplo, temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo (WEIR et al., 2012).

A alta variabilidade morfofisiológica e a presença de características comuns a mais de uma espécie ou complexo de espécies de *Colletotrichum* descritas na literatura (Menezes, 2006, Sutton 1992), como coloração das colônias e forma de esporulação, impossibilitaram a clara identificação específica dos isolados.

Diante da variabilidade encontrada através da análise morfológica, foi utilizada a análise de agrupamento por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para analisar as variáveis quantitativas (IVCM, DFC, TCM, tamanho de conídios e esporulação) de forma conjunta entre os isolados, a fim de agrupá-los de acordo com características semelhantes e estabelecer quais caracteres mais contribuem para a divergência entre os isolados e selecionar isolados representantes de cada grupo para a análise molecular.

Na Figura 10 é apresentado o dendrograma de dissimilaridade baseado no método de agrupamento UPGMA das características de IVCM, DFC, TCM, largura e comprimento dos conídios e esporulação dos 49 isolados de *Colletotrichum* spp.

Figura 10 - Dendrograma das medidas e percentagem de dissimilaridade entre os 49 isolados *Colletotrichum* spp. baseado nas características morfofisiológicas (IVCM, DFC, TCM, Largura e comprimento dos conídios e esporulação), utilizando como método de agrupamento UPGMA. A linha tracejada, refere-se ao “ponto de corte” de 10% de dissimilaridade para a obtenção dos grupos. Os números indicam os oito grupos gerados através da análise.



Fonte: Autor.

A distância máxima de mahalanobis ocorreu entre os isolados IPE-3 e GRA (1433,974629) e a mínima entre os isolados URU e SJG-2 (0,480144), estando estes últimos, portanto, localizados no mesmo *clado* (ramo) do dendrograma indicando que, de acordo com os caracteres avaliados, provavelmente pertencem à mesma espécie.

Através da análise UPGMA as características que melhor distinguiram os isolados foram a esporulação a qual foi responsável pela maior contribuição com 44,96%, seguido do DFC (29,57%), TCM (20,28%), comprimento dos conídios (2,43 %), IVCM (1,69 %) e largura dos conídios (1,03 %).

Considerando o índice de dissimilaridade de 100 %, percebe-se que o isolado GRA se separa dos outros 48 isolados de *Colletotrichum* spp., comprovando que se trata de um isolado distinto morfológicamente dos demais. Utilizando como critério 10% de

dissimilaridade, foi possível formar oito grupos conforme pode ser observado na Figura 10. Sendo constituídos da seguinte maneira:

- Grupo 1: URU, SJG-2, PAM, IPE-1, SJ-4, UPM, SVS, VAC, GAR, LAG-1, SJG-1 e IPE-3.
- Grupo 2: ALW, PEL-1, CAM, SJG-3, SFP-2, SJ-2, LAG-2, SJ-1 e IBI-2;
- Grupo 3: SPSR;
- Grupo 4: PEL-2, SMS, AGD, ADR, PNL, SLS-1;
- Grupo 5: SLS-2, IBI-1, VIF-2, NVP, NPT-1, SFP-1, SJ-3, SJA, VIF-1 e LAG-3;
- Grupo 6: IBI-3, ANG, SPS, RIS e SEC;
- Grupo 7: IPE-2, MTC, NPT-2, ATP e LAJ;
- Grupo 8: GRA

Treze isolados representativos foram selecionados para realização da análise molecular, sendo 3 para o grupo 1 (URU, LAG-1 e PAM), 2 para o grupo 2 (SJG-3 e SJ-1), 1 para o grupo 3 (SPSR), 2 para o grupo 4 (SVS e ADR), 2 para o grupo 5 (IBI-1 e SFP-1), 1 para cada um dos grupos: 6 (ANG), 7 (ATP), e 8 (GRA). Além disso, esses isolados representantes de cada grupo foram selecionados abrangendo diferentes regiões dos estados do RS, SC, PR e do Uruguai.

Os resultados encontrados neste estudo apontam para a possibilidade de que mais de uma espécie de *Colletotrichum* esteja associada à antracnose em frutos de goiaba-serrana em toda sua área de ocorrência natural, devido à grande variabilidade observada nos caracteres morfofisiológicos analisados. Os resultados expressam que não é possível relacionar o local de origem dos isolados com a sua semelhança morfológica, visto que dentro de um mesmo grupo tem-se isolados de diferentes municípios de coleta.

Deve-se destacar, contudo, que ainda que os isolados apresentem características típicas de espécies pertencentes aos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, não se pode afirmar categoricamente a qual espécie estes isolados pertencem dentro dos complexos (espécies *sensu stricto*). Nesse caso, autores como Hassan et al., (2018); Weir et al. (2012); Damm et al. (2012) e Thaug (2008) recomendam a realização de uma abordagem polifásica, combinando técnicas morfológicas clássicas e análises filogenéticas.

Caracterização Molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.

A amplificação e o sequenciamento da região ITS possibilitou a diferenciação dos 13 isolados em *C. acutatum* (IBI-1, SFP-1, ANG, ATP, SPSR, ADR), *C. gloeosporioides* (SVS, URU, PAM, SJ-1, LAG-1, SJG-3) e *C. pseudoacutatum* (GRA). No entanto, segundo Cannon et al. (2012), considerando o gênero *Colletotrichum*, a realização de vários estudos filogenéticos permitiu agrupar 119 espécies de *Colletotrichum* em nove clados distintos (*trucatum*, *sparthianum*, *orbiculare*, *graminicola*, *gloeosporioides*, *destructivum*, *dematium*, *boninense* e *acutatum*) com espécies em cada clado muito próximas filogeneticamente. Estudos como esse permitiram a separação dessas espécies em complexos de espécies de *Colletotrichum*.

Através do sequenciamento da região ITS inferiu-se que há mais de uma espécie dentro dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, como pode ser observado na (Tabela 9) onde o isolado SPSR, por exemplo, apresentou cobertura e similaridade de 98 e 99 % tanto para *C. acutatum* como para *C. nymphaeae*.

O código de acesso dos treze isolados de *Colletotrichum* spp. depositados no *GenBank* bem como os valores de cobertura e similaridade entre os isolados de *Colletotrichum* spp. deste estudo e os acessos disponíveis no *GenBank* para a região ITS, obtidos através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento da região ITS.

(continua)

Isolados e código de acesso no <i>GenBank</i>	Espécie	C (%)	S (%)	Acesso no <i>GenBank</i>	Autores
IBI-1 MN264620	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98	99	KF928293	Joshi,S.R. e Nath,A. (2013)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	97	99	KF923808	Wang,H et al. (2013)
	<i>Colletotrichum guajavae</i>	97	99	KJ813590	Chowdappa,P. e Chethana,C.S. (2014)
ADR MN264621	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98	99	KX344998	Cheon,W. e Jeon,Y. (2016)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98	99	KF928293	Joshi,S.R. e Nath,A. (2013)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98	99	LC194225	Back,C.-G et al. (2016)

Tabela 9 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento da região ITS.

(continuação)

SPSR MN264622	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98	99	KF928293	Joshi,S.R. e Nath,A. (2013)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	97	99	KF923808	Wang,H. et al. (2013)
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	99	LT717067	Toth,A et al.(2017)
ATP MN264623	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98	99	KF928293	Joshi,S.R. e Nath,A. (2013)
	<i>Colletotrichum simmondsii</i>	99	99	GU183351	Shivas,R.G. e Tan,Y.P. (2009)
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	99	MF187553	Wu,W. e Liu,Y. (2017)
ANG MN264624	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	99	LT717067	Toth,A. et al. (2017)
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	99	MF187553	Wu,W. e Liu,Y. (2017)
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	99	LT717066	Toth,A. et al. (2017)
SFP-1 MN264625	<i>Colletotrichum acutatum</i>	99	99	LC194224	Back,C.-G. et al. (2016)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	99	99	LC194225	Back,C.-G., et al. (2016)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98	99	KF923808	Wang,H. et al. (2013)
GRA MN262638	<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i>	93	99	NR111756	Damm,U., et al. (2012)
	<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i>	90	99	KU743950	Gonzalez Teuber,M. (2016)
SVS MN262646	<i>Colletotrichum fructicola</i>	98	99	MF543120	Liu,X., Gong,G. e Zheng,X. (2017)
	<i>Colletotrichum fructicola</i>	99	99	LT632564	Qin,L. (2016)
	<i>Colletotrichum fructicola</i>	98	99	KP748225	Liu,F. e Gong,G. (2015)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	KF923871	Sunayana,N. e Prakash,H.S. (2013)
URU MN262632	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	JX258732	Cnossen-Fassoni,A., et al. (2012)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	AF451905	Ford,R.e Taylor,P.W.J. (2001)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	MF197434	Fan,H., et al. (2017)
PAM MN262633	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	MF197434	Fan,H.,et al. (2017)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	HM015855	Nascimento,R.J., et al. (2010)
	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	98	99	KR445682	Fuentes Aponte,S. et al. (2015)

Tabela 9 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento da região ITS.

(conclusão)

SJ-1 MN262634	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	97	99	HM015855	Nascimento,R.J., et al. (2010)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	AF451905	Ford,R. e Taylor, P.W.J. (2001)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	JX258732	Crossen-Fassoni,A., et al. (2012)
LAG-1 MN262635	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	98	99	KR445682	Fuentes Aponte,S. e Feliciano Rivera, (2015)
SJG-3 MN262636	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	96	99	KF768554	Rodrigues, A.L.,et al. (2013)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	97	99	HM015855	Nascimento,R.J., et al. (2010)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98	99	KF923863	Sunayana, N. e Prakash,H.S. (2013)
	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	98	99	KR445682	Fuentes Aponte, S. e Feliciano Rivera, (2015)
	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	96	99	KF768554	Rodrigues, A.L.,et al. (2013)

Fonte: Autor.

Além da região ITS, foi sequenciada a região Actina (ACT) e β -tubulina (β -tub), o código de acesso dos treze isolados de *Colletotrichum* spp. depositados no *GenBank* e os resultados obtidos com o sequenciamento dessas regiões de cobertura e similaridade entre os isolados de *Colletotrichum* spp. do presente trabalho e os acessos disponíveis no *GenBank*, obtidos através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento das regiões Actina (ACT) β -tubulina (β -tub).

(continua)

Isolado	Região Gênica e código de acesso no GenBank	Espécie	C (%)	S (%)	Acesso no GenBank do organismo com mais alta identidade	Autores
IBI-1	ACT	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	95	99	MF278014	Wu,W. and Liu,Y. (2017)
	MN304637	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	93	99	MF471704	Liu,X., et al. (2017)
	β -TUB	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	97	MF278015	Wu,W. et al. (2017)
	MN304871	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	97	KP339270	Han,Y.-C. et al. (2015)

Tabela 10 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento das regiões Actina (ACT) β -tubulina (β -tub).

(continuação)						
ADR	ACT	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	96	98	KJ534737	Yang, Y.L., et al. (2015)
	MN304868	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	96	98	KP339276	Han, Y.-C., et al. (2015)
	β -TUB	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	94	99	MF278015	Wu, W. et al. (2017)
	MN304872	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	94	99	KP339270	Han, Y.-C. et al. (2015)
SPSR	ACT	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	93	99	JQ949525	Damm, U., et al. (2012)
	MN307372	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	93	99	MF471704	Liu, X., et al. (2017)
	β -TUB	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	95	99	KU221376	Tan, Y.P. (2015)
	MN304873	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	95	99	KU221373	Tan, Y.P. (2015)
ATP	ACT	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	96	98	KJ534737	Yang, Y.L., et al. (2015)
	MN307373	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	93	99	MF471704	Liu, X., et al. (2017)
	β -TUB	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	95	97	KU221373	Tan, Y.P. (2015)
	MN304874	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	95	97	KF772163	Fu, D., et al. (2013)
ANG	ACT	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	96	97	KJ534737	Yang, Y.L., et al. (2015)
	MN307374	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	95	97	MF278014	Wu, W. and Liu, Y. (2017)
	β -TUB	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	98	97	MF278015	Wu, W. et al. (2017)
	MN304875	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	97	98	KU221373	Tan, Y.P. (2015)
SFP-1	ACT	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	96	97	KJ534737	Yang, Y.L., et al. (2015)
	MN307375	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	93	99	JQ949525	Damm, U., et al. (2012)
	β -TUB	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	96	99	MF278015	Wu, W. et al. (2017)
SFP-1	MN304876	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	96	99	KF772163	Fu, D., et al. (2013)
GRA	ACT	<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i>	90	99	JQ949801	Damm, U., et al. (2012)
	MN304870					
	β -TUB	<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i>	92	99	JQ950131	Damm, U., et al. (2012)
SVS	MN304878					
	ACT	<i>Colletotrichum fructicola</i>	95	99	KT372385	Serrato-Diaz, L.M., et al. (2015)
	MN307376	<i>Colletotrichum fructicola</i>	95	99	KT372384	Serrato-Diaz, L.M., et al. (2015)

Tabela 10 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos isolados de *Colletotrichum* spp. com acessos do *GenBank*, através de sequenciamento das regiões Actina (ACT) β -tubulina (β -tub).

(conclusão)

	β -TUB	<i>Colletotrichum fructicola</i>	95	99	KM245092	Hu,M. et al. (2014)
	MN304878	<i>Colletotrichum fructicola</i>	95	99	KC566188	Braganca,C.A.D (2013)
URU	ACT	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	94	99	KC566870	Braganca,C.A.D (2014)
	MN307377	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	94	99	JX009457	Weir,B.S., et al. (2012)
	β -TUB	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	97	99	KT777690	Munir,M. et al. (2015)
	MN304879	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	97	99	KT777689	Munir,M. et al. (2016)
PAM	ACT	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	95	99	JX009568	Weir,B.S. et al. (2012)
	MN307378	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	95	99	JX009498	Weir,B.S., et al. (2012)
	β -TUB	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	97	99	KU743292	Fuentes,S.E., et al. (2016)
	MN304880	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	97	99	KF768557	Rodrigues,A.L., et al. (2013)
SJ-1	ACT	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	94	98	KJ781306	Yang,Y.L.,et al. (2014)
	MN304869	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	96	97	KP642638	Singh,R., et al. (2015)
	β -TUB	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	97	99	KF768557	Rodrigues,A.L., et al. (2013)
	MN304881	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	96	99	JX010377	Weir,B.S., et al. (2012)
LAG-1	ACT	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	95	99	KC566870	Braganca,C.A.D (2014)
	MN307379	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	95	99	JX009457	Weir,B.S., et al. (2012)
	β -TUB	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	96	99	KT777690	Munir,M. et al. (2015)
	MN304882	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	96	99	KT777689	Munir,M. et al. (2016)
SJG-3	ACT	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	95	99	JX009568	Weir,B.S. et al. (2012)
	MN307380	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	94	99	KC566870	Braganca,C.A.D (2014)
	β -TUB	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	97	99	GU994475	Rojas,E.I., et al. (2010)
	MN304883	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	97	99	KT777690	Munir,M. et al. (2015)

Fonte: Autor.

Conforme a análise molecular pode-se observar que existe variação na diversidade de espécies de *Colletotrichum* no presente estudo. Alguns isolados apresentam maior

similaridade entre si como é o caso dos isolados PAM, SJ-1, URU, LAG-1 e SJG-3 que apresentaram alta porcentagem de similaridade com as mesmas espécies (*C. theobromicola*) pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*.

Da mesma maneira, os isolados ADR, ANG, SFP-1, SPSR, IBI-1 e ATP, mostraram grande similaridade entre si, pertencendo a mesma espécie (*C. nymphaeae*) do complexo *C. acutatum*. Dessa forma, isso está de acordo com as características morfológicas encontradas no presente trabalho para os isolados, uma vez que, apresentaram características típicas de espécies dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

As espécies do complexo *C. gloeosporioides* (PAM, SJ-1, URU, LAG-1 e SJG-3) apresentam coloração da colônia mais escura, bem como cresceram mais rapidamente e apresentam conídios maiores em relação aos outros isolados.

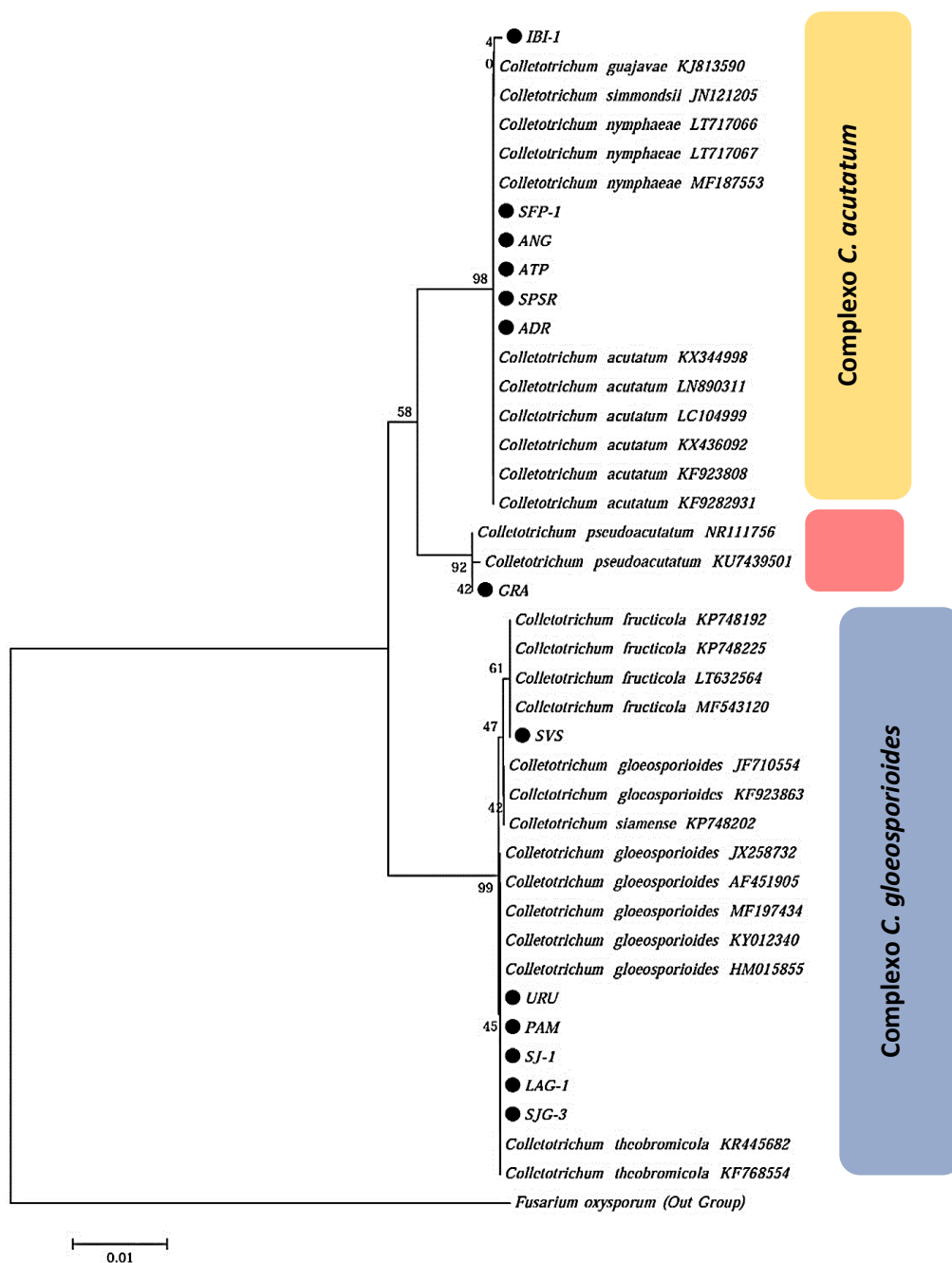
Deve-se destacar também, que o isolado GRA, conforme o sequenciamento das regiões ITS, ACT e β -TUB, não se enquadrou dentro dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, apresentando alta similaridade com *C. pseudoacutatum*, que está apenas distantemente relacionado ao complexo *C. acutatum*.

O complexo *C. acutatum* apresenta grande diversidade fenotípica, e embora *C. pseudoacutatum* tenha morfologia semelhante às espécies pertencentes a esse complexo, (conídios com extremidade afiladas), são filogeneticamente distintos, principalmente pela colônia de coloração marrom escura, aparência rugosa e formação abundante de setas (DAMM 2012). Dessa maneira, o formato afilado dos conídios não é uma característica exclusiva do complexo *C. acutatum*.

A seguir, são apresentados os dendrogramas filogenéticos que foram obtidos após a realização do alinhamento das sequências dos isolados com sequências depositadas no *GenBank* no programa BioEdit (Figuras 11, 12 e 13). A análise filogenética foi conduzida utilizando-se o método *Neighbour-joining* com 1000 replicatas pelo programa MEGA 7. Como grupo externo (outgroup) foram utilizadas sequências de *Fusarium oxysporum*. Sequências de espécies do gênero *Colletotrichum*, disponíveis no *GenBank*, que apresentaram maior cobertura e similaridade foram selecionadas para a construção do dendrograma.

O dendrograma filogenético resultante do alinhamento dos 13 isolados com as sequências do banco de dados da região ITS encontra-se na Figura 11.

Figura 11 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS, com base em 1000 réplicas de *bootstrap*. Os números sobre os ramos representam o número de *bootstrap*. ● Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos no presente estudo.



Fonte: Autor.

A análise inicial das sequências da região ITS obtidas para 13 isolados de *Colletotrichum* spp. revelou que os isolados se agruparam em dois diferentes complexos, (*C. gloeosporioides* e *C. acutatum*) além de apresentar uma espécie que embora apresenta

características morfológicas semelhantes ao complexo *C. acutatum*, é diferente filogeneticamente (*C. pseudoacutatum*) (Figura 11).

Os isolados SVS, URU, PAM, SJ-1, LAG-1 e SJG-3 agruparam-se dentro do complexo *C. gloeosporioides*, com alto valor de bootstrap (99). Nesse clado, é possível ter um indicativo de que o isolado SVS, possivelmente pertença a espécie *C. fructicola* com 61 de bootstrap. Com 92 de bootstrap, o isolado GRA foi alocado no mesmo clado que *C. pseudoacutatum*, possuindo alta similaridade com o mesmo como visto anteriormente (Figura 11 e Tabela 9).

No complexo *C. acutatum* foi formado um grupo com 98 de bootstrap que corresponde aos isolados: IBI-1, SFP-1, ANG, ATP, SPSR e ADR. Nesse caso, possivelmente esses isolados pertençam às espécies: *C. nymphaeae*, *C. simmondsii* e *C. guajavae*.

Dentre as regiões do genoma estudadas para *Colletotrichum*, a ITS é a que possui maior número de sequências depositadas no *GenBank*, sendo considerada útil para a identificação preliminar de espécie ou para colocá-lo em um complexo de espécie (*sensu lato*) (CAI et al., 2009). Dessa forma, várias regiões do genoma de fungos do gênero *Colletotrichum* têm sido analisadas em conjunto com a ITS, entre as quais a β -tubulina, Actina e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (PRIHASTUTI, 2009).

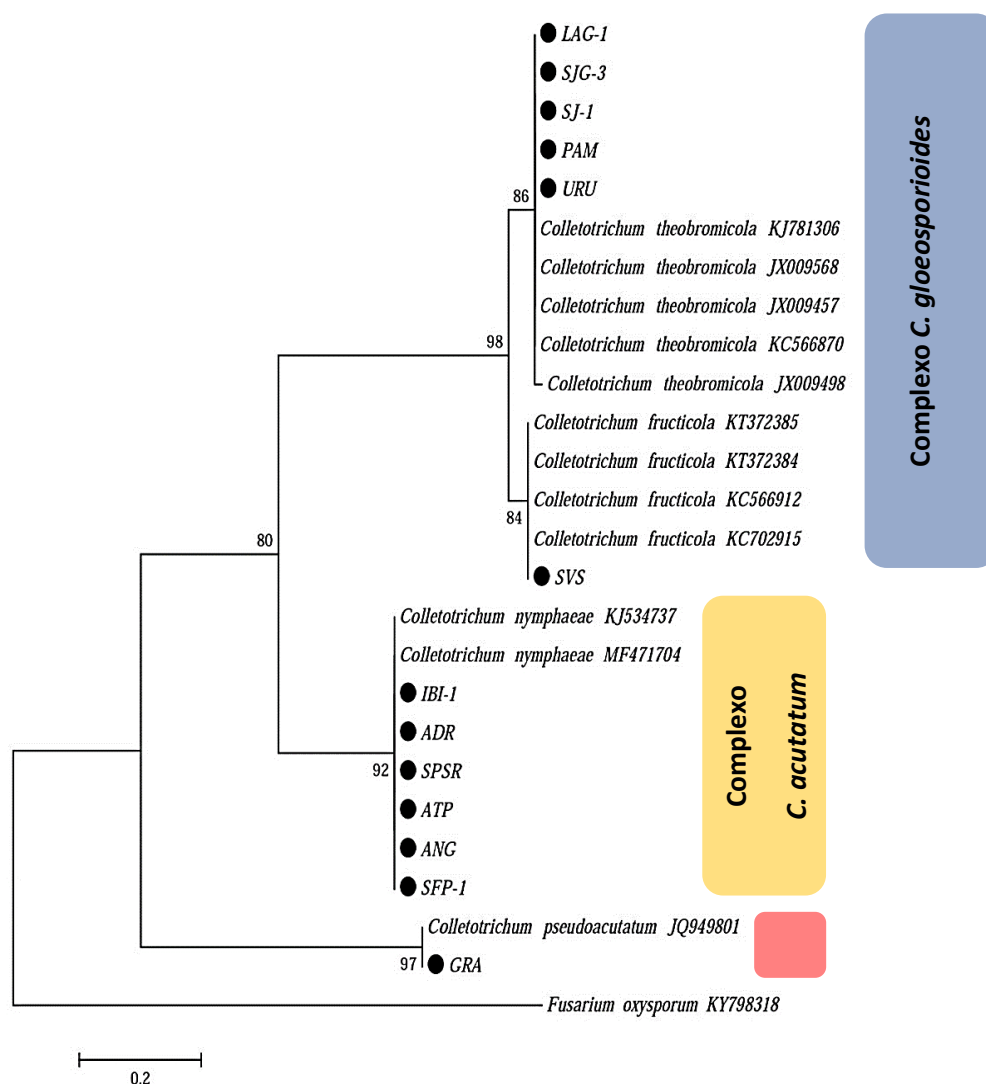
A identificação correta do patógeno além de ser importante para o planejamento de manejo e programas de melhoramento visando à resistência de plantas (MENEZES, 2006), é fundamental na investigação de espécies patogênicas nunca antes encontradas associadas a determinado hospedeiro. Além disso, é extremamente necessário a identificação das espécies de *Colletotrichum* em nível *sensu stricto*, uma vez que elas podem apresentar sensibilidade variadas a determinados fungicidas (TOZZE et al., 2011).

Portanto, foram sequenciadas mais duas regiões (Actina e β -tubulina). Estas regiões são consideradas boas para serem utilizadas como *Barcoding* na diferenciação de *Colletotrichum* spp. em nível *sensu stricto* (CAI et al., 2009).

Considerando a região Actina, os isolados do complexo *C. gloeosporioides* se dividiram em dois cladogramas: um com 86 de bootstrap que agrupou os isolados LAG-1, SJG-3, SJ-1, PAM e URU indicando similaridade genética com *C. theobromicola* e o outro com 84 de bootstrap onde o isolado SVS se agrupou com outros acessos do *GenBank* de *C. fructicola* (Figura 12).

Ainda com relação à região actina, todos os isolados do complexo *C. acutatum* (IBI 1, ADR, SPSR, ATP, ANG e SFP-1) agruparam-se com *C. nymphaeae* com 92 de bootstrap. O isolado GRA, teve alta similaridade genética com o acesso do *GenBank* *C. pseudoacutatum*, agrupando-se em um mesmo clado com um alto bootstrap (97), indicando que são espécies muito semelhantes geneticamente entre si.

Figura 12 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região Actina (ACT), com base em 1000 réplicas de *bootstrap*. Os números sobre os ramos representam o número de *bootstrap*. ● Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos no presente estudo.

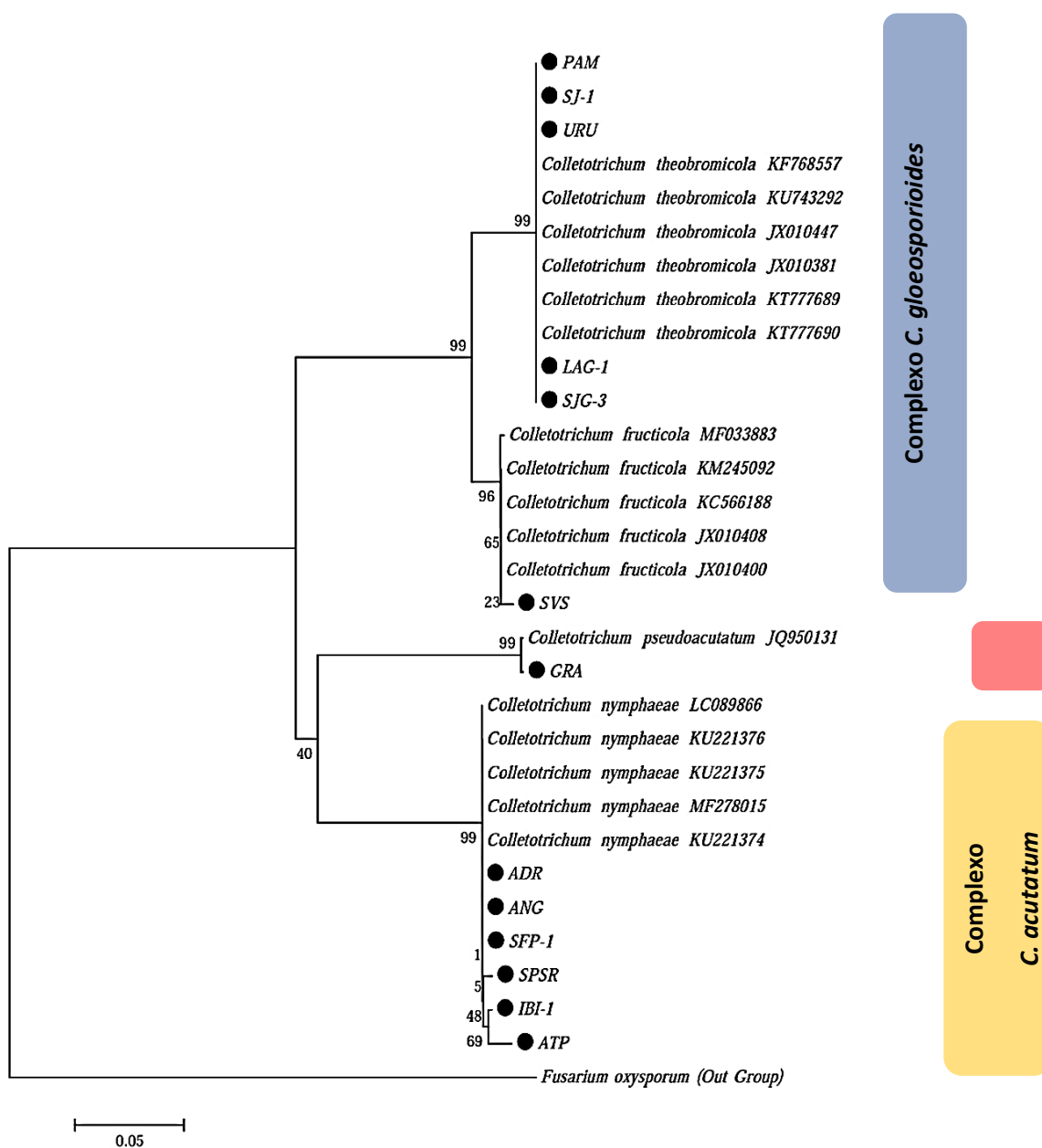


Fonte: Autor.

Concomitantemente, foi realizado o sequenciamento da região β -tubulina a qual confirmou os resultados das análises anteriores, porém com maior bootstrap.

Considerando os isolados do complexo *C. gloeosporioides* (PAM, SJ-1, URU, LAG-1, SJG-3), esses se agruparam em um mesmo clado com bootstrap de 99 apresentando alta similaridade genética com o acesso de *C. theobromicola* do *GenBank* (Figura 13).

Figura 13 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de seqüências de DNA da região β -tubulina (β -tub) com base em 1000 réplicas de *bootstrap*. Os números sobre os ramos representam o número de *bootstrap*. ● Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos no presente estudo.



Fonte: Autor.

O isolado SVS permaneceu no mesmo clado de *C. fructicola* com 96 de bootstrap. Os isolados do complexo *C. acutatum* (ADR, ANG, SFP-1, SPSR, IBI-1 e ATP) apresentaram alta similaridade genética com *C. nymphaeae* com 99 de bootstrap, pertencendo, portanto, todos esses isolados à mesma espécie.

O isolado GRA embora apresentasse características morfológicas compatíveis com espécies do complexo *C. acutatum* não apresentou similaridade com as espécies pertencentes a esse complexo quando comparados com os acessos disponíveis no *GenBank*. Através da análise molecular foi possível constatar alta similaridade deste isolado com *C. pseudoacutatum*, confirmando da mesma maneira, os resultados encontrados com o sequenciamento das regiões ITS e ACT, no entanto com um maior valor de bootstrap (99).

O sequenciamento das regiões ITS, ACTINA e β -TUBULINA no presente estudo, permitiu a distinção dos treze isolados em quatro espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo que cinco dos isolados apresentam alta similaridade genética com os acessos do *GenBank* das espécies *C. theobromicola* (PAM, SJ-1, URU, LAG-1, SJG-3) e um com *C. fructicola* (SVS) (ambas pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*). Os seis isolados pertencentes ao complexo *C. acutatum* apresentam alta similaridade genética com os acessos do *GenBank* da espécie de *C. nymphaeae* (ADR, ANG, SFP-1, SPSR, IBI-1 e ATP) e apenas um isolado com a espécie *C. pseudoacutatum* (GRA). *C. theobromicola*, *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. pseudoacutatum* são relatadas como importantes patógenos, causando antracnose em diversas culturas (MARTINS, et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018; CARRARO et al., 2019; BRAGANÇA et al., 2016; POLETTO et al., 2019; SOARES et al., 2017).

Até o momento havia sido relatado três espécies causando antracnose em goiabeira-serrana. No Brasil, Andrade e Ducroquet (1993) identificaram *C. gloeosporioides* Penz. *sensu lato* e mais recentemente Fantinel et al. (2017) reportaram *C. siamense*. Na Itália foi relatado *C. acutatum sensu lato* (Camele et al., 2018) assim como na Nova Zelândia (LARDNER, 1999). Este estudo identificou mais quatro espécies de *Colletotrichum* associada a frutos de goiaba-serrana com antracnose no Brasil, são elas: *C. theobromicola*, *C. fructicola*, *C. nymphaeae* e *C. pseudoacutatum*.

Assim, o sequenciamento das regiões ITS, ACT e β -TUBULINA de maneira conjunta foi fundamental na identificação de espécies de *Colletotrichum sensu stricto*, associadas à antracnose em goiabeira-serrana.

Enfim, a identificação de quatro novas espécies de *Colletotrichum* ocorrendo nesta cultura é de grande valia para o conhecimento da variabilidade da população do patógeno visto que são poucas as espécies relatadas associadas a goiaba-serrana, sendo em sua maioria em nível *sensu lato*. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento ou recomendação de medidas adequadas considerando o manejo integrado da doença.

Conclusões

1- Existe diversidade morfofisiológica entre os isolados de *Colletotrichum* spp., associados a frutos de goiaba-serrana com sintomas de antracnose;

2- Caracteres morfológicos não são suficientes para identificar *Colletotrichum* spp. associados a frutos de goiaba-serrana em nível de espécie, embora tenham permitido classificar os isolados em dois complexos de espécies: complexo *C. gloeosporioides* e complexo *C. acutatum*;

3- Há pelo menos uma espécie de *Colletotrichum* que não se enquadra às espécies descritas nos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em associação com sintomas de antracnose em goiaba-serrana;

4- O sequenciamento das regiões ITS, ACTINA e β -TUBULINA foi informativo na classificação dos isolados de *Colletotrichum* spp. em nível *sensu stricto*.

5- *C. nymphaeae* (complexo *C. acutatum*), *C. theobromicola* e *C. fructicola* (complexo *C. gloeosporioides*) e *C. pseudoacutatum* foram encontrados associados a frutos com antracnose em goiaba-serrana em sua área de ocorrência natural.

Agradecimentos

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida e ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em pesquisa (PQ) para Marlove Fátima Brião Muniz.

À EPAGRI, em nome da Sra. Marlise N. Ciotta pela parceria e comprometimento em atender às demandas que surgiram principalmente na fase de coleta dos isolados.

Ao Prof. Silmar Primieri pelo auxílio na coleta dos frutos.

Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, E.M.; et al. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 32:21-31, 2007.
- ANDRADE, E.R. DUCROQUET, J.P.H.J. Antracnose em goiabeira serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, n.2, p.7-10, Cruz das Almas, 1993.
- ARAÚJO, L.; PINTO, F.A.M.F. Principais doenças e seu controle. In: CIOTTA, M N.; ARIOLI, C.J.; PINTO, F.A.M.F.; SANTOS, K. dos; ARAUJO, L.; PASA, M. da S. (Orgs.). **A cultura da goiabeira-serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p. 147-166.
- ARAÚJO, M.B.M., et al. First report of *Colletotrichum theobromicola* and *C. tropicale* causing anthracnose on fruits of carnauba palm in Brazil. **Plant Dis.** 102(1):244, 2018.
- ASSIS, T.C.; et al. Estudo comparativo de isolados de *C. gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 21, p.208-212, 2001.
- AVESKAMP, M.M.; et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**. 101:363–382, 2009.
- BONETT, L.P., et al. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência**, 2010, v.6, n. 3, p. 451-463.
- BRAGANÇA C.A.; et al. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal Biology** 120:547-561, 2016.
- CAI, L.; et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, 2009.
- CAMELE, I. et al. First Report of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose in *Feijoa sellowiana* in Italy. **Plant disease**, v. 102, n. 9, p. 1850-1850, 2018.
- CANNON, P.F.; et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012.
- CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**. 91(3):553-556, 1999.
- CARRARO, T.A.; et al. First Report of *Colletotrichum fructicola*, *C. nymphaeae* and *C.*

melonis causing Persimmon Anthracnose in Brazil. **Plant Disease**, 2019.

CARVALHO, F.M.S. **Caracterização cultural, morfológica e genética de espécies de *Colletotrichum* associadas a doenças em macieira**. Dissertação de Mestrado. Londrina. Universidade Estadual de Londrina, 1997.

CRUZ, C.D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. V. 35, n. 3, p.271-276, 2013.

DAMM, U., et al. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. **IMA Fungus** 1(2): 161–165, 2010.

DAMM, U.; et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology** 73: 1–36, 2012a.

DAMM, U.; et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology** 73: 37–113, 2012b.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; LIU, F. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 29-59, 2013.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology** Methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 434 p., 1995.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. 19:11-15, 1987.

DUCROQUET, J.P.H.J.; et al. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n.1, p. 77-80, 2007.

DUCROQUET, J.P.H.J., et al. Novas cultivares brasileiras de goiabeira-serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. **Agropecuária Catarinense**, v. 21, p.79-82, 2008.

FANTINEL, V.S., et al. First Report of *Colletotrichum siamense* Causing Anthracnose on *Acca sellowiana* Fruits in Brazil. **Plant Disease**, 101(6), 1035-1035, 2017.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Minas Gerais, v.6, n. 2, p.36-41, 2008.

GUNAWARDHANA, P.L.T., et al. A phenetic analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from selected host plants. **Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)**, Sri Lanka, v. 38, n. 2, p. 57-66, 2009.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41 p. 95-98, 1999.

HASSAN, O.; et al. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon

- anthracnose in South Korea. **Plant disease**, v. 102, n. 5, p. 1015-1024, 2018.
- HU, M.J.; et al. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. **Plant Disease**, 99, 806–814, 2015.
- HYDE, K.D.; et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity** 39: 1-17, 2009.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema de Coordenadas Geográficas, Datum SIRGAS 2000**. Disponível em: <https://mapas.ibge.gov.br/bases-e-referenciais/bases-cartograficas/malhas-digitais.html>. Acesso em: 20 setembro de 2019.
- LARDNER, R.; et al. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Mycol. Res.** 103:275-285, 1999.
- LENNÉ, J.M. **Studies on the biology and taxonomy of *Colletotrichum* species**. v.1, 187p. Ph.D. Thesis (Agriculture). University of Melbourne, Melbourne, Australia, 1978.
- LIU, F; et al. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. **Persoonia**, v. 33, p. 83-97, 2014.
- LOPES, M.E. et al. **Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret**, 2013.
- LÓPEZ, A.M.Q. **The interaction between antracnose, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., and cashew, *Anacardium occidentale* (L.)**. 276p. PhD thesis (Molecular Plant Pathology) - Long Ashton Research Station, University of Bristol, Bristol, UK, 1999.
- LÓPEZ, A.M.Q; PEREIRA, D.S.T. Interação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e ecótipos de pinha. **Bragantia**. Campinas , v. 69, n. 1, p. 105-114, 2010.
- MAFACIOLI, R., et al. Caracterização morfofisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 113-117, 2006.
- MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science, Madison**, v.2, p. 176-177, 1962.
- MARTINS, M.V.V.; et al. First report of *Colletotrichum theobromicola* causing leaf spot in sapote (*Manilkara zapota*) seedlings in Brazil. **Pl. Dis.** 102(12):2641–2642, 2018.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica** 3:170-179, 2006.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 574p. 1972.

MORETTO, S. P. A domesticação e a disseminação da feijoa (*Acca sellowiana*) do século XIX ao século XXI. 2014. 432 f. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MUNIR, M., et al. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. **Plant Disease** 100: 2194–2203, 2016.

MUNSELL SOIL COLOR CHARTS – **Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation**, 2009.

O’CONNELL, R.J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9. 1060-1067, 2012.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 111 f.,1991.

PASQUARIELLO, M.S.; et al. Agronomic, nutraceutical and molecular variability of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) germplasm. **Scientia Horticulturae**, v.191, p.1-9, 2015.

PERES, N.A.; et al. Life styles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease** 89: 784–796. 2005.

PIVA, C.A.G. **Identificação e Caracterização Morfológica e Molecular de *Colletotrichum* spp. e *Pestalotiopsis* spp. em videira**. Tese de Doutorado. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2017.

POLETTI, T., et al. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, (First Look), jul. 2019.

PRIHASTUTI, H., et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity** 39: 89-109, 2009.

RABUSKE, J.E.. ***Colletotrichum* sp. causando mancha foliar em *Cassia fistula* L.: patogenicidade, morfologia, caracterização molecular e controle *in vitro***, 2016.

REBELO, J.A., **Comportamento de cinco raças de *Colletotrichum lindemuthianum* em condições de laboratório**.1989.127f. Dissertação (mestrado em Agronomia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

SANTOS, K.L. et al. *Acca sellowiana*. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília, MMA, cap.5, p. 111-130, 2011.

SAWANT, I.S.; et al. Emergence of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato as the dominant pathogen of anthracnose disease of grapes in India as evidenced by cultural,

morphological and molecular data. **Australasian Plant Pathology**, 41, 493-504, 2012.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, 354:311-313, 2006.

SHARMA, G., SHENOY, B.D. Multigene sequence-based identification of *Colletotrichum cymbidiicola*, *C. karstii* and *C. phyllanthi* from India. **Czech Mycology** 65(1): 79–88, 2013.

SOARES, W.R.O. et al. First Worldwide Report of *Colletotrichum pseudoacutatum* Causing Anthracnose on *Syzygium jambos*. **Plant Disease**, v. 101, n. 7, p. 1322-1322, 2017.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1980.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum - biology, epidemiology and control* (Ed. by Bailey, J.; Jeger, M.), pp. 1-26. **CAB International**, Wallingford, UK, 1992.

TAMURA, K.; et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 596-1599, 2007.

THAUNG, M.M. Biodiversity survey of coelomycetes in Burma. **Australasian Mycologist** 27:74-110, 2008.

THORP, G.; BIELESKI, R. Feijoas: origins, cultivation and uses. Auckland, N.Z.: **HortResearch**. Ed. David Bateman. 87p., 2003.

TOZZE JR., H.J. **Caracterização e identificação de espécies *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, São Paulo, 81p., 2007.

TOZZE JR., H.J., et al. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose on pepper in Brazil. **Plant Disease**, v. 93, p. 106, 2009.

TOZZE JR., H.J.; FIRMINO, A.C.; MASSOLA JR, N.S. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum* spp. do pimentão a fungicidas sistêmicos. In: XXXIV Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 36, 2011.

TOZZE JR., H.J., et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 270-280, 2015.

UDAYANGA, D.; et al. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits **Fungal Diversity**, v. 61, p. 165-179, 2013.

WEIR, B.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species

complex. **Studies in Mycology**, 73:115–180, 2012.

WESTON, R.J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): a review. **Food Chemistry**, v.121, p.923-926, 2010.

WHITE, T.J.; et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York, 1990.

WIKKEE, S.; et al. *Colletotrichum* species from Jasmine (*Jasminum sambac*). **Fungal Diversity**, v. 46, p. 171- 182, 2011.

CAPÍTULO 4 - PATOGENICIDADE E REAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE/RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA À ANTRACNOSE

Resumo - A antracnose é a principal doença que acomete a cultura da goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg), uma vez que pode levar a perdas de até 100% na produção dos frutos. Os sintomas nos frutos caracterizam-se inicialmente por lesões de formato circular de coloração escura que coalescem com o avanço da doença, levando os mesmos à abscisão. A taxonomia clássica possibilitou identificar os agentes causais, somente em nível *sensu lato* (complexos de espécies). Recentemente, a análise molecular multigênica possibilitou a identificação mais precisa das espécies de *Colletotrichum* associadas aos sintomas de antracnose nos frutos. Esta identificação, em nível *sensu stricto* (táxon definido), classificou os isolados como pertencentes a dois complexos de espécies: *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. theobromicola*, *C. siamense* e *C. fructicola*) e *Colletotrichum acutatum* (*C. nymphaeae*), assim como *C. pseudoacutatum*, espécie que não se associa a nenhum complexo. A partir destes resultados, torna-se importante investigar a patogenicidade destas espécies fúngicas a goiabeira-serrana, bem como estudar a reação de suscetibilidade/resistência das cultivares comerciais “Alcântara”, “Helena”, “Mattos”, e “Nonante” à antracnose. Para tanto, a partir de colônias com sete dias de crescimento em meio Mathur, foram preparadas suspensões de esporos (10^6 esporos mL⁻¹) dos isolados de *Colletotrichum*. Para a inoculação de cada isolado, foram utilizados 10 frutos em estágio intermediário de desenvolvimento de cada cultivar. Primeiramente os frutos foram desinfestados superficialmente, em seguida foram acomodados em bandejas de polipropileno (33 x 21,8 x 10,3 cm), sobre duas folhas umedecidas de papel filtro. A suspensão foi aplicada em três locais sobre a superfície do fruto, sem ferimento. No controle, a inoculação foi apenas com água estéril. A incubação ocorreu a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 12h, os frutos foram monitorados por 20 dias. A patogenicidade foi confirmada quando houve o aparecimento de pelo menos uma lesão, independente da cultivar e, a suscetibilidade/resistência, foi avaliada pela quantidade de lesões produzidas. As espécies *C. nymphaeae*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. theobromicola* e *C. pseudoacutatum* são patogênicas à goiabeira-serrana, pois reproduziram os sintomas originais da antracnose. A suscetibilidade das cvs. “Helena” e “Nonante” foi influenciada pela variabilidade específica do patógeno. A cv. “Alcântara” é suscetível e a cv. “Mattos” é resistente à todas as espécies de *Colletotrichum* testadas. Dessa forma, a cv. “Mattos” é a cultivar de goiabeira-serrana mais indicada para reduzir os níveis de antracnose nos pomares em sistema de cultivo convencional, integrado ou orgânico.

Palavras-chave: *Feijoa sellowiana*; suscetibilidade; inoculação antracnose.

Abstract - Anthracnose is the main disease that affects the culture of *Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg (feijoa) since it can lead to losses of up to 100% in fruit production. Fruit symptoms are initially characterized by dark-colored circular-shaped lesions that coalesce with disease progression, leading to abscission. The classical taxonomy made it possible to identify causal agents only at the broad sense level (species complexes). Recently, multigenic molecular analysis has enabled the more accurate identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose symptoms in fruits. This identification, at sense stricto level (defined taxon), classified the isolates as belonging to two species

complexes: *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. theobromicola*, *C. siamense* and *C. fructicola*) and *Colletotrichum acutatum* (*C. nymphaeae*), as well as *C. pseudoacutatum*, a species that is not associated with any complex. From these results, it is important to investigate the pathogenicity of these fungal species to guava-serrana, as well as to study the susceptibility/resistance reaction of commercial cultivars "Alcântara", "Helena", "Mattos", and "Nonante" anthracnose. For this purpose, from seven day growth colonies in Mathur medium, spore suspensions (10^6 spores ml⁻¹) of the *Colletotrichum* isolates were prepared. For the inoculation of each isolate, 10 fruits at medium stage of development of each cultivar were used. Firstly, the fruits were superficially disinfected and then placed in polypropylene trays (33 x 21.8 x 10.3 cm) on two moistened sheets of filter paper. The suspension was applied in three places on the fruit surface without injury. In the control, the inoculation was only with sterile water. Incubation occurred at 25 ± 1 °C, under 12h photoperiod, fruits were monitored for 20 days. Pathogenicity was confirmed when at least one lesion appeared, regardless of cultivar, and susceptibility/resistance was assessed by the amount of lesions produced. The species *C. nymphaeae*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. theobromicola* and *C. pseudoacutatum* are pathogenic to feijoa, as they reproduced the original symptoms of anthracnose. The susceptibility of cvs. "Helena" and "Nonante" was influenced by the specific variability of the pathogen. The cv. "Alcantara" is susceptible and cv. "Mattos" is resistant to all *Colletotrichum* species tested. Thus, cv. "Mattos" is the best feijoa cultivar to reduce anthracnose levels in orchards in conventional, integrated or organic cultivation system.

Keywords: *Feijoa sellowiana*; susceptibility; anthracnose inoculation.

Introdução

A goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg) é uma espécie frutífera da família Myrtaceae, conhecida popularmente como feijoa, goiaba do mato, goiaba da serra ou goiaba-serrana, tem origem no planalto meridional brasileiro e nordeste do Uruguai. Na região Sul, a espécie apresenta ótima adaptabilidade ao clima frio, ocorrendo com maior frequência em áreas com altitudes superiores a 800 m (AMARANTE; SANTOS, 2012).

O fruto é classificado como um pseudofruto do tipo pomo, normalmente apresenta formato oblongo, a polpa tem coloração clara e a casca é verde apresentando textura lisa ou rugosa. O sabor e o aroma do fruto têm características marcantes e seu consumo pode ser *in natura* ou pode fazer parte da composição de sucos, geleias, licores, entre outros. Além dessas características, os frutos apresentam propriedades nutracêuticas, antibactericidas e antioxidantes, fato que é atribuído a presença de compostos fenólicos tanto na polpa quanto na casca (AMARANTE et al., 2017). Além disso, a goiabeira-serrana

apresenta grande potencial para uso ornamental, paisagístico e para recuperação de áreas degradadas (TONETTO, 2018).

Apesar da espécie ter potencial econômico considerável, os plantios, para fins comerciais são raros no Brasil principalmente por conta da suscetibilidade dessa espécie ao ataque de pragas e doenças (GIACOMETTI; LLERAS, 1994).

Considerando o aspecto fitossanitário, a antracnose é a principal doença que afeta a cultura e é causada por fungos do gênero *Colletotrichum* que podem danificar até 100% de frutos jovens ou próximos da maturação (ANDRADE; DUCROQUET, 1993; DUCROQUET et al., 2000). Recentemente, no Brasil, Fantinel et al. (2017) identificaram *Colletotrichum siamense* patogênico à goiabeira-serrana causando manchas escuras bem definidas de formato irregular que, após aumentarem de tamanho se tornam deprimidas e coalescidas, levando os frutos ao apodrecimento e, conseqüentemente, acarretando diminuição de produtividade nos pomares.

Para o cultivo comercial desta espécie ser viável, é importante que sejam selecionadas cultivares com características superiores às plantas em estado natural, em termos de produtividade, estabilidade na produção e qualidade dos frutos. Com esta intenção, pesquisadores da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) lançaram quatro cultivares de goiabeira-serrana com elevado potencial produtivo denominadas de: “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” (DUCROQUET et al., 2007; DUCROQUET et al., 2008). Apesar de exploradas comercialmente, estas cultivares não apresentam diferenças sensíveis em relação aos exemplares silvestres, no que tange a resistência à antracnose, sendo necessário, eventualmente, medidas de controle desta doença nos pomares.

Deve-se destacar, todavia, que a quantificação da doença é parte fundamental para a correta interpretação de estudos de controle. Nesse sentido, as medidas mais utilizadas para quantificar doenças em plantas são a incidência e a severidade. A incidência é definida como a porcentagem (frequência) de plantas doentes ou partes de plantas doentes em uma amostra ou população enquanto a severidade é definida como a porcentagem da área ou do volume de tecido coberto por sintomas (AMORIM, 1995).

A principal forma de manejo da antracnose em pomares brasileiros vem sendo realizada pelo manejo integrado de doenças, com a implantação dos pomares em áreas adequadas, utilizando espaçamentos que permitam a insolação e arejamento das plantas,

podas, adubações equilibradas, reduzindo o inóculo inicial através de táticas como a evasão, exclusão, erradicação e a utilização de cultivares resistentes.

Nesse sentido, o emprego da resistência genética é considerado o método preferencial para controlar as doenças por ser uma estratégia de maior durabilidade e não onerar os custos de produção (VALENT, 1990; THOMÉ et al., 1999; LIU et al., 2007; SINGH et al., 2015). Assim, o desenvolvimento de novas cultivares com características fenológicas similares, porém com diferentes genes de resistência, podem facilitar a utilização do controle genético em pomares goiabeira-serrana.

Segundo Ishikawa et al. (2018), o desenvolvimento de materiais resistentes a patógenos de plantas exige técnicas confiáveis de avaliação da doença e seleção. A maioria dos estudos que avaliam germoplasma de plantas são realizados em campo com histórico da doença. Estes estudos podem produzir resultados inconsistentes, uma vez que diversos fatores inerentes ao patossistema podem variar entre locais e entre safras. Para minimizar essa variabilidade, são indicados ensaios sob condições controladas em casa de vegetação ou câmaras de crescimento, com padronização das condições ambientais e técnicas de inoculação.

Conforme estudo desenvolvido recentemente (Capítulos 1 e 3), através da análise molecular multigênica, foi possível a identificação precisa das espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em goiabeira-serrana. Esta identificação, em nível *sensu stricto* (táxon definido), definiu os isolados como pertencentes a dois complexos de espécies: o complexo *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. theobromicola*, *C. siamense* e *C. fructicola*) e o complexo *Colletotrichum acutatum* (*C. nymphaeae*), assim como, *C. pseudoacutatum*, espécie que não se associa a nenhum complexo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi testar a patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. e avaliar a reação de suscetibilidade/resistência das principais cultivares de goiabeira-serrana à antracnose.

Material e métodos

No presente estudo, o teste de patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. associados aos sintomas de antracnose em goiabeira-serrana foi conduzido de maneira concomitante com a avaliação da reação de suscetibilidade/resistência das cultivares comerciais “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” à antracnose.

Para isso, entre os meses de fevereiro e março do ano de 2016 e 2017, realizou-se

coleta de frutos com sintomas de antracnose causada por *Colletotrichum* spp. em pomares de goiabeira-serrana, nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e no Departamento de Salto, no Uruguai. Os isolados utilizados no presente estudo foram selecionados com base nas árvores filogenéticas construídas com os treze isolados de *Colletotrichum* (Capítulo 3), através do sequenciamento das regiões ITS, Actina e β -tubulina cujos códigos de depósitos encontram-se na Tabela 1.

Além desses isolados, foi utilizada a espécie *C. siamense* identificada previamente através das regiões fator de alongação, Actina (ACT) e β -tubulina (β -TUB), cujos códigos de depósitos no *GenBank* são respectivamente: KX845557, KX858807 e KX858806, conforme detalhado no Capítulo 1 (FANTINEL, 2017).

Selecionou-se, dessa maneira, espécies de todos os complexos de *Colletotrichum* spp. associadas a antracnose em goiaba-serrana na sua área de ocorrência natural: *C. gloeosporioides* (*C. siamense* (1 isolado), *C. fruticola* (1 isolado) e *C. theobromicola* (5 isolados)) e complexo *C. acutatum* (*C. nymphaeae* (6 isolados) bem como a espécie *C. pseudoacutatum*.

Tabela 1 - Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de antracnose, no sul do Brasil e no Uruguai, selecionados para o teste de patogenicidade e reação de cultivares.

(continua)

Isolado	Nº acesso no <i>GenBank</i> *			Espécies	Data de Coleta	Cidade/estado/	Coordenadas (GMS)
	ITS	ACT	β -TUB				
SPSR	MN264622	MN307372	MN304873	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	mar/17	São Pedro da Serra RS/BR	29°25'01.6"S 51°31'15.4"W
SVS	MN262646	MN307376	MN304877	<i>Colletotrichum fruticola</i>	mar/17	Salvador do Sul RS/BR	29°26'37.4"S 51°31'12.9"W
GRA	MN262638	MN304870	MN304878	<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i>	fev/17	Gramado - RS/BR	29°23'36.9"S 50°53'08.3"W
ATP	MN264623	MN307373	MN304874	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	fev/17	Antônio Prado - RS/BR	28°54'23.9"S 51°14'10.9"W
IBI-1	MN264620	MN304637	MN304871	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	fev/17	Ibiraiaras - RS/BR	28°16'30.9"S 51°37'23.5"W
ANG	MN264624	MN307374	MN304875	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	mar/16	Anta Gorda - RS/BR	28°57'31.5"S 52°00'40.6"W
SJG-3	MN262636	MN307380	MN304883	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	fev/17	São Jorge - RS/BR	28°28'24.5"S 51°43'58.1"W
ADR	MN264621	MN304868	MN304872	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	fev/17	André da Rocha -RS/BR	28°37'50.4"S 51°34'34.5"W
SFP-1	MN264625	MN307375	MN304876	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	fev/17	São Francisco de Paula -RS/BR	29°27'56.5"S 50°29'48.8"W
LAG-1	MN262635	MN307379	MN304882	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	fev/17	Lages -SC/BR	27°48'27.6"S 50°19'46.3"W

Tabela 1 - Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de antracnose, no sul do Brasil e no Uruguai, selecionados para o teste de patogenicidade e reação de cultivares.

							(conclusão)
SJ-1	MN262634	MN304869	MN304881	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	fev/17	São Joaquim - SC/BR	28°16'29.2"S 49°56'16.8"W
PAM	MN262633	MN307378	MN304880	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	mar/17	Palmas -PR/BR	26°28'31.3"S 51°57'05.9"W
URU	MN262632	MN307377	MN304879	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	mar/17	Salto - ST/UY	31°23'29.2"S 57°57'29.2"W

Fonte: Autor.

* Identificação das espécies de *Colletotrichum* spp. através do sequenciamento das regiões ITS, Actina (ACT) e β -tubulina (β -TUB).

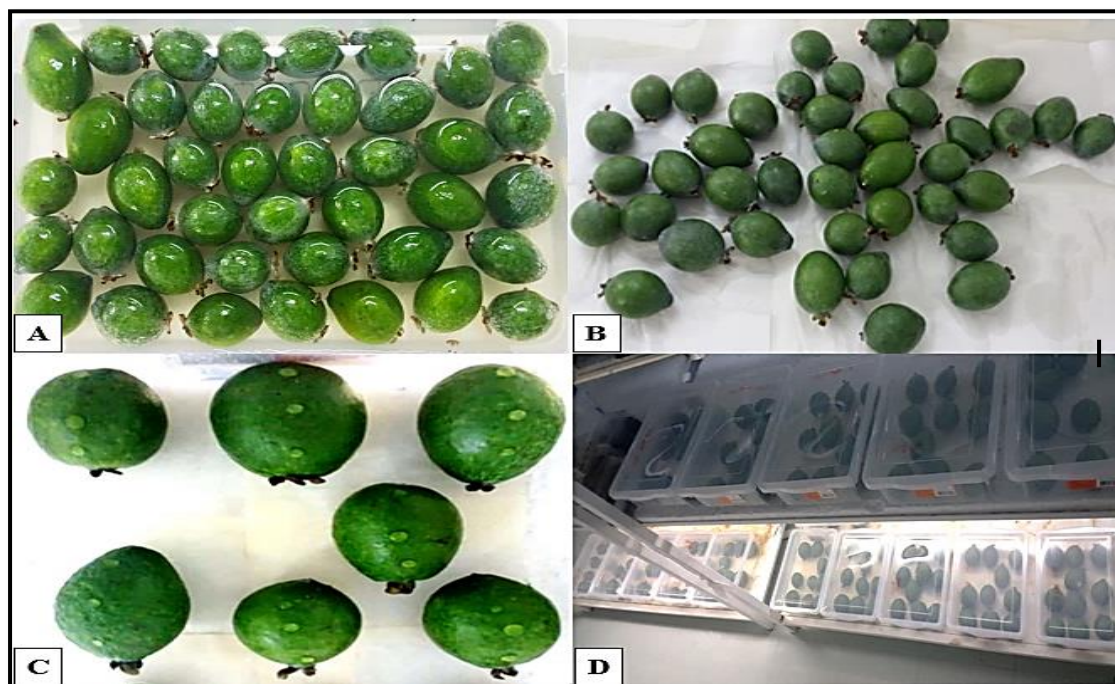
Para a realização do teste de patogenicidade e para a avaliação da reação de suscetibilidade/resistência das cultivares de goiabeira-serrana à antracnose, foram coletados frutos sadios, sem sintomas aparentes de antracnose ou do ataque de outros fitopatógenos das cultivares “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante”. Os frutos foram coletados do pomar do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) que a EPAGRI mantém no município de São Joaquim/SC, o mesmo situa-se em uma altitude de 1415 m, latitude 28° 17' 25'' S e longitude 49° 56' 56'' W. Os frutos foram desinfestados por 30s com etanol a 70%, hipoclorito de sódio a 1% e, lavados por três vezes em água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram colocados sobre papel para remoção do excesso de água em temperatura ambiente (Figura 1). A seguir, foram acomodados em bandejas de polipropileno (33 x 21,8 x 10.3 cm) sobre duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada esterilizada.

Para obtenção da suspensão de esporos de cada isolado fúngico, foram adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada por placa, contendo colônias de *Colletotrichum* sp. que foram cultivadas em meio Mathur (meio que permitiu melhor esporulação dos isolados conforme Capítulo 3) por 14 dias de crescimento em câmara de incubação a 25 °C e 12 horas de fotoperíodo. Posteriormente, com o auxílio da alça de Drigalski foi realizada a raspagem do micélio fúngico na superfície do meio, sendo a suspensão filtrada em uma dupla camada de gaze para um béquer. A contagem da concentração de esporos foi efetuada com o auxílio da câmara de Neubauer e a concentração de esporos ajustada para 1×10^6 esporos mL⁻¹ (LOPES, 2014).

Segundo Degenhardt et al. (2007), considerando os coeficientes de repetibilidade, dez frutos de goiaba-serrana por cultivar são suficientes para expressar valores de herdabilidade, baseados em sua variabilidade genética e fenotípica. Desta maneira, para a

aplicação da suspensão de esporos foram utilizados dez frutos por isolado por cultivar, sendo que cada repetição foi constituída por um fruto. A suspensão de esporos foi aplicada segundo metodologia proposta por Lopes (2014) com modificações. Cada fruto foi inoculado com 100 μ L da suspensão, dividida em três gotas, distribuídas separadamente sobre o exocarpo (Figura 1). No tratamento controle, a inoculação foi realizada apenas com água destilada e esterilizada. A seguir, os frutos foram incubados a 25°C e fotoperíodo de 12 h, sendo que, a cada dois dias, os papéis filtro foram reumedecidos. As condições de câmara úmida são necessárias, a fim de que o inóculo disponha de condições ambientais favoráveis para dar início aos processos de germinação e penetração nos tecidos do hospedeiro.

Figura 1 – Inoculação de *Colletotrichum* sp. em frutos de goiabeira-serrana para o teste de patogenicidade e reação de cultivares. A: frutos em água para remoção do álcool e do hipoclorito de sódio; B: frutos sobre papel filtro secando em temperatura ambiente. C: frutos com suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp. no exocarpo. D: Bandejas dispostas em prateleiras em sala climatizada. Barras = 2 cm.



Fonte: Autor.

A quantificação da incidência da antracnose foi realizada visualmente aos 20 dias após a inoculação da suspensão de esporos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (LOPES, 2014). Se, em pelo menos uma das gotas depositadas sobre o fruto,

houve o aparecimento de sintoma, a incidência foi quantificada como positiva, ou, na ausência, como negativa, para cada fruto (repetição).

A severidade foi observada em cada fruto, no local onde as gotas da suspensão de esporos foram aplicadas, anotando-se o número de lesões e transformando-as em porcentagem. Foi utilizada uma escala diagramática e atribuídas notas de 1 a 4, onde 1=0% (sem sintomas); 2=33,3% (uma gota com sintoma); 3=66,6% (duas gotas com sintoma); 4=100% (três gotas com sintoma). Foi considerada resistente a cultivar que recebeu médias de notas entre 1 e 2; moderadamente resistente a cultivar que recebeu médias de notas entre 2 e 3 e suscetíveis àquelas que obtiveram notas acima de 3. Após as avaliações, para a confirmação da patogenicidade, os patógenos foram reisolados, a fim de que se completassem os postulados de Koch.

Os testes de patogenicidade e de reação de cultivares, foram realizados simultaneamente em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial composto de dois fatores (5 espécies de *Colletotrichum* spp. x 4 cultivares de goiabeira-serrana). Utilizaram-se 10 repetições x isolado x cultivar, sendo que cada fruto representou uma unidade amostral. Os dados foram submetidos à análise de variância e a testes de comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2008).

Resultados e Discussão

Os primeiros sintomas de antracnose nos frutos de goiabeira-serrana foram observados no quarto dia após a inoculação da suspensão de esporos de *C. nymphaeae*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. theobromicola* e *C. pseudoacutatum* e todos os isolados mostraram-se patogênicos às cvs. “Alcântara”, “Helena”, “Mattos”, e “Nonante”. As lesões observadas nos frutos iniciaram com pequenas pontuações escuras no local da inoculação do patógeno, que evoluíram de tamanho, coalesceram e formaram áreas maiores de tecido necrosado (Figura 2).

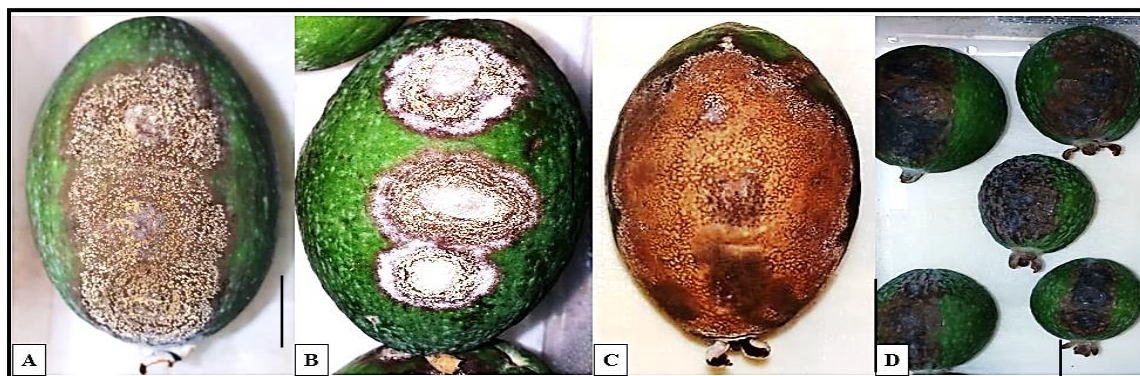
Figura 2 – Sintomas de antracnose em frutos de goiabeira-serrana após inoculação artificial de isolados de *C. fructicola*. A: Frutos da cultivar “Mattos” no quarto dia após a inoculação de *C. fructicola*; B: Frutos da cv. “Mattos” no 15º dia após a inoculação de *C. fructicola*; C: Frutos da cultivar “Mattos” no vigésimo dia após a inoculação; D: Frutos da cv. “Helena” no quarto dia após a inoculação; E: Lesões em processo de coalescimento causadas por *C. fructicola* em fruto de goiabeira-serrana da cv. “Helena” no 15º dia após a inoculação; F: Fruto da cv. “Helena” no vigésimo dia após a inoculação com as lesões totalmente coalescidas causadas por *C. fructicola*. Barras = 2cm.



Fonte: Autor.

A coloração da massa conidial variou de acordo com o agente causal da antracnose. De maneira geral, as lesões que apresentaram massa conidial de coloração salmão e alaranjada foram produzidas pelos isolados dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* respectivamente, enquanto que frutos inoculados com *C. pseudoacutatum* apresentaram lesões de coloração escura conforme pode-se observar na Figura 3.

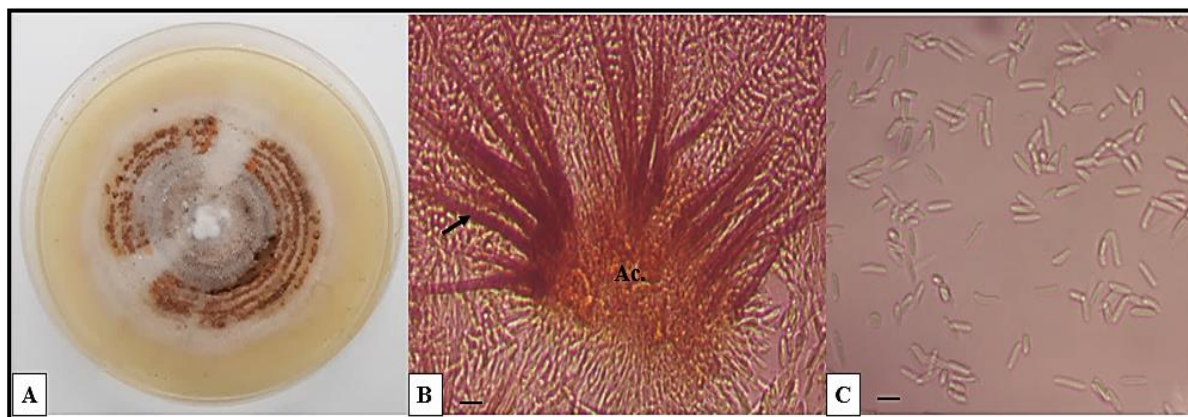
Figura 3 – Lesões típicas de antracnose em frutos de goiabeira-serrana da cultivar “Mattos” aos 20 dias após a inoculação. A: Massa conidial de coloração salmão causada por *C. nymphaeae*. B: Massa conidial de coloração salmão produzida pelo fungo *C. nymphaeae*; C: Massa conidial de coloração alaranjada produzida por *C. theobromicola*. D: Lesões de coloração escura resultantes da infecção de *C. pseudoacutatum*. Barras = 2cm.



Fonte: Autor.

Os sintomas apresentados correspondem aos originais, típicos da doença quando observados à campo. Os frutos que foram inoculados com água estéril (controle) não apresentaram lesão, esporulação e massa conidial. Para se completar os postulados de Koch, após o aparecimento dos sintomas, o patógeno foi reisolado em meio Mathur e suas estruturas foram visualizadas com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, conforme ilustra a Figura 4. Sendo assim, pode-se afirmar que as lesões presentes nos frutos inoculados com esporos de *Colletotrichum* spp., foram provenientes do bioensaio.

Figura 4 – *Colletotrichum* sp. Isolado de lesões sintomáticas de frutos de goiabeira-serrana após inoculação artificial. A: Colônia em meio Mathur com a formação de setores; B: Acérvulos (Ac) e a seta indica a presença de setas acervulares; C: Conídios em aumento de 40 x. Barras = 12 μ m.



Fonte: Autor.

Colletotrichum nymphaeae apresentou 100% de incidência em todas as cultivares e mostrou, portanto, habilidade para infectar o tecido dos frutos em todas as repetições. *C. siamense* e *C. fructicola* apresentaram incidência máxima nas cvs. “Alcântara”, “Helena” e “Mattos” e 90 e 80%, respectivamente, em “Nonante”, ou seja, em apenas 9 e 8 dos 10 frutos inoculados. *C. theobromicola* e *C. pseudoacutatum* apresentaram as menores incidências (60 e 70% respectivamente) na cultivar “Mattos” e máxima incidência em “Helena” e “Nonante” (Tabela 2).

É importante destacar que a taxonomia clássica possibilitou, até o momento, identificar os agentes causais da antracnose na goiabeira-serrana, somente em nível *sensu lato* (complexos de espécies), como ratificam os trabalhos de Hellwig e Ueno, (2009) que constataram, no Brasil, alta incidência de plantas de goiabeira-serrana com seca de ramos e podridão de frutos provocada possivelmente por *C. gloeosporioides*, inviabilizando a produção econômica dessa frutífera, pois em algumas plantas, praticamente todos os ramos estavam comprometidos. Da mesma maneira, Lopes (2013), identificou, através de características morfológicas, isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de goiabeira-serrana. Na Nova Zelândia, onde a espécie é amplamente cultivada, Lardner et al. (1999) identificaram *Colletotrichum acutatum* causando sintomas de antracnose em plantas de goiabeira-serrana.

Recentemente, a análise molecular multigênica, possibilitou a identificação mais precisa dos agentes causais, em nível *sensu stricto* (táxon definido). Fantinel et al. (2017), publicaram o primeiro relato de *C. siamense* causando sintomas típicos de antracnose em frutos de goiabeira-serrana no Brasil (Capítulo 1). Este trabalho, foi relevante na medida em que identificou o patógeno através de três regiões gênicas: (TEF1- α), β -tubulina (β -TUB) e Actina (ACT), garantindo a identidade do agente causal. Em trabalho mais recente, Camele et al. (2018) relataram, pela primeira vez, o fungo *C. acutatum*, identificado através de análise multigênica, causando antracnose em frutos de goiabeira-serrana nas províncias de Bari e Matera, na Itália.

De acordo com Carisse e Lefebvre (2011), espécies do gênero *Colletotrichum* também são relatadas como agentes causais da antracnose em outros hospedeiros causando sérias perdas em culturas no Brasil e em outros países.

No presente trabalho, as espécies (*C. nymphaeae*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, e *C. pseudoacutatum*) foram patogênicas às cultivares “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante”, e foram encontradas diferenças na agressividade tanto

em relação a mesma cultivar (“Helena” e “Nonante”) como quando foram comparadas as quatro cultivares (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios de notas de severidade e incidência (%) de antracnose induzida por inoculação artificial de espécies de *Colletotrichum* spp. em frutos de goiabeira-serrana nas cultivares “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante”.

Espécies/Isolados	Cultivares			
	“Alcântara” ”	“Helena” ”	“Mattos” ”	“Nonante” ”
	Incidência (%)			
<i>Colletotrichum nymphaeae</i> (ADR, ANG, SFP-1, SPSR, IBI-1, ATP)	100	100	100	100
<i>Colletotrichum siamense</i> (SPS)	100	100	100	90
<i>Colletotrichum fructicola</i> (SVS)	100	100	100	80
<i>Colletotrichum theobromicola</i> (PAM, SJ-1, URU, LAG-1, SJG-3)	100	100	60	100
<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i> (GRA)	80	100	70	100
Testemunha	0	0	0	0
	Severity (0 a 4)			
<i>Colletotrichum nymphaeae</i> (ADR, ANG, SFP-1, SPSR, IBI-1, ATP)	4,0* Cb**	2,3 Bb	1,3 Ab	4,0 Cc
<i>Colletotrichum siamense</i> (SPS)	3,3 Bb	3,5 Bc	1,5 Ab	2,9 Bb
<i>Colletotrichum fructicola</i> (SVS)	3,0 Bb	2,6 Bb	1,6 Ab	2,2 Bb
<i>Colletotrichum theobromicola</i> (PAM, SJ-1, URU, LAG-1, SJG-3)	3,1 Bb	2,8 Bb	1,2 Ab	2,1 Bb
<i>Colletotrichum pseudoacutatum</i> (GRA)	4,0 Cb	2,4 Bb	1,8 Ab	2,7 Bb
Testemunha	1,0 Aa	1,0 Aa	1,0 Aa	1,0 Aa
CV %	15,17			

Fonte: Autor.

*Notas de severidade 1 = 0 lesões; 2 = 1 lesão; 3 = 2 lesões; 4 = 3 lesões; **Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C.V. (%) = coeficiente de variação.

As cinco espécies de *Colletotrichum* inoculadas nas cvs. “Alcântara” e “Mattos” diferenciaram-se da testemunha, no entanto não apresentaram diferenças significativas entre si. Conforme a escala de notas utilizada, a média variou de 3,0 a 4,0 (grau de severidade da doença de 66,33 a 100%). Na cv. “Helena” *C. siamense* diferiu significativamente das outras espécies apresentando média de nota de 3,5. *C. nymphaeae* apresentou as maiores notas de severidade para a cv. “Nonante” sendo, portanto, a mais agressiva para esta cultivar.

Segundo Amorim (1995), entende-se por severidade a porcentagem da área ou do volume de tecido da planta coberta por sintomas. Outra variável que quantifica o grau de manifestação da doença é a incidência, que é a porcentagem de plantas doentes em uma amostra ou população. A avaliação da severidade da doença reflete, portanto, o grau de

suscetibilidade do hospedeiro e o de agressividade do patógeno.

A detecção de isolados mais agressivos é importante pois estes poderão ser utilizados na seleção e para o melhor discernimento entre genótipos resistentes e suscetíveis. Parlevliet (1993) afirma que os efeitos do patógeno sobre o hospedeiro, ou seja, as lesões causadas pelo patógeno podem ser observadas em avaliações de resistência de uma cultivar à determinada doença.

Para a cv. “Mattos”, *C. nymphaeae* apresentou menor agressividade (média de nota de 1,3) com diferenças significativas em relação as cvs. “Alcântara” (4,0), “Helena” (2,3) e “Nonante” (4,0). Considerando *C. nymphaeae* como agente causal da antracnose, as cvs. “Alcântara”, “Helena”, e “Nonante”, são mais suscetíveis à doença quando comparadas com “Mattos”.

As espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* (*C. siamense*, *C. fructicola* e *C. theobromicola*) proporcionaram resultados semelhantes quanto as notas médias de severidade, sendo que essa nota diferiu significativamente das demais apenas na cv. “Mattos” o que torna esta a cultivar resistente à doença quando causada por patógenos deste complexo.

Para *C. pseudoacutatum*, espécie que não se agrupou em nenhum complexo de espécies, conforme abordado no Capítulo 3, a cv. “Mattos” apresentou a menor nota média de severidade (1,8) e a cv. “Alcântara” a maior nota diferindo significativamente das demais, indicando que essa última cultivar é suscetível à antracnose, considerando *C. pseudoacutatum* como agente causal da doença.

“Alcântara” foi considerada como uma cultivar suscetível à antracnose, uma vez que apresentou todas as notas médias de severidade superior ou igual a 3. A suscetibilidade das cvs. “Helena” e “Nonante” à antracnose varia de acordo com a espécie de *Colletotrichum* e essas se mostraram suscetíveis à antracnose para as espécies *C. siamense* e *C. nymphaeae*, respectivamente, e apresentaram resistência moderada para as demais. A única cultivar que apresentou resistência à antracnose foi a “Mattos” que apresentou notas médias de severidade entre 1 e 2 para todas as espécies de *Colletotrichum*.

Segundo Ducroquet et al. (2000) os frutos de goiabeira-serrana apresentam grande diversidade em tamanho, espessura de casca entre outros fatores. Assim, algumas características inerentes à cv. “Mattos” podem estar relacionadas a resistência dessa cv. à antracnose. De acordo com Ducroquet (2008) os frutos da cv. “Mattos” apresentam casca ou parênquima externo de espessura relativamente grossa e isso pode dificultar o

mecanismo de infecção do patógeno. Outro fator importante a destacar, é que esta cultivar apresenta microbiota fúngica endofítica específica associada aos frutos. Conforme descrito no Capítulo 5, as espécies: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Clonostachys rosea* e *Clonostachys rhizophaga* ocorrem de maneira exclusiva nessa cultivar.

Em virtude das características supracitadas, a cv. “Mattos” é a mais indicada para reduzir os níveis de antracnose nos pomares em sistema de cultivo convencional, integrado ou orgânico.

De maneira geral, existe variação na suscetibilidade das cultivares de goiabeira-serrana à antracnose e as espécies incluídas nos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* e a espécie *C. pseudoacutatum* apresentam diferentes graus de agressividade.

A variabilidade patogênica é um parâmetro de grande importância na caracterização de isolados de *Colletotrichum* uma vez que fornece informações úteis aos programas de melhoramento contribuindo para a identificação de potenciais doadores de genes. Levando-se em consideração este fato, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos, tais como os de Souza (2011), que estudou isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de mangueira, quanto as características morfológicas, a virulência e a agressividade e evidenciaram variabilidade patogênica entre os isolados. Swart (1999) classificou isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de abacateiro em grupos conforme a agressividade.

Nos últimos anos estão sendo realizados diferentes estudos baseados na busca de genótipos resistentes às principais doenças da cultura, porém não se tem informações detalhadas sobre o comportamento dos genótipos que compõem o banco ativo de germoplasma da EPAGRI – São Joaquim (SC) (MOSQUERA, 2018). De acordo com Borém (1997), estes estudos são de extrema importância na medida em que a resistência genética é considerada uma das estratégias mais eficientes, de baixo custo e limpa para o manejo de doenças de plantas.

Segundo Araújo e Pinto (2018) não existem cultivares comerciais de goiabeira-serrana imunes a antracnose. Ducroquet et al. (2008) descreveram a cv. “Nonante” como uma cultivar que requer medidas de controle da antracnose nos frutos. Já “Alcântara”, que foi originada de material essencialmente nativo a partir da coleta de sementes, bem como “Helena”, apresentam boa tolerância a antracnose (DUCROQUET et al., 2007). No entanto, em estudo conduzido por Araújo e Pinto (2018) “Helena” apresentou maior suscetibilidade à antracnose juntamente com “Alcântara” e “Mattos” e a cultivar mais

resistente foi “Nonante”. Ainda que as espécies de *Colletotrichum* não tenham sido caracterizadas molecularmente naqueles estudos, os resultados contrastam com os do presente trabalho uma vez que, neste estudo, as cvs. “Helena” e “Nonante” apresentaram variação na suscetibilidade à antracnose, de acordo com a espécie do agente causal.

Segundo Donazzolo (2012) a diversidade genética de goiabeira-serrana vai desde o Paraná até o Uruguai, com especial atenção para a região da Serra Gaúcha, onde foi relatada ocorrência da espécie em altitudes menores que em Santa Catarina e, pode contemplar a presença de diferentes alelos e associações alélicas, indispensáveis para o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a ambientes diversos das áreas de altitude para a qual foram desenvolvidos os trabalhos até então, especialmente no que se refere à resistência à antracnose. É importante salientar que no presente trabalho, foram coletados isolados na área de ocorrência natural da goiabeira-serrana, sendo feita uma ampla amostragem de *Colletotrichum* spp.

Sugere-se em um próximo momento, a realização de estudos de melhoramento buscando genótipos de goiabeira-serrana com maior resistência e/ou tolerância as espécies de *Colletotrichum* avaliadas no presente trabalho, tendo em vista que sua manifestação é um grande problema em pomares no Brasil.

Conclusão

1. *Colletotrichum nymphaeae*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. theobromicola* e *C. pseudoacutatum* são patogênicas à goiabeira-serrana causando antracnose nos frutos;
2. A cv. “Alcântara” é suscetível a antracnose causada pelas espécies de *Colletotrichum* testadas e a reação de suscetibilidade das cvs. “Helena” e “Nonante” varia de acordo com a espécie do patógeno;
3. A cv. “Mattos” é resistente à antracnose causada pelas espécies de *Colletotrichum* testadas.

Agradecimentos

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida e ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em pesquisa (PQ) para Marlove Fátima Brião Muniz.

Referências Bibliográficas

- AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; DUCROQUET, J.P.H.J.; SASSO, A. Qualidade de goiaba serrana em resposta a temperatura de armazenamento e ao tratamento com 1-b metilciclopropeno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p.1683-1689, 2008.
- AMARANTE, C.V.T; SANTOS, K.L. Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n. 1 p.001-334, 2013.
- AMARANTE, C.V.T.; SOUZA, A.G.; BENINCÁ, T.D.T.; STEFFENS, C.A. Qualidade dos frutos de genótipos brasileiros de goiabeira-serrana na colheita e após o armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 9, p. 734-742, 2017.
- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: MANUAL de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 647–671.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Ceres, 2018. v.1, 573 p.
- ANDRADE, E. R.; DUCROQUET, J.P.H.J. Antracnose em goiabeira-serrana. **HortiSul**, v. 3, n. 2, p. 21-25, 1994.
- ARAÚJO, L.; PINTO, F.A.M.F. Principais doenças e seu controle. In: CIOTTA, M N.; ARIOLI, C.J.; PINTO, F.A.M.F.; SANTOS, K. dos; ARAUJO, L.; PASA, M. da S. (Orgs.). **A cultura da goiabeira-serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p. 147-166.
- BORÉM, A. **Melhoramento visando resistência a doenças**. In: BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa: Editora UFV, 1997. 461-484.
- CAMELE, I. et al. First Report of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose in *Feijoa sellowiana* in Italy. **Plant disease**, v. 102, n. 9, p. 1850-1850, 2018.
- CARISSE, O.; LEFEBVRE, A. A model to estimate the amount of primary inoculum of *Elsinoë ampelina*. **Plant Disease**, 95:1167-1171, 2011.
- DEGENHARDT, J.; DUCROQUET, J. P.; REIS, M. S.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Goiabeira Serrana: estimativa de variabilidade para características de frutos com base no coeficiente de repetibilidade**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 2007. 18 p. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007.
- DONAZZOLO, J. **Conservação pelo uso e domesticação da feijoa na Serra Gaúcha**, RS. 2012. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

- DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana** (*Feijoa sellowiana*). Jaboticabal: Funep, 2000. 66p. (Serie Frutas Nativas, 5).
- DUCROQUET, J.P.H.J.; SANTOS, K.L.; ANDRADE, E.R.; BONETI, J.I.S.; BONIN, V.; NODARI, R.O. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n.1, p. 77-80, 2007.
- DUCROQUET, J.P.H.J., NUNES, E.C., GUERRA, M.P., NODARI, R.O.; 2008. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. **Agropecuária Catarinense**, v. 21, p.79-82.
- FANTINEL, V. S., MUNIZ, M. F. B., BLUME, E., ARAÚJO, M. M., POLETTO, T., da Silva, T. T., HAKAKAVA, R. (2017). First Report of *Colletotrichum siamense* Causing Anthracnose on *Acca sellowiana* Fruits in Brazil. **Plant Disease**, 101(6), 1035-1035.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Minas Gerais, v.6, n. 2, p.36-41, 2008.
- GIACOMETTI, D.; LLERAS, E. Subtropical Myrtaceae. In.: BERMEJO, H.; LEÓN, J. (Eds.) *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*. Rome: FAO, 1994. **Plant Production and Protection** Series n. 26. p.229-237.
- HELLWIG, T., UENO, B. Levantamento de fitopatógenos causadores de doenças em frutíferas nativas na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia** 2009; 4(2): 1560-1564.
- ISHIKAWA, M.S.; RIBEIRO, N.R.; OLIVEIRA, E.C.; ALMEIDA, A.A.; BALBIPEÑA, M.I. (2018) – Screening of soybean cultivars resistant to black root rot (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, vol. 44, n. 1, p. 38-44.
- LARDNER, R.; JOHNSTON, P. R.; PLUMMER, K. M.; PEARSON, M. N. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Mycological Research**, v. 103, n. 3, p. 275-285, 1999.
- LIU, J. et al. RIN4 Functions with plasma membrane H⁺ -ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. **PLoS Biology**, v. 7, p. e1000139, 2009.
- LOPES, Morgana Elis et al. **Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret**. 2013.
- MOSQUERA, D. J.; et al.. **Incidência e severidade de antracnose em diferentes genótipos de goiabeira-serrana**. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 13., 2018, São Joaquim, SC. Resumos... Florianópolis, SC: Epagri, 2018. p. 184.

- PARLEVLIET, J. E. What is durable resistance, a general outline. In: JACOBS, Th.; PARLEVLIET, J. E. (Ed.). **Durability of disease resistance**. Netherlands: Kluwer Academics, p. 23-39. 1993.
- SINGH, A. K. et al. Molecular Screening of Blast Resistance Genes in Rice using SSR Markers. **Plant Pathology Journal**, v. 31, p. 12-24, 2015.
- SOUZA, A. G. **Characterization of physical, chemical, nutritional and antioxidant activity in fruits and flowers of feijoa genotypes [*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret]**. 2015. 168 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2015.
- SOUZA, A. **Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em mangueiras**. 2011.
- SWART, G.M. **Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango**. 1999, 156p. Thesis (PhD) - Faculty of Biological and Agriculture Sciences/ University Pretoria. Pretoria, 1999.
- THOME, G. C. H. et al. Melhoramento para resistência parcial a moléstias fúngicas em cereais. **Ciência Rural**, v. 29, p. 365-371, 1999.
- TONETTO, T. **Produção de sementes, de mudas em viveiro e cultivo a campo de *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret: uma abordagem técnica e econômica**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- VALENT, B. Rice blast as a model system for plant pathology. **Phytopathology**, v. 80, p. 33-36, 1990.

CAPÍTULO 5 - FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A FRUTOS DE CULTIVARES DE GOIABEIRA-SERRANA COM DIFERENTES SUSCETIBILIDADES À ANTRACNOSE E SELEÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE

Resumo - A antracnose da goiabeira-serrana é a principal doença da cultura e pode causar perdas de até 100% dos frutos quando não manejada corretamente e não existe nenhum método eficaz para o seu controle. Os microrganismos existentes nos frutos podem ser explorados na tentativa de encontrar novas estratégias de luta biológica contra esta doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade de fungos endofíticos existentes em goiabas-serrana de duas cultivares com diferentes suscetibilidades à antracnose, e selecionar os isolados que apresentam maior atividade antagonista contra *Colletrotrichum nymphaeae* e *Colletrotrichum siamense*, agentes causais da doença. A diversidade de fungos em goiabas-serrana das cultivares “Mattos” (resistente) e “Alcântara” (suscetível) foi avaliada através da obtenção de isolados em meio de cultura, seguida pela sua identificação molecular através do sequenciamento da região ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) do rDNA. A atividade antagonista dos isolados contra *C. nymphaeae* e *C. siamense* foi avaliada usando o método de co-cultura. Os resultados obtidos evidenciaram que a composição da comunidade de fungos endofíticos foi similar entre as cultivares, no entanto, a cv. “Mattos” caracterizou-se pela elevada abundância de *Fusarium oxysporum* e destacou-se pela ocorrência exclusiva de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Clonostachys rosea* e *Clonostachys rhizophaga*. A ação antagônica dos endofíticos *T. harzianum*, *Talaromyces amestolkiae*, *C. rosea* e *F. oxysporum* foi testada contra *C. nymphaeae* e *C. siamense*, tendo-se verificado que todos inibem o crescimento dos patógenos (índice de antagonismo até 100% para *C. rosea*), além de causar alterações morfológicas nas suas hifas. Alguns fungos ainda inibiram significativamente a esporulação (23-91%) e germinação (12-75%) de *C. nymphaeae* e *C. siamense*. A resistência da cv. “Mattos” à antracnose poderá, em parte, estar relacionada com a presença exclusiva de fungos endofíticos antagonistas aos fitopatógenos causadores desta doença. Os resultados contribuíram para um melhor conhecimento das interações planta-patógeno-microrganismo, e evidenciam o potencial uso destes fungos como antagonistas no controle biológico da antracnose em goiabeira-serrana.

Palavras-Chave: Antracnose; endofíticos; *Feijoa sellowiana*; controle biológico.

Abstract – Anthracnose in feijoa is the main disease of the crop and can cause losses of up to 100% of the fruits when not properly managed and there is no effective method for its control. Fruit microorganisms can be explored in an attempt to find new strategies for biological control against this disease. The objective of this work was to evaluate the diversity of endophytic fungi in feijoa of two cultivars with different susceptibilities to anthracnose, and to select the isolates that present the highest antagonist activity against *Colletrotrichum nymphaeae* and *Colletrotrichum siamense*, causal agents of the disease. The diversity of fungi in mountain guavas of the cultivars “Mattos” (resistant) and “Alcântara” (susceptible) was evaluated by obtaining isolates in culture medium, followed by their molecular identification through sequencing of the ITS region (ITS1, 5.8 S, ITS2)

of rDNA. The antagonistic activity of the isolates against *C. nymphaeae* and *C. siamense* was evaluated using the co-culture method. The results showed that the composition of the community of endophytic fungi was similar among cultivars, however, cv. “Mattos” was characterized by the high abundance of *Fusarium oxysporum* and was distinguished by the exclusive occurrence of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Clonostachys rosea* and *Clonostachys rhizophaga*. The antagonistic action of the endophytic *T. harzianum*, *Talaromyces amestolkiae*, *C. rosea* and *F. oxysporum* was tested against *C. nymphaeae* and *C. siamense* and all of them inhibit pathogen growth (antagonism index up to 100% for *C. rosea*), besides causing morphological alterations in its hyphae. Some fungi still significantly inhibited sporulation (23-91%) and germination (12-75%) of *C. nymphaeae* and *C. siamense*. The resistance of cv. “Mattos” to anthracnose may, in part, be related to the exclusive presence of endophytic fungi antagonistic to the phytopathogens that cause this disease. The results contributed to a better understanding of plant-pathogen-microorganism interactions, and show the potential use of these fungi as antagonists in the biological control of feijoa anthracnose.

Keywords: Anthracnose; endophytes; *Feijoa sellowiana*; biological control.

Introdução

Feijoa sellowiana (O. Berg) O. Berg é uma espécie frutífera que pertence à família das mirtáceas. Trata-se de uma planta herbácea nativa do planalto meridional brasileiro e do Uruguai, comumente chamada de goiabeira-serrana (Brasil), guayabo-del-país (Uruguai), pineapple-guava ou feijoa em países de língua inglesa (SOUZA; LORENZI, 2012). A goiabeira-serrana está passando pelo processo de domesticação em seu centro de origem e diversidade, existindo pomares comerciais em localidades que apresentam características condizentes com as suas exigências de elevadas altitudes e baixas temperaturas (DUCROQUET et al., 2000).

Para que o plantio, cultivo e disseminação comercial da goiabeira-serrana sejam economicamente viáveis, algumas de suas características fisiológicas (rendimento de polpa e conservação pós-colheita) e sanitárias precisam ser analisadas e melhoradas (DEGENHARDT et al., 2001). Nesse sentido, a antracnose pode se tornar um entrave na produção dos frutos já que é a principal doença da goiabeira-serrana no sul do Brasil (Andrade e Ducroquet, 1996) e é causada, conforme apresentado no capítulo anterior, por complexos de espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*.

Fantinel et al. (2017) relataram pela primeira vez no Brasil a incidência de *Colletotrichum siamense* associado aos frutos de goiabeira-serrana no município de São Pedro do Sul (RS). Os sintomas típicos desse fungo nos frutos são manchas deprimidas,

necróticas, presença de esporulação rósea no centro da lesão e, em estágio mais avançado, causa perda total dos frutos.

Segundo Araújo et al. (2018), não existem fungicidas químicos registrados para a goiabeira-serrana, no entanto, utilizam-se muitas vezes produtos registrados para outras culturas, como a macieira, por exemplo. A utilização de produtos químicos para o controle dessa doença, além de não ser eficaz na prevenção, apresenta inúmeros riscos ambientais, tais como: contaminação de águas superficiais e subterrâneas, problemas de toxicidade devido aos resíduos que esses produtos podem deixar nos frutos (JARDIM et al., 2009). A utilização indevida de fungicidas químicos pode aumentar a resistência em populações de patógenos e ainda, acarretar efeitos sobre organismos não-alvo, inclusive aos seres-humanos (AMORIM et al., 2018).

Em virtude dos fatores supracitados e considerando que a produção de goiabeira-serrana está inserida principalmente em unidades de produção familiares, em cultivos orgânicos e em áreas onde predomina a agricultura familiar, não é compatível a utilização de agrotóxicos nessa cultura.

Segundo Bacon e White (2000) nas últimas décadas, os cientistas começaram a perceber que as plantas podem servir como reservatório de um número muito grande de organismos conhecidos como endofíticos. Estes organismos são principalmente fungos e bactérias (AZEVEDO et al., 2000) que habitam o interior dos tecidos vegetais durante todo ou parte do seu ciclo de vida, sem causar-lhes danos visíveis (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al., 2000). Existem cerca de 300 mil espécies de plantas em nosso planeta, em todas as estudadas até o momento tem sido detectados microrganismos endofíticos (STROBEL, 2003). Dentre as vantagens da interação endofítico-hospedeiro está o fato do microrganismo se beneficiar com proteção e alimentação, enquanto o hospedeiro se favorece da promoção de crescimento, reprodução e resistência a estresses bióticos e abióticos (SAIKKONEN et al., 2004).

Dessa forma, a utilização de microrganismos com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento vem sendo apontada como alternativa viável para sistemas de produção agrícola ecológica e economicamente sustentável (COMPANT et al., 2005; SOUSA et al., 2009). Em particular, o controle biológico, através do uso de antagonistas endofíticos está se tornando cada vez mais popular na proteção de plantas (RABIEY et al., 2019).

O isolamento da comunidade fúngica endofítica associada a frutos de goiabeira-serrana pode, nesse sentido, resultar na descoberta de novas ferramentas a serem utilizadas no biocontrole de fitopatógenos, incluindo o fungo *Colletotrichum*.

Agler et al. (2016) relataram que o genótipo da planta hospedeira pode influenciar a composição da comunidade de microrganismos endofíticos ao agir sobre espécies-chave, que por sua vez afetam a colonização de plantas por muitos outros microrganismos. De acordo com essa observação, pode-se inferir que a seleção de certos genótipos favorece a seleção de organismos benéficos ou mesmo impede a infecção por patógenos (HEIJDEN; HARTMANN, 2016). Considerando o patossistema: *Colletotrichum* spp. x goiabeira-serrana, tanto quanto se sabe não têm sido realizados estudos sobre a diversidade dos microrganismos endofíticos nem de como esses interagem entre si e com seu hospedeiro.

Um melhor conhecimento tanto da composição da microbiota fúngica quanto da função desses microrganismos certamente contribuirá para o desenvolvimento de novas e bem-sucedidas medidas de proteção integrada contra a antracnose na goiabeira-serrana. Na verdade, há um crescente desejo de modelar e gerenciar as interações entre hospedeiros e microbiota (Kembel et al., 2014), para melhorar a produtividade das culturas (ANDREOTE et al., 2014).

Diante do exposto, o presente estudo visa estudar a composição da comunidade de fungos endofíticos que habitam os frutos de goiabas-serranas de duas cultivares com diferentes suscetibilidades à antracnose; visa ainda, avaliar se os fungos endofíticos apresentam especificidade a uma determinada cultivar e determinar a eficácia inibitória *in vitro* de fungos endofíticos isolados de ambas as cultivares, contra *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum siamense*, patogênicos para goiabeira-serrana. Os resultados deste estudo servirão para formar uma base de conhecimento acerca dos fungos da goiabeira-serrana que podem contribuir em estudos no controle biológico da antracnose.

Material e Métodos

Coleta de fruto para isolamento de fungos endofíticos

A coleta dos frutos para o isolamento de fungos endofíticos ocorreu na safra 2017/2018 no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) no município de São Joaquim (SC), que se

localiza em uma altitude de 1415 m, latitude 28° 17' 25'' S e longitude 49° 56' 56'' W. As práticas culturais anteriores à coleta dos frutos constituíram-se de adubação (50 g de N na forma de uréia, 50 g de P - adubo superfosfato triplo e 60 g de cloreto de potássio, por planta), realizada anualmente no inverno, e controle fitossanitário, pela aplicação de calda sulfocálcica a 8% e calda bordalesa com 2 % de sulfato de cobre. A eliminação dos restos culturais e frutos mumificados e, poda dos indivíduos (controle cultural), foi também realizada. A área total do BAG é de 2 hectares sendo que as goiabeiras-serrana estão arranjadas em um espaçamento de 3.5 x 5 metros e apresentam aproximadamente 30 anos de idade.

Nesta área foram selecionadas aleatoriamente 10 árvores das cvs. “Mattos” e “Alcântara”, que são resistentes e suscetíveis à antracnose, respectivamente (Capítulo 4). Em cada árvore foram coletados cinco frutos maduros e sem sintomas aparentes de antracnose. Após a coleta, os frutos foram embalados em sacos plásticos individuais, etiquetados, colocados em uma caixa com gelo e transportados para o laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi do Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. As goiabas-serranas foram armazenadas a 4°C e processadas em até 48h após sua coleta para o isolamento dos fungos endofíticos.

Isolamento de fungos endofíticos

Após a coleta, todos os frutos sem sintomas aparentes foram lavados em água corrente. Posteriormente, foi realizada assepsia da superfície dos mesmos pela imersão sequencial dos frutos em etanol 70% (v/v) por 2 min, hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 3 min, água destilada esterilizada (três vezes, um min cada) e finalmente secos em papel de filtro esterilizado.

Após secagem, foram cortados cinco fragmentos de cada fruto (cerca de 6 x 6 mm), constituídos do mesocarpo e do endocarpo. Esses fragmentos foram imediatamente transferidos para placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo 10 ml de meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) estéril e incubados a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Foram inoculados um total de 500 fragmentos (10 goiabeiras-serrana x 5 frutos x 5 fragmentos x 2 cultivares). A validação da eficiência do procedimento de esterilização da superfície dos frutos foi realizada imprimindo os tecidos do fruto

esterilizado na superfície em meio BDA (PRETO et al., 2017). Os fungos que cresceram sobre os fragmentos de tecido foram registrados como fungos endofíticos e foram sub-cultivados em placas individuais de BDA para obter isolados puros para posterior identificação.

Para a obtenção das culturas puras, a repicagem foi realizada com apenas uma Unidade Formadora de Colônia (UFC), ou seja, a partir de um esporo germinado. Para isso, uma porção de micélio de cada isolado desenvolvido foi diluída em 5 mL de água destilada esterilizada, após foi transferida para uma placa de Petri contendo meio AA (Ágar-Água). Após a germinação dos esporos (24 horas), com o auxílio de um microscópio óptico, foi localizado um esporo separado e, com o auxílio de uma agulha histológica, foi retirado o pedaço de ágar contendo o esporo germinado e transferido para uma placa de Petri contendo meio BDA. As culturas puras de cada isolado foram preservadas em tubos com glicerol 15 % mantido a -20°C e depositados na coleção de culturas fúngicas do Instituto Politécnico de Bragança (Escola de Agricultura) em Bragança-Portugal.

Identificação dos Isolados Fúngicos

Os isolados fúngicos endofíticos obtidos foram identificados tanto morfológicamente quanto molecularmente, no Centro de Investigação da Montanha (CIMO), órgão que pertence à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, em Bragança (Portugal), e é parte integrante do estágio de doutorado sanduíche do autor. Para a análise morfológica, os isolados das culturas puras foram cultivados em meio BDA e mantidos a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro por 1-3 semanas, dependendo da taxa de crescimento. Essas culturas fúngicas foram examinadas periodicamente, e grupos foram formados de acordo com a similaridade morfológica da colônia fúngica (por exemplo: cor, forma e textura) ou dos seus esporos (por exemplo, tamanho e forma). Esta divisão foi realizada com o auxílio de uma chave de identificação descrita por Barnett e Hunter (1999).

Posteriormente, um isolado representativo de cada grupo foi selecionado para identificação molecular. Esta foi feita pelo sequenciamento da região do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossômico nuclear (rADN). O DNA genômico total foi extraído de micélio/esporos usando o kit de PCR REDE xtract-N-Amp™ Plant (Sigma, Poole, UK), seguindo as instruções do fornecedor. A região ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) foi amplificada utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 universais (White et al., 1990), seguindo

um protocolo de PCR descrito anteriormente por Oliveira et al. (2012). Os produtos amplificados (~ 650 pb) foram purificados e sequenciados através dos serviços da Macrogen Inc. (Madrid, Espanha). As sequências de DNA obtidas foram analisadas com o software DNASTAR v.2.58 e a identificação dos fungos foi realizada utilizando-se o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o algoritmo BLAST. Os resultados dos *blasts* foram classificados de acordo com o maior escore de identidade e menor valor de *expected-value* (*e-value*). O *e-value* indica o número de alinhamentos que seriam esperados apresentando valores de score iguais ou melhores que o encontrado por acaso, dado o tamanho do banco de dados. Para a similaridade das sequências só foram aceitos valores de identidade máxima > 95%.

Os patógenos utilizados no presente trabalho (*C. nymphaeae* e *C. siamense*) foram igualmente identificados morfofisiologicamente e molecularmente conforme metodologia descrita no capítulos 1 e 3.

Composição de comunidades fúngicas

A determinação da ocorrência de fungos endofíticos em frutos de goiabeira-serrana das cvs. “Mattos” e “Alcântara” foi obtida pelo cálculo da frequência de colonização (FC%) e Abundância Relativa (AR%). A FC foi calculada como o número total de fragmentos de tecido vegetal colonizados por cada endofítico dividido pelo número total de fragmentos de plantas pesquisados (SURYANARAYANAN et al., 2003). A AR foi determinada com o número total de isolados de uma espécie dividido pelo número total de isolados amostrados para cada cultivar.

A diversidade de fungos endofíticos em amostras de tecidos dos frutos foi avaliada ao nível da sua riqueza (número de espécies diferentes e número médio de espécies por árvore), abundância (número total de isolados e número médio de isolados por árvore), e também computando o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) (MAGURRAN, 2004). Este índice foi calculado com o auxílio do *software - Species Diversity & Richness vs.4.0* (SEABY; HENDERSON, 2006). A estimativa da riqueza de espécies foi realizada usando a curva de acumulação de espécies, que foram calculadas usando o índice de rarefação baseado em amostras (Mao Tau) e computadas no *software EstimateS v.9.1.0* (COLWELL, 2013) usando 1000 execuções de *bootstrapping*.

Concomitante a isso, foi elaborada uma Escala Multidimensional Não-Métrica (NMDS) para explorar a similaridade da comunidade de fungos entre cultivares de goiabeiras-serrana “Mattos” e “Alcântara”. Esta análise classifica as comunidades fúngicas de cada cultivar (representadas por pontos) no espaço de ordenação de uma maneira que a distância entre dois pontos é inversamente proporcional à sua similaridade (Kruskal, 1964). Portanto, pontos mais próximos são mais similares na composição de espécies de microrganismos do que aqueles mais distantes. A correspondência do diagrama de ordenação com as distâncias é descrita por um valor de estresse (estresse de Kruskal), aonde valores menores que 0,2 representam bons gráficos de ordenação (CLARKE, 1993).

A NMDS foi realizada usando matrizes com os índices de similaridade de Jaccard (MAGURRAN, 2004) e Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957). A análise de similaridade (ANOSIM) foi utilizada para testar diferenças significativas na composição de espécies de microrganismos entre cultivares de goiabeira-serrana, com nível de significância de 0,001. Esta análise compara a composição de espécies entre grupos (cultivares de goiabeira-serrana) e gera um valor-R variando de 0 (completamente similar) a 1 (completamente dissimilares) (CLARKE; GORLEY, 2001). Esta análise foi realizada utilizando matrizes de índice de Bray-Curtis, com 1000 permutações. Quando uma diferença significativa foi observada, análises de porcentagem de similaridade (SIMPER) foram realizadas para revelar quais taxas contribuíram para a dissimilaridade entre as cultivares. Todas as análises multivariadas foram feitas usando o *Community Analysis Package* v. 4.0 (HENDERSON; SEABY, 2007).

Testes de Antagonismo

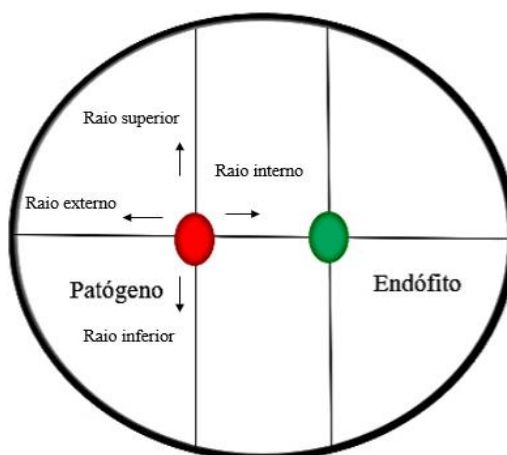
Estabelecimento de co-culturas

Quatro isolados fúngicos endofíticos tiveram a sua atividade antagonista testada contra *C. nymphaeae* e *C. siamense* pelo método do confronto direto, são eles: *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea* obtidos da cv. “Mattos” e *Fusarium oxysporum* e *Talaromices amestolkiae* obtidos da cv. “Alcântara”. Os isolados foram selecionados de acordo com os seguintes critérios não excludentes: 1º) ocorrência exclusiva em uma determinada cultivar; 2º) já se ter comprovado a eficiência do microrganismo como agente de biocontrole; 3º) maior frequência de colonização e 4º)

capacidade de crescimento em meio sintético após várias subculturas.

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultura de BDA, por sete dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e mantidas no escuro, para fornecer micélio/espores para o estabelecimento das co-culturas. Na sequência, foram preparadas suspensões de esporos dos patógenos e dos fungos endofíticos, em uma solução aquosa de 0,025% Tween 80, de forma a se obter uma concentração final de 1×10^6 esporos/mL. Esta suspensão de esporos foi inoculada em placas de Petri de 9 cm contendo meio BDA, tendo o fitopatógeno sido colocado à esquerda e o endofítico à direita, a uma distância entre si de 3 cm, conforme ilustra a Figura 1. Como controle, utilizaram-se placas de Petri com meio BDA contendo dois inóculos da mesma espécie fúngica. As placas foram incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro e cada tratamento foi replicado cinco vezes.

Figura 1 - Disposição em placa de Petri dos fungos utilizados no teste de confronto direto. À esquerda (em vermelho) o patógeno e à direita (em verde) o fungo endofítico testado.



Fonte: Autor.

Variáveis analisadas

Os parâmetros determinados nas diferentes co-culturas foram o Índice de Antagonismo (AI), o tipo de interação endofítico-fitopatógeno, anomalias morfológicas nas hifas bem como a produção e a viabilidade de conídios dos patógenos.

O AI foi calculado segundo Campanile et al. (2007) para cada espécie de fungo endofítico usando a fórmula abaixo:

$$AI = \left(\frac{(RM - rm)}{RM} \right) * 100$$

Em que:

rm: média do raio do patógeno em direção ao antagonista (raio interno);

RM: média dos raios do patógeno nas outras três direções (raio superior, raio inferior e raio externo), conforme pode ser visualizado na Figura 1.

Os raios dos patógenos foram medidos no final do ensaio, aos 14 dias, quando o fungo do controle negativo (placa de Petri constituída apenas pelo patógeno) alcançou a borda da placa.

Para avaliar o potencial de antagonismo dos isolados foram feitas as análises macroscópicas das interações endofítico-fitopatógeno baseadas na escala de Badalyan et al. (2002). Conforme essa escala, podem ocorrer três tipos de interação: A, B e C, onde C é subdividida em CA₁, CA₂, CB₁ e CB₂. Nos tipos A e B ocorre inibição mútua, na qual nenhum dos organismos é capaz de crescer um sobre o outro, sendo que no tipo A ocorre contato micelial e no tipo B não. No tipo C o endofítico pode crescer sobre o patógeno, sem que ocorra uma inibição inicial. No subtipo CA₁ ocorre crescimento parcial do endofítico e no subtipo CA₂ ocorre crescimento completo do endofítico sobre o patógeno após uma inibição inicial com contato micelial. Já no subtipo CB₁ ocorre um crescimento parcial do endofítico e, no tipo CB₂, um crescimento completo do endofítico sobre o patógeno, após inibição inicial sem contato micelial.

Concomitante a isso, a morfologia das hifas na zona de interação foi avaliada em microscópio estereoscópico. A hifa das colônias fúngicas foi removida da zona de interação e transferida assepticamente para lâminas estéreis. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Leica DM 2000) de forma a avaliar alterações morfológicas nas hifas dos patógenos. Culturas de *C. nymphaeae* e *C. siamense* em meio de cultura de BDA sem a inoculação de fungos endofíticos serviram como controle.

A produção de conídios dos patógenos foi avaliada coletando-se, uma amostra central, uma superior e uma inferior na zona de interação com os antagonistas, com o auxílio de um anel metálico esterilizado de 8 mm de diâmetro, no 14º dia de incubação. Para cada tratamento, coletaram-se amostras de 3 colônias. Estas amostras foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 10 mL de uma mistura 1:1 de solução de NaCl (0,89%, p/v) e Tween 80® (0,1%, v/v) esterilizada. A concentração de esporos nesta suspensão (esporos/mL) foi então determinada em câmara de Neubauer.

A viabilidade dos patógenos foi avaliada através da germinação dos seus conídios pelo exame direto em lâmina, utilizando-se lâminas de microscopia esterilizadas as quais foram recobertas com uma fina camada de meio ágar-água (15g/L ágar-ágar). Para a realização dos ensaios, foram previamente marcados três círculos na face inferior de cada lâmina. Sobre o meio de cultura foi inoculado, em cada círculo a mesma solução de esporos usada para quantificar a esporulação dos patógenos. As lâminas foram acondicionadas individualmente em placas de Petri, esterilizadas, e incubadas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ausência de luz, durante 12h. Após este período, foi colocada uma gota do corante lactofenol azul-de-algodão sobre a área do círculo, para deter a germinação e facilitar a visualização dos conídios.

Em seguida, foi realizada a observação de 100 conídios em cada área da lâmina, utilizando-se microscópio óptico em aumento 40x. Foram contados conídios germinados e não germinados dos patógenos, estabelecendo-se depois a porcentagem de germinação. Cada lâmina correspondeu a uma repetição e para cada tratamento fez-se três lâminas. Os ensaios foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado.

Foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, para isso foi utilizado o software BioEstat 5.0. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{(x+0,5)}$, para a análise da variância. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o software SISVAR 5.3. A capacidade dos fungos testados em reduzir a esporulação e a viabilidade de *C. nymphaeae* e *C. siamense* foi avaliada calculando-se a porcentagem de inibição em relação ao controle. A inibição percentual foi calculada pela diferença entre controle e tratamento (fungo endofítico), dividida pelo valor de controle e multiplicada por 100.

Resultados e Discussão

Descrição da comunidade fúngica

Foram obtidos um total de 51 isolados fúngicos endofíticos, coletados dos fragmentos de tecidos de frutos. Estes isolados foram submetidos à análise da região ITS1-5.8S-ITS2 e após a comparação com sequências depositadas no *GenBank*, foram

identificadas um total de 19 unidades taxonômicas operacionais (OTUs), que estão apresentados na Tabela 1.

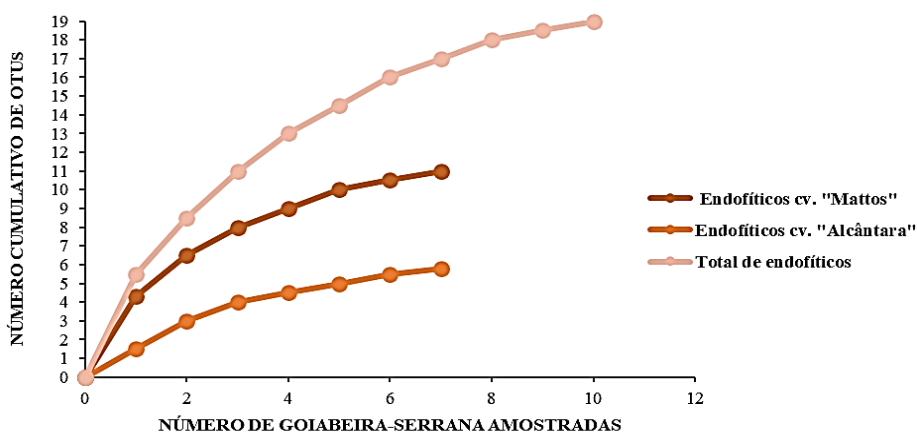
Tabela 1 - Cobertura (C) e Similaridade (S) dos fungos endofíticos isolados de frutos de goiabeira-serrana de duas cultivares com diferentes graus de suscetibilidade à antracnose. Os acessos estão descritos conforme dados do *GenBank*, através de sequenciamento da região ITS.

Espécie e Número de acesso no <i>GenBank</i>	C (%)	S (%)	<i>E</i> -value	Acesso no <i>GenBank</i> do organismo com a mais alta identidade	Autores
<i>Fusarium oxysporum</i> MN326477	100	100	0.0	MH938054	Choudhary,P. et al. (2018)
<i>Fusarium equiseti</i> MN326474	100	100	0.0	MK992776	Kaul,S.,et al. (2019)
<i>Fusarium solani</i> MN326475	100	100	0.0	MN216215	Mazarotto,E.J., (2019)
<i>Fusarium circinatum</i> MN326463	100	100	0.0	KX276639	Garcia Diaz,S.E. et al. (2016)
<i>Gliocephalotrichum bulbilium</i> MN326476	100	100	0.0	KF513258	Lombard,L. et al. (2013)
<i>Alternaria infectoria</i> MN326467	100	100	0.0	KR094465	Kaur,A., (2016)
<i>Alternaria alternata</i> MN326466	100	100	0.0	KF280492	Wang,T. e Wu,X.
<i>Alternaria destruens</i> MN326464	100	100	0.0	MK409129	Batzer,J.C. (2019)
<i>Penicillium sumatrense</i> MN326479	100	100	0.0	KU847879	Zhao,G.. et al. (2016)
<i>Penicillium citrinum</i> MN326478	100	100	0.0	MK229349	Saravanan,S.et al. (2018)
<i>Talaromyces amestolkiae</i> MN326480	100	100	0.0	LT558956	Guevara-Suarez,M. et al. (2016)
<i>Cryphonectria parasitica</i> MN326473	100	100	0.0	KC851949	Gorcso,G.et al. (2013)
<i>Chaetomium globosum</i> MN326469	100	100	0.0	MH171484	Liu,Z. (2018)
<i>Clonostachys rhizophaga</i> MN326470	100	100	0.0	LT220552	Sharma,L.andMarques,G.(2016)
<i>Clonostachys rosea</i> MN326471	100	100	0.0	MH911376	Akoijam,C. et al. (2018)
<i>Trichoderma harzianum</i> MN326481	100	100	0.0	LN846721	Al-Sadi,A.M., et al. (2015)
<i>Trichoderma hamatum</i> MN326465	100	100	0.0	MF408951	Hu,J., Yang,H. et al. (2017)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MN326472	100	100	0.0	MG560808	Leon-Reyes,A. e Riera,N. (2017)
<i>Colletotrichum acutatum</i> MN326468	100	100	0.0	MF629904	Sun,Y. (2017)

Fonte: Autor.

Para o total de fungos endofíticos identificados molecularmente foi gerada uma curva de acumulação de espécies e a mesma (em formato de assíntota) sugere que o esforço de amostragem foi suficiente para revelar as espécies de fungos endofíticos que se associam com goiabas-serrana de ambas as cultivares (Figura 2). Como pode ser visualizado no gráfico, a partir da décima árvore há uma tendência para estabilização da curva, mostrando que mesmo que a coleta fosse realizada em mais indivíduos, o número cumulativo de OTUs não tem alteração significativa.

Figura 2 - Curvas de acúmulo de espécies para os fungos endofíticos isolados de goiabas-serrana coletadas de indivíduos de *Feijoa sellowiana* das cultivares “Mattos”, “Alcântara” e total.



Fonte: Autor.

As 19 OTUs identificadas pertencem a 10 gêneros e oito famílias (Tabela 2). Os gêneros fúngicos com maior diversidade foram *Fusarium* (quatro OTUs) e *Alternaria* (três OTUs).

Estudos envolvendo fungos endofíticos em frutíferas são escassos no Brasil, tendo sido relatados isolamentos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (Rodrigues 1994), bananeira (*Musa acuminata* Colla) (Pereira et al. 1999), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (Mariano et al. 1997), citrus (*Citrus limon* L.) (Araújo et al. 2001) e cajá (*Spondias mombin* L.) (RODRIGUES; SAMUELS, 1999).

Não existem estudos, até o momento, sobre a associação de fungos endofíticos com goiabeira-serrana, tampouco sobre a relação desses microrganismos com a suscetibilidade da espécie à antracnose. Contudo, os resultados do presente trabalho quando comparados com os de outras culturas, como por exemplo a cultura da oliveira (*Olea europea* L.)

(PEREIRA, 2014; PRETO et al., 2017), do sobreiro (*Quercus suber*) (COSTA et al., 2018) e do Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbili*) (SILVA, 2019) demonstram que a diversidade de fungos endofíticos associados a frutos de goiabeira-serrana é baixa.

Este fato poderá estar relacionado pela dominância de determinados gêneros na população fúngica. Esta elevada dominância tem sido reportada ter um efeito na redução da frequência de outros gêneros, provavelmente devido ao efeito antagônico entre os fungos endofíticos que habitam o mesmo local (VIEIRA et al., 2012). A baixa diversidade de espécies fúngicas associada aos frutos de goiabeira-serrana é evidenciada pelas curvas cumulativas de espécies que apresentaram atingir a assíntota (Figura 2).

Tabela 2 - Frequência de colonização (FC %) e abundância relativa (AR%) de cada endofítico isolado de goiaba-serrana das cultivares “Mattos” e “Alcântara”.

(continua)

Famílias, Gêneros e Espécies	“Mattos”		“Alcântara”		Total	
	FC %	AR %	FC %	AR %	FC %	AR %
Fungos						
Nectriaceae						
<i>Fusarium</i>						
<i>Fusarium oxysporum</i>	8,50	21,00	3,00	10,00	5,75	15,50
<i>Fusarium equisetii</i>	4,50	12,00	1,50	7,00	3,00	9,50
<i>Fusarium solani</i>	3,00	6,00	0,50	2,00	1,75	4,00
<i>Fusarium circinatum</i>	1,50	3,00	1,50	7,00	1,50	5,00
<i>Gliocephalotrichum</i>						
<i>Gliocephalotrichum bulbilium</i>	1,00	2,00	1,00	4,00	1,00	3,00
Pleosporaceae						
<i>Alternaria</i>						
<i>Alternaria infectoria</i>	3,50	7,00	2,50	11,00	3,00	9,00
<i>Alternaria destruens</i>	1,00	2,00	2,50	11,00	1,75	6,50
<i>Alternaria alternata</i>	1,00	7,00	1,50	7,00	1,25	7,00
Trichocomaceae						
<i>Penicillium</i>						
<i>Penicillium sumatrense</i>	1,00	2,00	3,00	13,00	2,00	7,50
<i>Penicillium citrinum</i>	1,00	2,00	0,50	4,00	0,75	3,00
<i>Talaromyces</i>						
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	1,00	2,00	0,50	2,00	0,75	2,00
Cryphonectriaceae						
<i>Cryphonectria</i>						
<i>Cryphonectria parasitica</i>	1,00	2,00	0,50	2,00	0,75	2,00
Chaetomiaceae						

Tabela 2 - Frequência de colonização (FC %) e abundância relativa (AR%) de cada endofítico isolado de goiaba-serrana das cultivares “Mattos” e “Alcântara”.

(conclusão)

<i>Chaetomium</i>						
<i>Chaetomium globosum</i>	1,00	1,00	1,50	7,00	1,25	4,00
Bionectriaceae						
<i>Clonostachys</i>						
<i>Clonostachys rorea</i>	4,00	8,00	0,00	0,00	2,00	4,00
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	2,50	5,00	0,00	0,00	1,25	2,50
Hypocreaceae						
<i>Trichoderma</i>						
<i>Trichoderma harzianum</i>	4,00	8,00	0,00	0,00	2,00	4,00
<i>Trichoderma hamatum</i>	4,00	8,00	0,00	0,00	2,00	4,00
Glomerellaceae						
<i>Colletotrichum</i>						
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	5,00	1,00	2,50	11,00	3,75	6,00
<i>Colletotrichum acutatum</i>	0,50	1,00	0,50	2,00	0,50	1,50

Fonte: Autor.

No que tange a abundância relativa, os gêneros mais abundantes foram *Fusarium* (34,0%) e *Alternaria* (22,5%), tendo as espécies *Fusarium oxysporum* (15,5%) e *Alternaria infectoria* (9%) sido as mais abundantes (Tabela 2). O gênero *Fusarium* compreende espécies potencialmente patogênicas e patogênicas para uma ampla gama de hospedeiros. Por exemplo, em plantas de limão-de-caieira (*Averrhoa bilimbi*) atacadas por *Fusarium* spp. observaram-se sintomas de desenvolvimento anormal de superbrotamento das inflorescências a partir do eixo floral, com inchamento dos talos florais, queda prematura de flores e frutos jovens, bem como a total seca dos talos (BASTOS; SANTOS, 2001). Em plantas de cacau (*Theobroma cacao*), *Fusarium decemcellulare* é o agente causal da galha-de-pontos-verdes, caracterizada por intumescimento anormal das almofadas florais e excessiva produção de botões florais, resultando na não formação de frutos (DALLA PRIA; CAMARGO, 1997). Em noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), Alvidrez Villareal (2012) isolaram alguns fungos a partir de um inseto-praga (*Euplatypus segnis*) e testaram sua patogenicidade, sendo que, dentre os organismos testados, foram identificados *F. solani* e *F. oxysporum* como patogênicos para a espécie, causando murcha de ramos. No que concerne à cultura da goiabeira-serrana, esse gênero já teve comprovada sua transmissão das sementes para plântulas (Fantinel 2014), sem, no entanto, ter-se verificado ser patogênico.

Fungos do gênero *Fusarium*, como endofíticos, são cosmopolitas. Sua presença foi reportada em espécies arbóreas em zonas tropicais como, por exemplo, em pupunheira (*Bactris gasipaes*) (ALMEIDA et al., 2005), carnaúba (*Copernicia prunifera*) e em cajueiro *Anacardium occidentale* (KAMEI et al. 2008) e em zonas mediterrânicas em oliveira (*Olea europea* L.) (PEREIRA, 2014; PRETO et al., 2017;). Em espécies arbustivas o gênero *Fusarium* foi encontrado associado a plantas de cânfora (*Cinnamomum kanehirae*) (WANG et al., 2011), guaraná (*Paullinia cupana*) (SILVA, 2019) e bambu (*Bambusa oldhamii*) (PAQUALINI et al., 2019). Mussi-Dias et al. (2012) encontraram o gênero *Fusarium* associado a espécie herbácea de capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

Fungos pertencentes ao gênero *Alternaria* são cosmopolitas e inclui espécies saprófitas, endofíticas e parasitas (WOUDENBERG et al., 2013). Estes fungos associam-se a uma variedade de substratos, tais como sementes, plantas, produtos agrícolas, animais, solo e o ar atmosférico, podendo ser patógenos de plantas e acarretar grandes perdas para as culturas agrícolas e florestais (ARMANDO, 2014).

Da mesma maneira, foram identificados como endofíticos em goiaba-serrana das cvs. “Mattos” e “Alcântara” os fungos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. É importante destacar, todavia, que estes fungos são agentes causais da antracnose em goiabeira-serrana (ANDRADE et al., 1993; FANTINEL et al., 2017.). A detecção destes patógenos em frutos assintomáticos, sugere que a colonização dos tecidos pelo fungo ocorre antes do aparecimento dos sintomas. Segundo Araújo et al. (2001), *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* estão entre os fungos mais frequentemente isolados endofiticamente em plantas. Espécies de *Colletotrichum* foram descritas como endofíticas de várias plantas, tais como: carnaúba (*Copernicia prunifera*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), mangueira (*Mangifera indica*), ciriguela (*Spondias purpurea*), umbu (*Spondias tuberosa*), mandioca (*Manihot esculenta*), acerola (*Malpighiae marginata*), romã (*Punica granatum*) e mamona (*Ricinus communis*) (SURYANARAYANAN et al., 2009). Evidências filogenéticas obtidas por Suryanarayanan et al. (2000) em seus estudos indicaram que algumas espécies de *Colletotrichum* podem ocorrer tanto como endofíticos quanto sapróbios.

Os gêneros *Clonostachys* e *Trichoderma* ocorrem de maneira endofítica associado a frutos de goiaba-serrana da cv. “Mattos”. Fungos pertencentes a esses gêneros são amplamente utilizados como agentes de controle biológico (MORANDI et al., 2009).

Comparação da comunidade fúngica endofítica entre as cultivares “Mattos” e “Alcântara”

A diversidade de fungos endofíticos foi significativamente ($p < 0,05$) superior para a cv. “Mattos”, quando se considera o número médio de OTUs por árvore (4,56 vs. 2,03), no entanto não apresentou diferenças significativas para o índice de Shannon-Wiener (H) (Tabela 3). Quanto à abundância (número médio de isolados por árvore) a cv. “Mattos” apresentou um número de isolados fúngicos significativamente ($p < 0,05$) superior (cerca de 1,7 vezes) face à cv. “Alcântara” (Tabela 3).

A frequência de colonização do total dos frutos por fungos endofíticos foi de 35,75%, apresentando os frutos da cv. “Mattos” uma maior percentagem de colonização (48,5%) face aos frutos da cv. “Alcântara” (23,0%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Diversidade de fungos endofíticos isolados de goiabas-serranas de duas cultivares Mattos e Alcântara. Os resultados são apresentados como valores totais ou médios (valor médio \pm DP, $n=10$).

Parâmetros	Cultivares	
	“Mattos”	“Alcântara”
Nº total de isolados	32	19
Nº médio de isolados por árvore	3,2 \pm 0,62 ^a	1,9 \pm 0,47 ^b
Nº total de OTUs	19	15
Nº médio de OTUs por árvore	4,56 \pm 0,31 ^a	2,03 \pm 0,17 ^b
Frequência de Colonização (%)	48,5	23,0
Shannon-Wiener index (H)	2,65 \pm 0,78 ^a	2,52 \pm 0,73 ^a

Fonte: Autor.

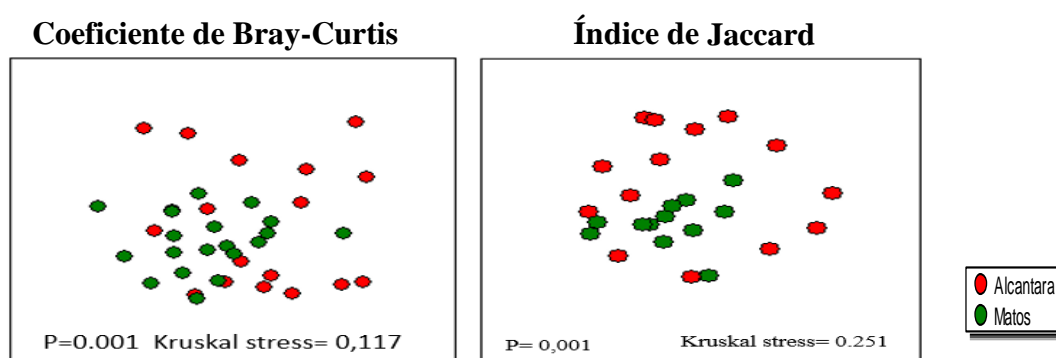
*Letras minúsculas diferentes sobrescritas denotam diferenças significativas entre cultivares ($p < 0,05$).

A similaridade na composição fúngica endofítica entre cultivares, foi avaliada através da ordenação não métrica multidimensional (NMDS) (Figura 3) e ANOSIM. A NMDS foi realizada utilizando dois índices de similaridade, ou seja, o coeficiente de Bray-Curtis e o Índice de Jaccard. O Índice de Jaccard compara a presença ou ausência de espécies entre as amostras, desconsiderando a abundância de espécies (MAGURRAN, 2004). Por sua vez, o índice de Bray-Curtis compara a presença ou ausência de espécies e a abundância entre as amostras. Este coeficiente ignora os casos em que a espécie está ausente em ambas as amostras da comunidade e é fortemente influenciado pelas espécies

abundantes, de modo que as espécies raras adicionam pouca influência (BRAY; CURTIS, 1957).

Os resultados obtidos na ordenação NMDS utilizando os dois índices de similaridade indicam uma fraca separação entre as duas cultivares estudadas, indicando que os seus frutos apresentam uma composição fúngica endofítica similar. Este resultado foi corroborado pela análise ANOSIM ($R = 0,149$, $p = 0,001$).

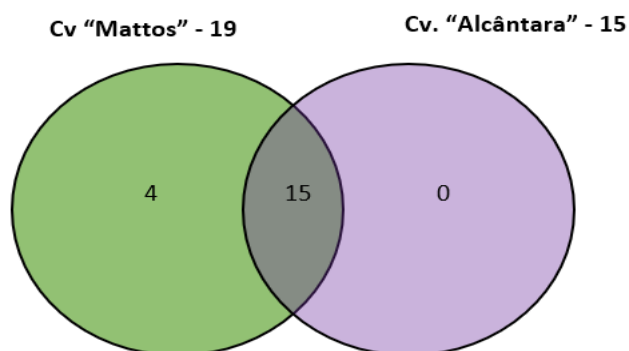
Figura 3 - Gráficos de Escala Multidimensional Não-Métrica (NMDS) correspondentes ao agrupamento de comunidades de fungos endofíticos agrupados por cultivar de goiabeira-serrana: “Mattos” e “Alcântara”. À esquerda o coeficiente de Bray-Curtis e a direita o Índice de Jaccard representando duas medidas diferentes de similaridade. Valores de estresse de Kruskal inferiores a 0,2 representam gráficos bem ordenados.



Fonte: Autor.

O número de espécies fúngicas comuns encontradas nos frutos de ambas as cultivares foi muito elevado em relação ao total de espécies do estudo (15 OTUs no total) (Figura 4).

Figura 4 - Diagramas de Venn representando o número total de espécies fúngicas endofíticas compartilhadas entre as cultivares de goiabeira-serrana: “Mattos” e “Alcântara”



Fonte: Autor.

Apenas 4 espécies associam-se exclusivamente com a cv. “Mattos” e que podem ter relação direta ou indireta com a resistência dessa cultivar à antracnose. Estas espécies são *C. rosea*, *Clonostachys rhizophaga*, *T. hamatum* e *T. harzianum*, que de acordo com as análises da porcentagem de similaridade SIMPER, contribuíram com mais de 65% da dissimilaridade média encontrada entre comunidades fúngicas das duas cultivares. Estas espécies foram, juntamente com *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*, as mais abundantes (Tabela 2).

É importante destacar que o gênero *Clonostachys* possui distribuição cosmopolita, com espécies comumente encontradas no solo, em associação com plantas como endofíticos, ou em material vegetal em decomposição (DOMSCH et al., 2007; ABREU et al., 2014). Isolados da espécie *C. rosea* são conhecidos por parasitar outros fungos e atuar como agentes de controle biológico de doenças radiculares e de parte aérea, causadas por diversos fitopatógenos (SUTTON et al., 1997; CHATTERTON et al., 2008; XUE et al., 2009; JENSEN et al., 2016). O fungo *C. rosea* e pelo menos cinco espécies filogeneticamente próximas, ocorrem comumente no Brasil, e dados preliminares indicam que estas são capazes de controlar outros fungos, como *Botrytis cinerea*, em testes realizados *in vitro* (MOREIRA, 2012). As espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* são mundialmente utilizadas no controle biológico das principais doenças que afetam as culturas (CARVALHO et al., 2011; SINGH; SCWARTZ, 2011; AMIRA et al., 2018; FRACETO et al., 2018; KIRIGA et al., 2018). Isso deve-se aos mecanismos de ação desse fungo, que inclui: o micoparasitismo, antibiose, competição por nutrientes, indução de resistência e promoção de crescimento em plantas (LORITO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010; PEDRO et al., 2012; ZEILINGER et al., 2016).

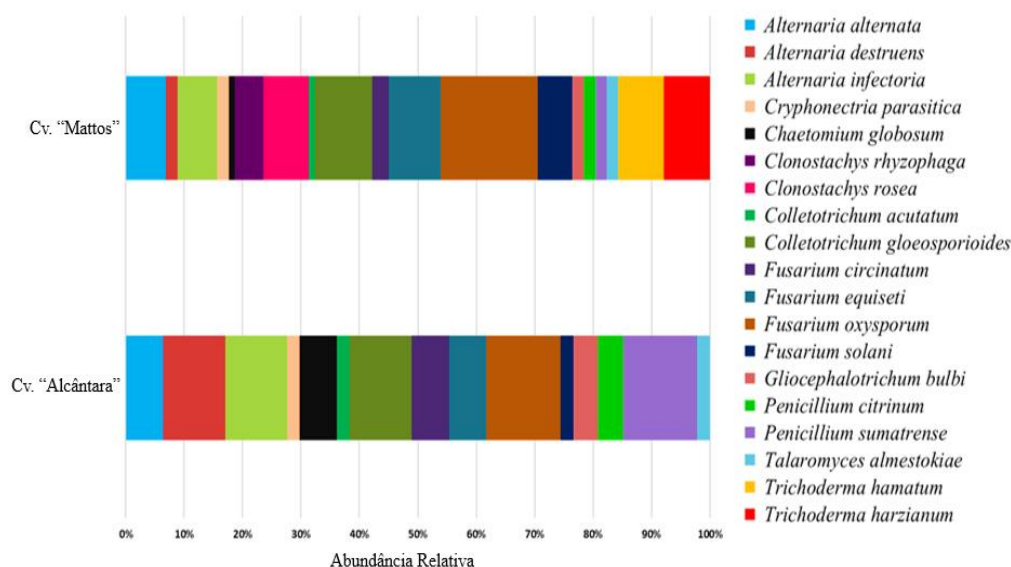
Vários são os fatores que podem influenciar a composição da comunidade fúngica endofítica presente na filosfera de um determinado hospedeiro, tais como fatores edafoclimáticos, condições de manejo das plantas, genótipo da planta hospedeira, órgão da planta, entre outros fatores (AMARANTE et al., 2013; PRETO et al., 2017; MARTINS et al., 2018). No entanto, no presente estudo não se verificaram diferenças na composição de fungos entre cultivares. Como relatado anteriormente, os fungos endofíticos isolados no presente trabalho foram coletados em árvores situadas em um local com iguais condições edafoclimáticas e com as mesmas condições de manejo, expostas ao mesmo inóculo aéreo. Estes fatores podem explicar, em parte, a alta similaridade encontrada nas comunidades de fungos endofíticos entre as cultivares. Apesar disto, foi possível observar a ocorrência

exclusiva de espécies na cv. “Mattos”. Este resultado pode estar relacionado com fatores intrínsecos da planta, como os genéticos, tal como mencionado anteriormente para outros frutos (AGLER, et al., 2016). Adicionalmente, a composição química dos frutos, em particular em compostos fenólicos, pode ter influência na comunidade fúngica, como anteriormente sugerido (SINGH; DWIVEDI, 2010).

De fato, a cv. “Alcântara” (cv. que não apresentou fungos endofíticos de maneira exclusiva) apresenta quantidade considerável de compostos fenólicos totais bem como de vitamina C e dos elementos Ca, Fe, Cu e Mn tanto na casca quanto na polpa dos frutos menor que a cv. “Mattos” (SOUZA, 2015).

Os endofíticos mais frequentemente isolados na cv. “Mattos foram os gêneros *Fusarium*, *Alternaria* e *Trichoderma*, enquanto na cv. “Alcântara foram os gêneros *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicillium* (Figura 5).

Figura 5 - Abundância relativa de fungos endofíticos associados a goiaba-serrana das cultivares “Mattos” e “Alcântara”.



Fonte: Autor.

Interação entre *Colletotrichum* spp. e isolados de fungos endofíticos

Entre as 19 espécies fúngicas identificadas, *T. harzianum*, *C. rosea*, *T. amestolkiae* e *F. oxysporum* tiveram a sua atividade antagonista testada contra *C. nymphaeae* e *C. siamense* por confronto direto, a fim de identificar isolados com maior efeito antagonista. A capacidade de antagonismo dos isolados fúngicos foi avaliada segundo Campanille

(2007), através do Índice de Antagonismo (IA) e através da análise da interação entre os isolados endofíticos e os fitopatógenos, de acordo com Badalyan et al. (2002). Adicionalmente, foi avaliado o efeito dos fungos tanto na esporulação quanto na germinação (viabilidade) de *C. nymphaeae* e *C. siamense*.

Tabela 4 - Índice de antagonismo e interações de fungos endofíticos isolados de frutos de goiabeira-serrana com os fitopatógenos *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum siamense*.

Fungo Endofítico	<i>C. nymphaeae</i>		<i>C. siamense</i>	
	Índice de Antagonismo (%)	Tipo de Interação	Índice de Antagonismo (%)	Tipo de Interação
<i>Clonostachys rosea</i>	100%	CA ₁	98,33%	CA ₁
<i>Fusarium oxysporum</i>	38,50%	A	30,10%	A
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	59,70%	A	66,40%	A
<i>Trichoderma harzianum</i>	95,80%	CA ₂	92,30%	CA ₂

Fonte: Autor.

Legenda: A: Inibição mútua com contato micelial na qual nenhum dos organismos é capaz de crescer um sobre o outro; CA₁: O endofítico cresce parcialmente sobre o patógeno; CA₂: crescimento total do endofítico sobre o patógeno após inibição inicial com contato micelial.

Todos os fungos testados foram capazes de inibir o crescimento micelial dos patógenos (Tabela 4). Para ambos os fitopatógenos, os endofíticos *C. rosea* e *T. harzianum* apresentaram maior índice de antagonismo (variando de 92 a 100%), seguido de *T. amestolkiae* que apresentou IA de 59% para *C. nymphaeae* e 66% para *C. siamense*.

São diversos os estudos que evidenciam a eficiência de *Trichoderma* no biocontrole de doenças em plantas (BONETT et al., 2015; DE AGUIAR et al., 2015; SILVA et al., 2015; JUNGES et al., 2016). Souza et al. (2004) isolaram *Trichoderma* spp. das plantas *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*, originárias da Amazônia, comprovando, atividades biocontroladoras desses isolados endofíticos contra vários patógenos de plantas. Evans et al. (2003), encontraram *T. harzianum* de forma endofítica em galhos e frutos de cacau de montanha (*Theobroma gileri*). De acordo com esses autores, os isolados obtidos inibiram o crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da doença conhecida popularmente por vassoura-de-bruxa.

O endofítico com menor eficiência na taxa de inibição do crescimento micelial para ambos os fitopatógenos foi *F. oxysporum*. Mesmo que essa espécie tenha sido relatada como patogênica para outras culturas e já tenha sido transmitida de sementes para plântulas

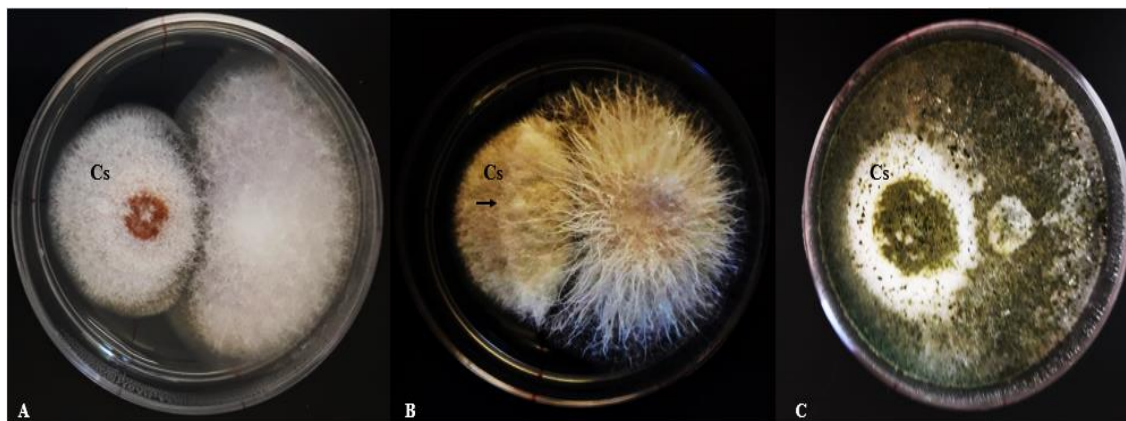
de goiabeira-serrana (Fantinel, 2014), o seu uso como agente de biocontrole é justificável, nesse caso, em virtude de ter apresentado a maior frequência de colonização total e a maior abundância relativa total (Tabela 2).

No entanto, este é o primeiro trabalho mostrando atividade antagonista dessa espécie em confronto direto com *C. nymphaeae* e *C. siamense*. Trabalhos anteriores relataram a ação antagonista de *F. oxysporum* apenas para outros patógenos como *Curvularia lunata*, agente causal da queima foliar de várias culturas, como o inhame, por exemplo (LOPES et al., 2017).

Fungos do gênero *Fusarium* são descritos frequentemente, na literatura como patogênicos para uma ampla gama de hospedeiros (MICHEREFF, 2005; LESLIE; SUMMERELL, 2006), sendo incipientes e ainda incompletos os estudos envolvendo este fungo como endofítico. Os estudos realizados no presente trabalho são importantes, pois faltam informações para elucidar a base biológica das interações deste fungo com os hospedeiros dificultando, dessa maneira, sua utilização como agente de biocontrole e de promoção do crescimento vegetal.

Ocorreram três tipos de interação entre os fungos endofíticos e os fitopatógenos testados (Figura 6), sendo que *F. oxysporum*, *T. amestolkiae* vs. *C. nymphaeae* e *C. siamense*, apresentaram interação do tipo A, onde os endofíticos inibiram o crescimento dos patógenos com contato entre os micélios (Figura 6A). Por sua vez, *C. rosea* vs. *C. nymphaeae* e *C. siamense* apresentaram interação do tipo CA₁ na qual o micélio do fungo endofítico entra em contato com o do patógeno e cresce parcialmente sobre o mesmo (Figura 6B). *Trichoderma harzianum* vs. *C. nymphaeae* e *C. siamense* apresentaram interação tipo CA₂ na qual o endofítico cresceu totalmente sobre o patógeno (Figura 6C).

Figura 6 - Interações entre *Colletotrichum siamense* (Cs) e fungos endofíticos isolados de goiabeira-serrana das cultivares “Mattos” e “Alcântara”. Em que, A: *C. siamense* x *Fusarium oxysporum* em interação do tipo A; B: *C. siamense* x *Clonostachys rosea* em interação do tipo CA₁ onde o endofítico cresce parcialmente sobre o patógeno após o contato micelial entre os fungos. A seta indica exatamente o limite até onde o fungo endofítico cresceu sobre o patógeno; em C: *C. siamense* x *Trichoderma harzianum* em interação do tipo CA₂ onde o fungo endofítico cresce totalmente sobre o patógeno.

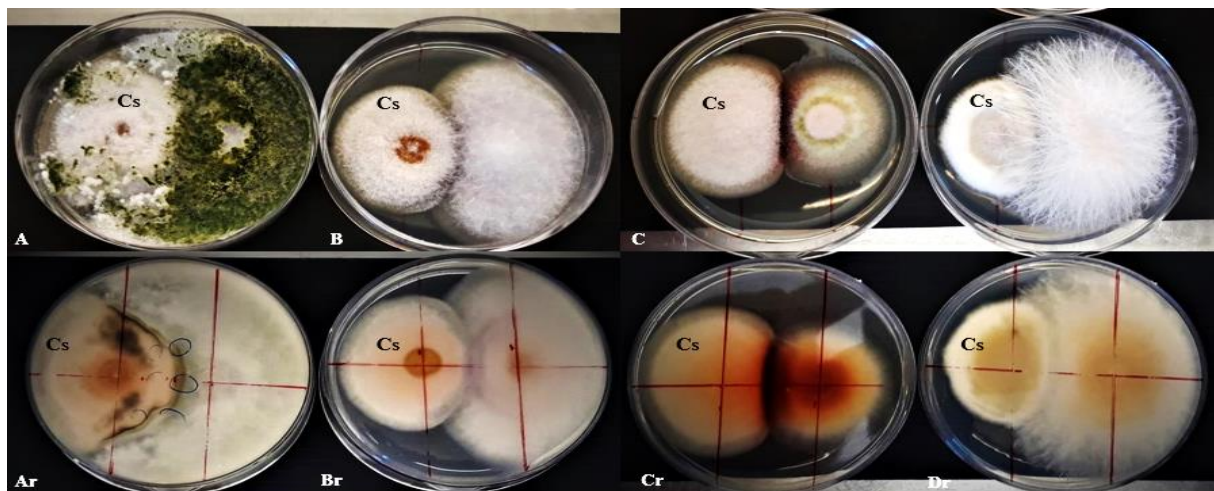


Fonte: Autor.

Portanto, a capacidade dos fungos endofíticos em suprimir o crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *C. siamense*, pode provavelmente ocorrer através de inibição geral (por exemplo, envolvimento de substâncias inibitórias) ou por competição por espaço, devido à sua vantagem de crescimento rápido, como ocorre com *T. harzianum*. Desta forma, os fungos *C. rosea* e *T. harzianum* destacam-se como mais promissores no controle do agente causal da antracnose em goiabeira-serrana.

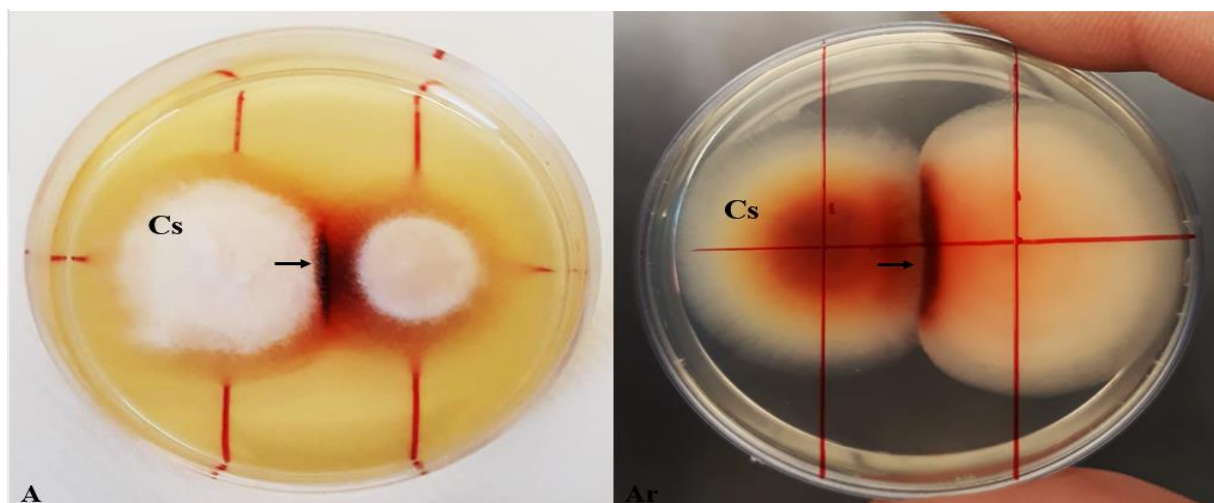
Através na análise macroscópica das colônias fúngicas dos testes de confronto direto, foi possível observar a inibição do patógeno (Figura 7) e o crescimento do endofítico sobre o patógeno (Figura 7 A e 7 D). Concomitante a isso, para a co-cultura *T. harzianum* x *C. siamense* houve mudança na coloração dos micélios na zona de interação, indicando um estresse do patógeno em contato com o antagonista (Figura 7 Ar). Da mesma maneira, no confronto entre *Talaromyces amestolkiae* x *C. siamense* houve mudança na coloração dos micélios, uma vez que o antagonista em interação com o patógeno apresentou coloração avermelhada (Figura 7 C). A mesma alteração foi verificada no reverso da colônia (Figura 7 Cr) e com maiores detalhes na Figura 8A e 8Ar.

Figura 7 - Interações entre *Colletotrichum siamense* (Cs) e isolados fúngicos endofíticos obtidos das cvs. “Mattos” (*Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea*) e “Alcântara” (*Fusarium oxysporum* e *Talaromyces amestolkiae*) no sétimo dia de incubação em meio batata-dextrose-ágar. Na parte superior o micélio aéreo e na parte inferior o reverso das placas. Cs está à esquerda na placa de Petri; e isolados fúngicos endofíticos, à direita. Em A, o crescimento total de *Trichoderma harzianum* sobre *C. siamense* (A) e o escurecimento do patógeno na zona de interação com o antagonista (Ar); Em B, *Fusarium oxysporum* inibe por contato o crescimento de *C. siamense*; Em C e Cr, observa-se a coloração avermelhada na zona de contato entre o patógeno e o antagonista *Talaromyces amestolkiae*; Em D, crescimento parcial de *Clonostachys rosea* sobre *C. siamense*.



Fonte: Autor.

Figura 8 - Detalhe da Interação entre *Colletotrichum siamense* (Cs) na parte esquerda da placa de petri e *Talaromyces amestolkiae* à direita no sétimo dia de incubação em meio de cultura batata-dextrose-ágar. A seta indica a coloração avermelhada na zona de contato entre os dois fungos. Em Ar, a seta indica a coloração avermelhada na zona de contato no reverso da placa de petri



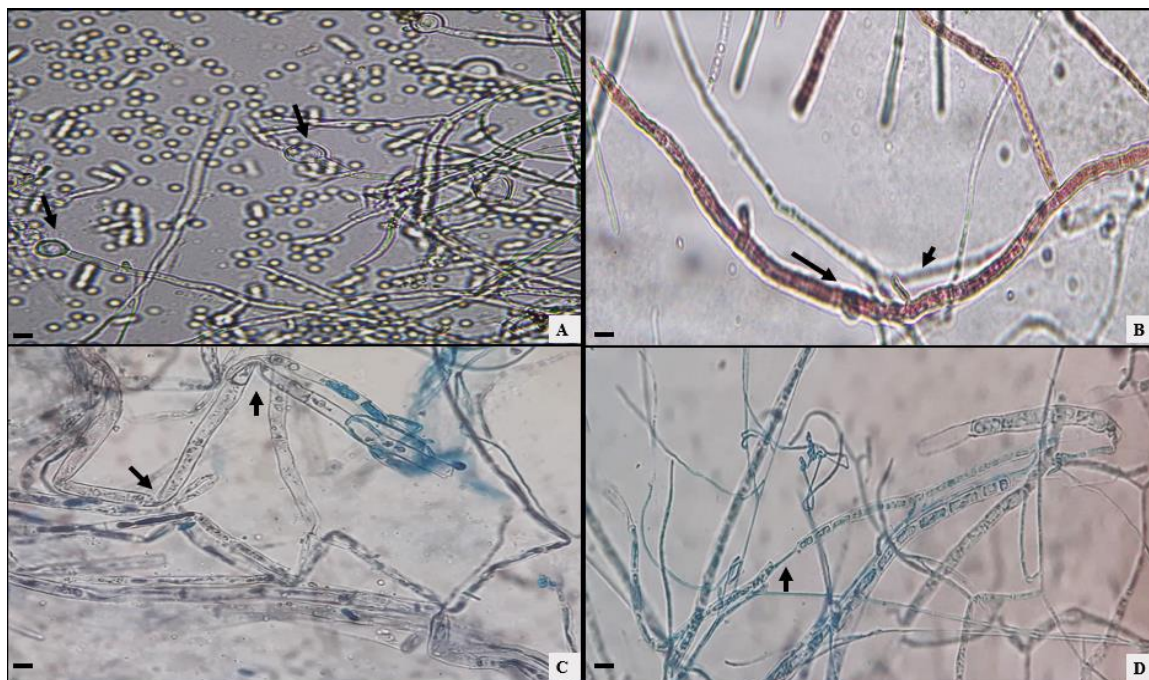
Fonte: Autor.

A pigmentação do micélio pode indicar a formação de melanina e compostos semelhantes a melanina. Tais substâncias são produzidas pelos fungos como forma de defesa a ataques de outros organismos ou radiações eletromagnéticas danosas, proteção contra agentes oxidantes, proteção contra frio e calor extremos, aquisição de nutrientes como ferro, aquisição de energia por processo fotossintético estando associados em alguns casos, a funções vitais e reprodutivas dos microrganismos (LIU; NIZET, 2009). Portanto, a formação de pigmentos na zona de interação entre *C. nymphaeae*/*C. siamense* e *T. amestolkiae* pode ser um mecanismo do antagonista para proteger as suas hifas impedindo o acesso de enzimas que degradam a parede celular, como já relatado em outros estudos (LARRAN et al., 2016).

Observações realizadas em microscópio óptico mostraram alterações na morfologia das hifas de *C. siamense* nas zonas de interação com *T. harzianum* e *C. rosea* (Figura 9). Na figura 9A observa-se a formação de clamidósporos (estruturas de resistência) pelo fungo *T. harzianum*, na figura 9B visualiza-se na zona de interação entre as culturas a hifa de *T. amestolkiae* na coloração vermelha e a de *C. siamense*, hialina.

Como pode-se observar, as hifas de *C. siamense* tornam-se deformadas/retorcidas (Figura 9C) e colapsadas (Figura 9D) na zona de interação com o antagonista *C. rosea*. Essas anormalidades apresentadas pelos patógenos, reforçam a eficiência no antagonismo dos isolados pesquisados. Muitos microrganismos antagônicos, tais como os fungos, são capazes de produzir β -1,3 glucanases, proteases e quitinases, que hidrolisam os componentes da parede celular de leveduras e causam a lise celular (SALAZAR; ASENJO, 2007). *T. harzianum*, por exemplo, produz 3 isoformas de β -1,3 glucanase (FLEURI; SATO, 2005).

Figura 9 - Morfologia das hifas de *Colletotrichum siamense* e de fungos endofíticos obtidos de frutos de goiabeira-serrana de duas cultivares: “Mattos” e “Alcântara”. Clamidósporos de *Trichoderma harzianum* (setas)(A); Hifa de *Talaromyces amestolkiae* na coloração vermelha (seta maior) e hifa de *C. siamense* (hialina) na zona de interação (seta menor)(B); Hifas de *C. siamense* em co-cultura com *Clonostachys rosea* deformadas e em estresse (setas) (C); Hifa de *C. Siamense* em colapso (seta) (D). Barra = 10 μ m.

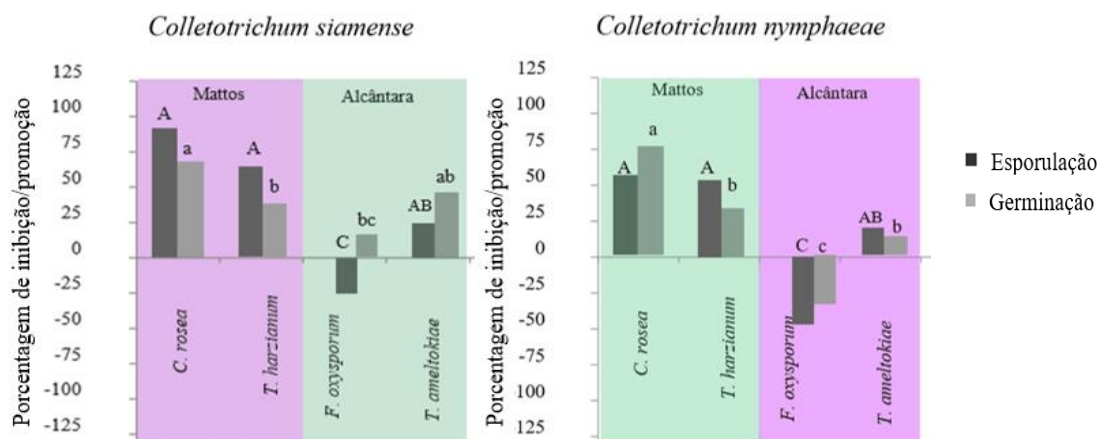


Fonte: Autor.

A ação de isolados fúngicos endofíticos na esporulação e germinação de *C. nymphaeae* e *C. siamense* foi diferente, dependendo do isolado em questão (Figura 10). Três dos quatro fungos testados (*C. rosea*, *T. harzianum* e *T. amestolkiae*) reduziram significativamente ($p < 0,05$) de 21-85% a esporulação de *C. nymphaeae* e *C. siamense* em comparação com o controle. Pelo contrário, *Fusarium oxysporum* promoveu significativamente ($p < 0,05$) a esporulação de *C. siamense* (25%) e *C. nymphaeae* (52%).

Todos os fungos testados reduziram significativamente a germinação de conídios de *C. siamense* (Figura 10) sendo que a maior inibição na germinação foi proporcionada por *C. rosea* (62 %). Para *C. nymphaeae* apenas *F. oxysporum* promoveu aumento na germinação (33%), tendo os demais fungos endofíticos (*C. rosea*, *T. harzianum* e *T. amestolkiae*) inibido significativamente ($p < 0,05$), a germinação do patógeno. Dentre estas três espécies, *C. rosea* foi a que mais inibiu a germinação de *C. nymphaeae* (cerca de 80% em relação ao controle).

Figura 10 - Porcentagem de inibição (valores positivos) e promoção (valores negativos) da esporulação e germinação de conídios de *Colletotrichum siamense* e *Colletotrichum nymphaeae* em confronto direto com fungos endofíticos isolados das cvs. de goiabeira serrana: “Mattos” e “Alcântara”. Cada valor é expresso como média (n=3). Barras com diferentes letras maiúsculas (esporulação) e minúsculas (germinação) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre isolados endofíticos.



Fonte: Autor.

Zivković et al. (2010) verificaram que *T. harzianum* inibiu 86% e 89% a germinação de conídios de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em condições *in vitro*, respectivamente. Esses dados corroboram que *T. harzianum* é um bom inibidor da germinação de esporos desses fungos. Alguns possíveis mecanismos associados à atividade antagonista dos agentes de biocontrole incluem a produção de antibióticos, enzimas, sideróforos como o ácido salicílico, a pioeverdina e a pioquelina, responsáveis por quelar o ferro e outros metais, conferindo vantagem competitiva a esses microrganismos (DUFFY; DÉFAGO, 1999; VILLA, 1999).

A eficiência antagonista de *T. harzianum*, por exemplo, combina alguns mecanismos tais como: competição por nutrientes; produção de metabólitos antimicrobianos e fungistáticos; micoparasitismo e indução de mecanismos de defesa em plantas (MONTEIRO et al., 2010; DE JAEGER et al., 2011; ZEILINGER et al., 2016;). No entanto, o micoparasitismo é o principal mecanismo de ação realizado pelo *T. harzianum*, sendo o processo mais estudado por se relacionar com a seleção de linhagens de agentes biocontroladores (DRUZHININA et al., 2011). O mecanismo de micoparasitismo é caracterizado pelo crescimento do *T. harzianum* ao encontro do fitopatógeno, do reconhecimento e interação das hifas, seguidos da secreção de uma série de enzimas líticas que degradam a parede celular, limitando o crescimento e atividade dos

fungos patogênicos (STEINDORFF et al., 2012; DRUZHININA, 2011). Durante esse processo, as enzimas líticas são liberadas de acordo com a composição da parede celular dos fitopatógenos, que são ricas em quitinas, glucanas e outras proteínas (FREE, 2013; ORLEAN, 2012). Nesse sentido, glucanases, enzimas quitinolíticas e proteases têm papel significativo no biocontrole de fitopatógenos por espécies de *Trichoderma* (DAGUERRE et al., 2014; KUBICEK et al., 2015). Portanto, é provável que tais compostos bioativos possam agir sobre a germinação e esporulação de conídios de *C. nymphaeae* e *C. siamense*.

Enfim, embora o genótipo da planta hospedeira em nível de cultivar, não ter apresentado diferenças significativas quanto a comunidade fúngica associada internamente aos frutos de goiabeira-serrana, a cv. “Mattos” apresentou microrganismos com ocorrência exclusiva (*C. rosea*, *C. rhizophaga*, *T. asperellum* e *T.harzianum*), com alto potencial de antagonismo sobre o patógeno causador da antracnose, trazendo, dessa maneira, implicações importantes para o desenvolvimento da goiabeira-serrana. Os fungos *C. rosea*, *T. harzianum* e *T. amestolkiae* exibiram atividade antagônica contra *C. nymphaeae* e *C. siamense*, induzindo inibição da germinação (ação fungistática), esporulação (ação genistática) e a deformação das hifas.

Ainda que os testes de antagonismo *in vitro* nem sempre apresentem o mesmo resultado *in vivo* (FREITAS; PIZZINATTO, 1991), o seu desenvolvimento é necessário, pois serve como seleção de isolados com características antagônicas (LUCONE MELO, 1999). Diversos trabalhos têm objetivado identificar agentes de controle biológico potencialmente eficientes e, para isso, os antagonistas têm sido pré-selecionados em testes *in vitro* (AMORIM; MELO, 2002; SHIOMI et al., 2008; LUCON et al., 2009). Posteriormente, estudos adicionais são necessários para melhor averiguar o papel desses fungos em condições naturais e, nesse sentido, *C. rosea* e *T. harzianum* apresentam potencial antagonista que justifica o aprofundamento das pesquisas.

Conclusão

Os resultados deste estudo permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. As cultivares “Mattos” e “Alcântara” apresentaram comunidade fúngica semelhante segundo índice de diversidade de Shannon Wiener (H);
2. A comunidade fúngica endofítica diferiu na abundância entre as cvs. “Mattos” e “Alcântara”;

3. Quatro espécies têm ocorrência exclusiva na cv. “Mattos”;

4. *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum* e *Talaromyces amestolkiae* são eficientes no controle *in vitro* de *C. nymphaeae* e *C. siamense*, agentes causais da antracnose em goiabeira-serrana.

Agradecimentos

À Professora Marlove Fátima Brião Muniz pela oportunidade do estágio de doutorado sanduíche que possibilitou que estas atividades acontecessem.

À agência de Fomento Brasileira CAPES que financiou os estudos no exterior.

À Toda Equipe do IPB/ESA - CIMO em especial à Prof. Paula Baptista ao Prof. José Alberto Pereira e à Fátima Martins que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho, por toda a infraestrutura disponibilizada, acolhida e ensinamentos que possibilitaram que este trabalho tivesse êxito.

Referências Bibliográficas

ABREU L.M. et al.. Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. **FungalBiol** 118:1004-1012, 2014.

AGLER T.A. et al. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. **Plos Biology**, 14(1):1-31, 2016.

ALMEIDA, C.V. de; et al.. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.

ALVAREZ, V. R. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found in juring pecan (*Carya illinoensis*) wood. **Agricultural Sciences**, 2012.

AMARANTE, C.V.T. do; et al. Qualidade e potencial de conservação pós-colheita de frutos em cultivares brasileiras de goiaba-serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.35, n.4, p.990 - 999, 2013.

AMIRA, M. B. et al. MIP diversity from *Trichoderma*: Structural consideration sand transcription almodulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* olive trees. **PlosOne**. 13 (3), 2018.

- AMORIM, E.P. da R.; MELO, I.S. de. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.565-568, 2002.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Ceres, 2018. v.1, 573 p.
- ANDRADE, E.R. de; DUCROQUET, J.P.H.J. Antracnose em goiabeira serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, n.2, p.7-10, Cruz das Almas,1993.
- ANDREOTE F.D., GUMIERE T., DURRER A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola** 71:528-539, 2014.
- ARAÚJO, L.; PINTO, F.A.M.F. Principais doenças e seu controle. In: CIOTTA, M N.; ARIOLI, C.J.; PINTO, F.A.M.F.; SANTOS, K. dos; ARAUJO, L.; PASA, M. da S. (Orgs.). **A cultura da goiabeira-serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p. 147-166.
- ARAÚJO, W.L.; et al. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology** 47: 229-236.
- ARMANDO, E.A. de S. **Fungos epifíticos e fitopatogênicos associados a plantas do Cerrado**. 2014. 189 f., Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- AZEVEDO, J. L.; et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BACON, C.W.; WHITE JR., J.F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- BADALYAN, S.M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N.G. Antagonist activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **PhytopathologiaMediterranea**, Firenze, v.41, p.200-225, 2002.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 Ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 241 p.
- BASTOS, C.N.; SANTOS, A.O. Superbrotamento de inflorescências do limão-de-caieira causado por *Fusarium decemcellulare*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.232, 2001.
- BONETT, L. P.; et al.. Biocontrole *in Vitro* de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma* spp. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 5-10, 2015.
- BRAY, J.R.; CURTIS, J.T. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographies**. 27:325-349, 1957.

- CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N.; Antagonistic activity of endophytic fungi to wards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in planta test. **Eur. J. of Plant Pathol.**, 117: 237-246, 2007.
- CARVALHO, D. D. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p.28-34, 2011.
- CHATTERTON S, JAYARAMAN J, Punja ZK. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. **BiolControl** 46:267- 278, 2008.
- CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N., Primer v5: user manual/tutorial. **PRIMER-E, Plymouth**, 2001.
- COLWELL, R.K., EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples. Version 9. **User's Guide and Application**. 2013.
- COMPANT, S.; et al.. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.
- COSTA, D. et al.. Diversity of fungal endophytic community in *Quercus suber* L. under different climate scenarios. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa. v. 41, n. spe, p. 41-50, dez. 2018.
- DAGUERRE, Y. et al. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 97–125, 2014.
- DALLA PRIA, M.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do Cacaueiro (*Theobroma cacao*) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. p176-183.
- DE AGUIAR, A. R.; et al.. Efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de *Allium cepa*. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 3, p. 934-940, 2015.
- DE JAEGER, N. et al. *Trichoderma harzianum* might impact phosphorus transport by arbuscular mycorrhizal fungi. **Microbiology ecology**, v. 77, n. 3, p. 558–67, 2011.
- DEGENHARDT, J. et al. Morfologia floral da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana*) e suas implicações na polinização. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 718-721, Dez. 2001.
- DOMSCH, K.H., GAMS W, ANDERSON T. **Compendium of soil fungi**. 2nd ed. Eching: IHW Verlag. 672 p. 2007.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–759, 2011.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana** (*Feijoa sellowiana*). Jaboticabal: Funep, 2000. 66p. (Serie Frutas Nativas, 5).

DUFFY, B.K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2429-2438, 1999.

EVANS, H.C., HOLMES, K.A., THOMAS, S.E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress** 2: 149–160, 2003.

FANTINEL, V.S. **Fungos associados às sementes de goiaba-serrana: detecção, efeitos na qualidade das sementes, transmissão para plântulas e controle**. 116p. [Dissertação Mestrado em engenharia florestal] Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

FANTINEL, V.S., et al. First Report of *Colletotrichum siamense* Causing Anthracnose on *Acca sellowiana* Fruits in Brazil. **Plant Disease**, 101(6), 1035-1035, 2017.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Minas Gerais, v.6, n. 2, p.36-41, 2008.

FLEURI, L. F.; SATO, H.H. β -1,3 glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1224-1231, jul./ago., 2008.

FRACETO, L.F et al. *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, p.1-8, 2018.

FREE, S. J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. **Advances in Genetics**. v. 81, n.3, p. 33–82, 2013.

FREITAS, S.S.; PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersi conesculentum*). **Summa Phytopathol.**, 17:105-112, 1991.

JARDIM, I.C.F.S.; ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, S.C.N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 1. ed. USA: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LIU, G.Y.; NIZET, V.. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 9, p. 406-413, 2009.

HEIJDEN, M.G.A., HARTMANN, M. Networking in the Plant Microbiome. **Plos Biology** 14(2): e1002378, 2016.

HENDERSON, P.A.; SEABY, R.M.H. Community Analysis Package 4.0. **Pisces Conservation Ltd, Lymington, UK**, 2007.

JENSEN, D. F., KARLSSON, M., LINDAHL, B. D. Fungal–fungal Interactions: from natural ecosystems to managed plant production, with emphasis on biological control of plant diseases. In: **Mycology**, eds J. Dighton and J. F. White (Boca Raton, FL: CRC Press), 549–562. doi: 10.1201/9781315119496-39., 2017.

JUNGES, E.; et al.. *Trichoderma* spp. in the Production of Seedling of Forest Species. **Floresta e Ambiente**, (AHEAD), 2016.

KAMEI, S.H. et al. *Nectria* sp., *Phomopsis* sp. e *Xylaria* sp. fungos endofíticos isolados de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) L. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54., 2008, Salvador. **Resumos**. Salvador, 2008. p.34.

KEMBEL S. W., MUELLER R.C. Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. **Botany**, 92(4): 303-311, 2014.

KIRIGA, A. W. et al. Effect of *Trichoderma* spp. And *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. **Biological Control**, v. 119, p.27-32, 2018.

KRUSKAL, J. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**. 29: 1–27, 1964.

KUBICEK, C. et al. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, n. 2001, p. 11–23, 2015.

LARRAN, S., et al. Endophytes from wheat as biocontrol agents against an spot disease. **Biological control**, 92, 17-23, 2016.

LOPES, J. C. et al. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatógenos. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 84-88, 2017.

LORITO, M. et al. Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p.395-417, jul. 2010.

LUCON, C.M.M.; MELO, I.S. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathol.**, 25:132-136, 1999.

LUCON, C.M.M.; et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctoniasolani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.225-232, 2009.

MAGURRAN, A.E. **Measuring biological diversity**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004.

MARIANO, R.L.R. et al.. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. I. Frequência da população fúngica e efeito da hospedeira. **Agrotópica** 9(3): 127-134, 1997.

MICHEREFF, S.J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p.1 – 18.

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 298–305, 2010.

MORANDI, M.A.B; BETIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Orgs). **Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas**. Jaquariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. 2009. p.7-14.

MOREIRA G.M et al.. Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. **Mycological Progress**. 15: 1031–1039, 2016.

MUSSI-DIAS, V.; et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista brasileira plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

ORLEAN, P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 775–818, 2012.

PEDRO, E.A.S. et al. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p.1589-1595, 2012.

PEREIRA, J.O.; et al.. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 15: 37-40, 1999.

PEREIRA, R.M.F.G. **Caracterização da população microbiana endo-e epifítica em azeitonas de cultivares Transmontanas**. 2014. Tese de Mestrado.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag. 1991, p. 179-197.

PIMENTEL, I.C., KUCZKOWSKI, F.R., CHIME, M.A.. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil). **Floresta** 36:123–128, 2006.

POLETTO, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, 2006. p.1-10.

- PRETO, G. et al. Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. **Biological control**, v. 110, p. 1-9, 2017.
- RABIEY, M. et al. Endophytes vs tree pathogens and pests: can they be used as biological control agents to improve tree health. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-19, 2019.
- RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J..Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology** 39(2): 131-135, 1999.
- RODRIGUES, K.F. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia** 86(3): 376-385, 1994.
- SAIKKONEN, K.; et al. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.
- SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnology Letters**, Oxford, v. 29, p. 984-994, 2007.
- SEABY, R.M., HENDERSON, P.A.. **Species Diversity and Richness** Version 4. Lymington, UK: Pisces Conservation, 2006.
- SHIOMI, H.F.; MELO, I.S. de; MINHONI, M.T. de A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v.9, p.535-538, 2008.
- SILVA, B.N.S. **Diversidade e atividade biológica de fungos endofíticos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. 2019. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.
- SILVA, G.B.P.; et al.. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, p. 33-42, 2015.
- SINGH, R., RASTOGI, S., DWIVEDI, U.N. Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9(4), 398-416, 2010.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H.F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p.2199-2223, 2010.
- SOUSA, C. S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 195-203, 2009.
- SOUZA, A.G. **Caracterização física, química, nutricional e antioxidante em frutos e flores de genótipos de goiabeira-serrana [*Acca sellowiana* (Berg.)]**. Tese (Doutorado) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. 168p. Lages-SC, 2015.

- SOUZA, A.Q.L.; et. al.. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnoscogens* Bentham. **Acta amazônica**, v. 34, n. 2, p.185-95, 2004.
- STEINDORFF, A.S. et al. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. **Biological Control**, v. 61, n. 2, p. 134–140, 2012.
- STROBEL, G.; et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.
- SURYANARAYANAN, T.S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T.S.. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**. 85: 489– 493, 2003.
- SURYANARAYANAN, T.S; et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**. In Press, Corrected Proof, 2003.
- SUTTON, J.C.; et al. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease** 81(4):316-328, 2003.
- VIEIRA, P.D.S.; et al. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccínea* L. em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 10, n. 1, p. 1-4, 2012.
- VILLA, P.M.; **Producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas fluorescentes* para su uso en el control biológico de hongos fitopatógenos**. Dissertação (Mestrado) - Universidad de La Habana, Cuba. 60p. 1999.
- WANG, L. W.; et. al.. Bioactive metabolites from *Phoma* species, na endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 1231-9, 2012.
- WHITE, J., et. al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., and White, T. J. (ed) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, Academic Press, San Diego, pp. 315-322. wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology* 3: 240- 254, 1990.
- WOUDENBERG, J.H.C. et al. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology** 75:171-212, 2013.
- XUE, A. G.; Biological control of *Fusarium* head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 31, 169–17, 2009.
- ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*. Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p.74-90, 2016.

ZIVKOVIĆ, S. et al. Screening of antagonist activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biological Sciences**, Belgrade, v.62, p.611-623, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pouco estudada do ponto de vista fitossanitário, a cultura da goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* (O. Berg) O. Berg) necessitava de um estudo detalhado a respeito da antracnose, principal doença que acomete seus frutos nas regiões na qual a planta é cultivada. São inúmeros os potenciais da goiaba-serrana que não podem ser negligenciados, principalmente no Brasil, país que é o centro de dispersão da espécie, juntamente com o Uruguai.

É imprescindível destacar que apesar de ser o centro de origem da goiabeira-serrana, o Brasil ainda importa os frutos produzidos na Colômbia e as principais pesquisas no que tange às propriedades medicinais e alimentícias dos frutos são realizadas na Nova Zelândia, um dos países pioneiros no melhoramento genético desta espécie juntamente com os Estados Unidos da América.

São vários os fatores que estão relacionados a estes acontecimentos, dentre os quais cabe destacar questões socioculturais, econômicas e até mesmo de ordem política que resultaram na falta de investimento público em pesquisa científica dificultando, dessa maneira, a valorização da nossa flora autóctone e do conhecimento local associado a goiabeira-serrana, refletindo na limitação do seu uso e na ausência de estratégias eficientes de manejo e conservação.

Nesse sentido, cabe mencionar o protagonismo da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) nas pesquisas com a goiabeira-serrana no Brasil. A empresa mantém o maior Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Brasil localizado no município de São Joaquim-SC e lançou as primeiras cultivares brasileiras: “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” nos anos de 2007 e 2008.

O Planalto Serrano Catarinense e a Serra Gaúcha são as regiões que compreendem os principais municípios de produção de goiaba-serrana no Brasil. Nestes locais, os pomares de goiabeira-serrana são constantemente atacados por fungos do gênero *Colletotrichum*, que ao infectarem os frutos, causam a antracnose tornando inviável a comercialização dos mesmos. Nesse sentido, em uma perspectiva positiva, o manejo integrado da antracnose pode se tornar uma ferramenta valiosa a ser utilizada pelos produtores para produzir frutos de qualidade. Cabe salientar que é impossível trabalhar com uma visão integrada de controle da antracnose sem antes ter uma caracterização precisa do

patossistema: goiabeira-serrana x *Colletotrichum* spp., e, portanto, este foi o principal objetivo desta tese.

Dessa maneira, através da análise multigênica foi conduzido um trabalho pioneiro que culminou com a publicação do primeiro relato de *Colletotrichum siamense* causando antracnose em frutos de goiabeira-serrana no Brasil (**Capítulo 1**). Isto permitiu ir além dos estudos até então desenvolvidos, os quais embora importantes, caracterizaram o agente causal da antracnose apenas em complexos de espécies (*C. acutatum* e *C. gloeosporioides*) (DUCROQUET, 1993; LOPES, 2013).

A partir da confirmação de que os sintomas encontrados em frutos de goiabeira-serrana estavam associados a *C. siamense*, passou-se então a investigar se mais espécies de *Colletotrichum* estariam associadas aos sintomas de antracnose nos frutos na área de ocorrência natural bem como de que forma *Colletotrichum* spp. infectam os frutos desta cultura. Constatou-se que o mecanismo de infecção de *Colletotrichum* spp. em goiabeira-serrana, se dá de maneira sistêmica através de estruturas florais, onde o patógeno permanece latente nas flores, infectando o estilo-estigma e se associando com os frutos desde o seu processo de formação, conforme abordado no **Capítulo 2**. A elucidação do mecanismo de infecção, bem como a identificação precisa das espécies de *Colletotrichum* spp. associadas aos sintomas de antracnose em goiaba-serrana, contribui no desenvolvimento de estratégias de controle da antracnose nos pomares.

Um dos grandes diferenciais desta tese, foi, sem dúvida, a coleta de isolados de *Colletotrichum* spp. para a caracterização morfofisiológica e molecular na área de ocorrência natural de goiabeira-serrana. No total, foram coletados 49 isolados distribuídos entre os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e ainda no Departamento de Salto no Uruguai (**Capítulo 3**).

Durante a coleta dos frutos sintomáticos para a obtenção dos isolados, pode-se constatar, na prática, as demandas dos produtores bem como confirmar o quanto a antracnose prejudica a produção dos frutos de goiaba-serrana. Esta coleta permitiu um intercâmbio muito grande de informações com produtores, pesquisadores, prefeituras e instituições de pesquisa (**ANEXO B**). De maneira positiva, pode-se observar que os produtores estão empenhados e confiantes em busca de soluções que além de controlar a doença não prejudiquem o meio ambiente.

A opção pela coleta de frutos sintomáticos de goiaba-serrana nas suas mais diversas áreas de ocorrência natural foi na perspectiva de ser o mais abrangente possível do ponto

de vista geográfico, uma vez que para executar um estudo que envolva aspectos de controle do patógeno causador da antracnose é necessário o conhecimento da variabilidade entre os isolados (cor de colônia, tamanho de conídios, formato de conídios, Índice de Velocidade de Crescimento Micelial e esporulação), pois só assim poderemos estabelecer uma estratégia correta no controle de *Colletotrichum* spp.

Quando os isolados foram analisados em diferentes meios de cultivo, observou-se uma grande variabilidade de comportamento em relação ao crescimento micelial e esporulação. Artigiani Filho e Bedendo (1996) relatam que o comportamento de isolados fúngicos pode estar relacionado aos componentes de cada meio de cultivo, mostrando variação na esporulação e na coloração da colônia, entre outras características específicas.

Apesar de os isolados terem apresentado características padrão para o gênero *Colletotrichum*, de acordo com vários autores (FREEMAN, 1998; TOZZE JÚNIOR et al., 2006; ANDRADE et al., 2007) a análise morfológica possui limitações, uma vez que, as mesmas são influenciadas por fatores ambientais ou pela própria variabilidade genética do patógeno.

Ao considerar a origem geográfica dos isolados, observa-se que os caracteres morfológicos também apresentaram variação, mesmo entre aqueles provenientes de uma mesma região. Uma possível explicação para tais observações pode estar no fato de que alguns isolados, embora provenientes de um mesmo estado, foram obtidos a partir de frutos produzidos em localidades com características edafoclimáticas distintas nas regiões geográficas amostradas.

Devido à variabilidade apresentada pelos isolados de *Colletotrichum*, através dos caracteres morfofisiológicos, a diferenciação de espécies de *Colletotrichum*, inter e intraespecífica pode ser feita por outros métodos não morfológicos, os quais segundo Menezes (2002) ampliam a faixa de caracteres usados para identificá-los, e fornecem subsídios para entender melhor a estrutura da população.

Nesse sentido, métodos moleculares são cada vez mais utilizados como ferramentas para a diferenciação das espécies de fungos tais como as espécies do gênero *Colletotrichum* (LOPEZ, 2001). Atualmente, várias técnicas têm sido postas em prática, como uma ferramenta auxiliar da taxonomia clássica de fungos. Dentre elas podem ser citadas: o uso de marcadores moleculares, e principalmente, via técnicas baseadas em PCR ("Reação em Cadeia pela Polimerase" - "*Polymerase Chain Reaction*") (WILLIAMS et al., 1990).

Considerando que os custos para a extração e sequenciamento de DNA poderiam

impossibilita a realização da análise molecular para os 49 isolados e considerando necessário a análise de mais de uma região do DNA para identificar os isolados em nível *sensu stricto* (ITS, ACT e β -TUBULINA), foi realizada a análise *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), a qual, com base em caracteres morfológicos, permitiu formar grupos de isolados com características morfológicas similares. Posteriormente, foi selecionado pelo menos um isolado representativo de cada grupo para a análise molecular, totalizando 13 isolados utilizados.

A análise da região ITS permitiu a identificação dos isolados apenas em complexo de espécies (*C. gloeosporioides* e *C. acutatum*), ratificando a análise morfológica. No entanto, os valores de *bootstrap* para as regiões ACT e β -TUBULINA demonstraram resultados confiáveis de proximidade genética entre os isolados de *Colletotrichum* spp. do presente estudo com os depositados no *GenBank* para espécies com táxon definido, sendo, portanto, suficientes a análise destas regiões para a identificação dos isolados em nível de espécie.

Pode-se concluir após as análises filogenéticas que existe diversidade e variabilidade genética entre os isolados, pois cinco espécies estão associadas aos sintomas de antracnose nos frutos de goiaba-serrana em sua área de ocorrência natural: *C. nymphaeae* (complexo *C. acutatum*), *C. theobromicola*, *C. fructicola* e *C. siamense* (complexo *C. gloeosporioides*) e *C. pseudoacutatum*. O conhecimento da variabilidade patogênica é de suma importância para o entendimento da relação patógeno/hospedeiro e para o manejo da doença, pois o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas é baseado no conhecimento da variabilidade das populações de fitopatógenos (ASSUNÇÃO, 1997; BRIDGE et al., 1998; BARBIERI; CARVALHO, 2001; MICHEREFF, 2001).

A identificação precisa dos isolados de *Colletotrichum* spp. associados aos sintomas da antracnose em goiabeira-serrana em sua área de ocorrência natural, suscitou a necessidade da avaliação da patogenicidade (virulência) destes isolados e da verificação da reação de suscetibilidade das cultivares de goiabeira-serrana: “Alcântara”, “Helena”, “Mattos” e “Nonante” à antracnose, conforme estudo apresentado no **Capítulo 4**.

Inexistem, até o momento, estudos que comprovem a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* em goiaba-serrana identificados molecularmente e coletados na área de ocorrência natural da espécie. No entanto, a metodologia utilizada para o teste de patogenicidade seguiu estudo conduzido por Lopes (2013) que avaliou a patogenicidade de

Colletotrichum spp. (*sensu lato*) através da inoculação de suspensão de esporos diretamente em frutos de goiaba-serrana.

Com a realização dos postulados de Koch foi possível confirmar a patogenicidade das cinco espécies identificadas em nível molecular. Todos os sintomas reproduzidos foram semelhantes aos originais encontrados nos frutos no momento da coleta. A suscetibilidade das cvs. “Helena” e “Nonante” variou de acordo com a espécie do patógeno. A cv. “Alcântara” é suscetível e a cv. “Mattos” é resistente à todas as espécies de *Colletotrichum* testadas. Dessa forma, a cv. “Mattos” é a cultivar de goiabeira-serrana mais indicada para reduzir os níveis de antracnose nos pomares em sistema de cultivo convencional, integrado ou orgânico.

Além das pesquisas sobre a caracterização do patógeno e da resistência genética das cultivares, são necessários outros estudos inovadores visando manter a qualidade dos frutos e a rentabilidade dos agricultores, sem interferir nos recursos naturais.

Em estudo recente, Carrion et al. (2019) afirmam que a planta apresenta três linhas principais de defesa ao ataque de microrganismos. A rizosfera constitui a primeira linha de defesa, o tecido da planta a segunda linha de defesa e uma terceira linha de defesa contra a infecção de patógenos é modulação pelo microbioma que vive dentro das raízes. Em analogia à rizosfera, a planta pode reagir da mesma maneira na filosfera.

Nesse sentido, a comunidade fúngica endofítica associada aos frutos da goiabeira-serrana pode estar relacionada com a resistência da planta ao ataque de patógenos além de poder contribuir em nível agrícola e alimentar, delineando novas estratégias para o controle biológico da antracnose.

Até o momento, não existem estudos sobre a associação de fungos endofíticos com goiabeira-serrana. Assim sendo, o último capítulo (**Capítulo 5**) objetivou avaliar a comunidade fúngica presente no interior (comunidade endofítica) de goiabas-serranas de duas cultivares com diferentes suscetibilidades à antracnose: cv. “Mattos” (resistente) e cv. “Alcântara” (susceptível). A capacidade dos isolados nativos para controlar *C. nymphaeae* e *C. siamense* foi avaliada adicionalmente pelo método do confronto direto.

A comunidade fúngica endofítica associada à goiabas-serranas das duas cultivares, embora pouco diversa, demonstrou ser abundante, obtendo-se, através do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal um total de 19 espécies fúngicas, as quais pertencem a 10 gêneros e 8 famílias, sendo *Fusarium oxysporum* a espécie mais abundante. Dentro da comunidade fúngica analisada, encontrou-se espécies tanto fitopatogênicas para goiabeira-

serrana como para outros hospedeiros (*C. acutatum* e *C. gloeosporioides*) além de microrganismos com potencial antagonista, como os pertencentes aos gêneros *Clonostachys* e *Trichoderma*.

A comunidade fúngica diferiu em termos de abundância entre as cultivares. A cultivar “Mattos” apresentou 19 espécies sendo que 4 espécies tiveram ocorrência exclusiva nessa cultivar, em contrapartida, a cv. “Alcântara” apresentou 15 espécies, no entanto não apresentou espécies com ocorrência exclusiva.

Essas variações podem ter sido causadas principalmente por fatores genéticos, em nível de cultivar, já que o genótipo do hospedeiro se relaciona com as características físico-químicas do fruto. Este estudo contribuiu no sentido de selecionar uma determinada cultivar específica que tenha as características necessárias para reduzir a incidência da doença e aumentar a produção de frutos.

Foram analisados o crescimento, a germinação, a esporulação e ainda as anormalidades apresentadas em hifas de *C. nymphaeae* e *C. siamense* quando em contato com os antagonistas.

Os quatro isolados fúngicos testados apresentaram potencialidades no biocontrole dos fitopatógenos, sendo que *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum* (ambos isolados da cv. “Mattos”) e *Talaromyces amestolkiae* (isolado da cv. “Alcântara”) foram os mais promissores pois apresentaram ação fungistática e genistática. *Fusarium oxysporum* (isolado da cv. “Alcântara”) não se mostrou eficiente em comparação com os demais fungos uma vez que estimulou a esporulação em ambos os patógenos.

Os resultados obtidos revelam, pela primeira vez, a abundância e a diversidade de fungos endofíticos presentes em frutos de goiabeira-serrana. Algumas das espécies identificadas já se encontram descritas como tendo contribuições importantes no controle biológico de fitopatógenos (*C. rosea* e *T. Harzianum*, por exemplo) ou como produtores de compostos voláteis (*T. amestolkiae*), o que pode abrir novas perspectivas para estudos envolvendo a relação planta-microrganismo/microrganismo e ainda para o desenvolvimento de estratégias de controle da antracnose.

Diante do exposto, considerando a terceira linha de defesa proposta por Carrion et al. (2019) a resistência da cv. “Mattos” à antracnose poderá, em parte, estar relacionada com a presença exclusiva de fungos endofíticos antagonistas aos fitopatógenos causadores desta doença. No entanto, estudos envolvendo um maior número de cultivares e ensaios em casa de vegetação e campo se fazem necessários como complementação na avaliação do

potencial antagonista dos microrganismos fúngicos endofíticos no biocontrole de *Colletotrichum* spp.

Enfim, espera-se que o presente trabalho de caracterização e manejo do patossistema: goiaba-serrana x *Colletotrichum* spp., se constitua em estratégias promissoras no manejo integrado de doenças da goiabeira-serrana impactando positivamente no sistema produtivo da cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRONET. **Estadísticas agrícolas: goiabeira-serrana**. 2017. Disponível em: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/paginas/default.aspx>. Acesso em: 9 dez. 2019.
- AKINNIFESI, F.K.; LEAKEY, R.R.B.; AJAYI, O.C.; SILESHI, G.; TCHOUNDJEU, Z.; MATAKALA, P.; KWESIGA, F.R. **Indigenous fruit trees in the tropics: domestication, utilization and commercialization**. Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International, 2008, 438 p.
- AMARANTE, C.V.T.; SOUZA, A.G.; BENINCÁ, T.D.T.; STEFFENS, C.A. Qualidade dos frutos de genótipos brasileiros de goiabeira-serrana na colheita e após o armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 9, p. 734-742, 2017.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 32:21-31, 2007.
- ANDRADE, E.R. DUCROQUET, J.P.H.J. Antracnose em goiabeira-serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, n.2, p.7-10, Cruz das Almas, 1993.
- ARAÚJO, L.; PINTO, F.A.M.F. Principais doenças e seu controle. In: CIOTTA, M N.; ARIOLI, C.J.; PINTO, F.A.M.F.; SANTOS, K. dos; ARAUJO, L.; PASA, M. da S. (Orgs.). **A cultura da goiabeira-serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p. 147-166.
- ARTIGIANI FILHO, V.H; BEDENDO, I. P. Variabilidade de *Helminthosporium oryzae* detectada através da ocorrência de setores na colônia, sensibilidade a fungicidas, crescimento em diferentes meios de cultura e temperatura de incubação. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 22, n. 3-4, p. 217-221, 1996.
- ASSUNÇÃO, I.P. Identificação de fontes de resistência em culturas de cebola (*Allium cepa* L.) e análise da variabilidade *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. Et Sacc (Sensu Arx, 1957) Assistida por marcadores moleculares. 85f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 1997.
- ASSUNÇÃO, M.M.C. Fungos endófitos isolados de folhas de bananeira (*Musa* spp.) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura. **Tese Doutorado**. Recife, PE, Universidade Federal de Pernambuco. 2010. 172p.
- BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n.2, p.79-83, 2001.
- BESPALHOK, J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Noções de Genética Quantitativa. In: BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Acesso em 09 de dezembro de 2019. Disponível em www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo (2007).

BRIDGE, P.D.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J.M. Molecular variability of fungal pathogens. Wallingford: **CAB International**, 1998. 350p.

CAI, L.; et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, 2009.

CAMELE, I. et al. First Report of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose in *Feijoa sellowiana* in Italy. **Plant disease**, v. 102, n. 9, p. 1850-1850, 2018.

CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.

CARDOSO, J. H. **Cultivo e conservação da feijoa: uma homenagem a um agricultor guardião**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

CARRIÓN, Víctor J. et al. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, v. 366, n. 6465, p. 606-612, 2019.

CLARIDGE, K., FRANKLIN, S.B. Compensation and Plasticity in an Invasive Plant Species. **Biological Invasions** 4, 339–347 (2002) doi:10.1023/A:1023671006342.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: MMA; 2011. p. 111-130.

DAMM, U., CANNON, P.F, WOUDEBERG, J.H.C., JOHNSTON, P.R., WEIR, B.S., Tan, Y.P., SHIVAS, R.G., CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1–36, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 29-59, 2013.

DAWES, S.N.; PRINGLE, G.J. Subtropical fruits from south and Central America. In: WRATT, G. S.; SMITH, H. C. (Org.). **Plant breeding in New Zealand**. New Zealand: Ed. Butterworths of New Zealand in association with DSIR, 1983. p. 123-138.

DONAZZOLO, J.; et al. On farm management of *Acca sellowiana* (Myrtaceae) as a strategy for conservation of species genetic diversity. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108826, 2020.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Série frutas nativas 5. Jaboticabal: Funep, 2000, 66p.

DUCROQUET, J.P.H.J.; SANTOS, K.L.; ANDRADE, E.R.; BONETI, J.I.S.; BONIN, V.; NODARI, R.O. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n.1, p. 77-80, 2007.

DUCROQUET, J.P.H.J., NUNES, E.C., GUERRA, M.P., NODARI, R.O. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. **Agropecuária Catarinense**, 2008, v. 21, p.79-82.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - Epagri. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2013-2014** [internet]. Florianópolis, SC: Epagri/Cepa, 2014. [acesso em 28 nov 2019]. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1-GtOEaq4sfcqZHSotTWKtsERjPsrDm0D/view>

FANTINEL, V. S., MUNIZ, M. F. B., BLUME, E., ARAÚJO, M. M., POLETTO, T., da Silva, T. T., HARAKAVA, R. (2017). First Report of *Colletotrichum siamense* Causing Anthracnose on *Acca sellowiana* Fruits in Brazil. **Plant Disease**, 101(6), 1035-1035.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E.. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C.G.; SANTOS, A. F. dos. **Estratégias de manejo de doenças em viveiros florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. (Circular técnica, 47).

HYDE, K.D., CAI, L., MCKENZIE, E.H.C., YANG, Y.L., ZHANG, J.Z., PRIHASTUTI, H. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity** 39: 1-17.

LARDNER, R.; et al. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Mycol. Res.** 103:275-285, 1999.

LOPES, M.E. et al. **Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret, 2013.**

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

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas**. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia brasileira**, 27 (suplemento): 23, 2002.

MICHEREFF, S.J. **Fundamentos da Fitopatologia**. Recife: Universitária, 2001. 144p.

O'CONNELL, R. J.; et. al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9. 1060-1067, 2012.

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

SANTOS, K. L. Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie. 2009. 163f. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2009.

SANTOS, K.L. et al. *Acca sellowiana*. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília, MMA, cap.5, p. 111-130, 2011.

SHARMA, G., SHENOY, B.D. 2013. Multigene sequence-based identification of *Colletotrichum cymbidiicola*, *C. karstii* and *C. phyllanthi* from India. **Czech Mycology** 65(1): 79–88.

SOUTO, E.R.; TESSMAN, D. J.; NUNES, W. N. C. Métodos de PCR aplicados à Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 22-46, 2000.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 1980.

THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT E FOOD RESEARCH. FreshFacts. **Plant & Food Research**. 2015. 21 p.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. Isolates from solanaceous crops. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

UDAYANGA, D.; MANAMGODA, D. S.; LIU, X.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 165-179, 2013.

VALLE, T.L. Coleta de germoplasma de plantas cultivadas. In: AMOROZO, M.C.M.; MING, L.C.; SILVA, S.P. **Métodos de coleta e análise de dados em Etnobiologia, ernoecologia e disciplinas correlatas**. Rio Claro: UNESP, p. 129-154, 2002.

WEIR, B.S., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology** 73: 115–180.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ANEXO A - GÊNEROS FÚNGICOS ASSOCIADOS À FLORES DE GOIABEIRA-SERRANA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE FLORESCIMENTO ORIUNDAS DOS MUNICÍPIOS DE LAGES (SC) E SÃO JOAQUIM (SC), SUBMETIDAS AO TESTE DE SANIDADE ATRAVÉS DO MÉTODO DE “BLOTTER TEST”

Quadro 1 – Gêneros fúngicos associados às flores de goiabeira-serrana em diferentes estágios de florescimento oriundas dos municípios de Lages (SC) e São Joaquim (SC), submetidas ao teste de sanidade através do método de “Blotter Test”.

(continua)

Estágios de Florescimento	Incidência Fúngica							
	Lages				São Joaquim			
	Helena	Mattos	Nonante	Alcântara	Helena	Mattos	Nonante	Alcântara
B	<i>Pestalotiopsis, Cladosporium, Gonatobotrys, Fusarium, Epicoccum, Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Myrothecium</i>	<i>Botrytis, Cladosporium, Aspergillus, Epicoccum, Phoma, Alternaria, Pestalotiopsis, Fusarium, Fusicoccum, Aspergillus</i>	<i>Botrytis, Aspergillus, Pestalotiopsis, Epicoccum, Cladosporium, Alternaria, Penicillium, Fusarium, Fusicoccum, Phomopsis, Phoma, Verticillium</i>	<i>Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Pestalotiopsis, Aspergillus, Myrothecium, Aspergillus, Epicoccum, Botrytis</i>	<i>Fusarium, Alternaria, Cladosporium, Pestalotiopsis, Epicoccum</i>	<i>Fusarium, Cladosporium, Pestalotiopsis</i>	<i>Fusarium, Penicillium, Alternaria, Pestalotiopsis, Epicoccum</i>	<i>Fusarium, Pestalotiopsis, Alternaria, Curvularia</i>
E	<i>Fusarium, Pestalotiopsis, Botrytis, Cladosporium, Trichoderma, Epicoccum</i>	<i>Botrytis, Pestalotiopsis, Cladosporium, Fusarium, Alternaria, Epicoccum</i>	<i>Cladosporium, Fusarium, Pestalotiopsis, Penicillium, Epicoccum, Alternaria, Verticillium, Botrytis, Aspergillus, Phomopsis, Fusicoccum</i>	<i>Pestalotiopsis, Fusarium, Cladosporium, Alternaria, Curvularia, Aspergillus, Botrytis, Epicoccum</i>	<i>Fusarium, Pestalotiopsis, Alternaria, Cladosporium, Curvularia, Rhizoctonia</i>	<i>Fusarium, Epicoccum, Cladosporium, Pestalotiopsis</i>	<i>Fusarium, Epicoccum, Cladosporium, Pestalotiopsis, Alternaria, Penicillium</i>	<i>Penicillium, Pestalotiopsis, Fusarium, Epicoccum, Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Verticillium</i>

(conclusão)

F₂	<i>Botrytis, Pestalotiopsis, Epicoccum, Alternaria, Penicillium, Cladosporium, Fusarium, Myrothecium, Penicillium, Phomopsis, Curvularia, Drechslera</i>	<i>Pestalotiopsis, Alternaria, Epicoccum, Botrytis, Fusarium, Alternaria, Trichothecium, Curvularia, Aspergillus</i>	<i>Epicoccum, Phaeophleospora, Cladosporium, Pestalotiopsis, Fusarium, Botrytis, Alternaria, Penicillium, Aspergillus, Phomopsis</i>	<i>Botrytis, Pestalotiopsis, Fusarium, Phomopsis, Alternaria, Aspergillus, Epicoccum, Myrothecium, Cladosporium, Penicillium, Phoma, Verticillium</i>	<i>Fusarium, Pestalotiopsis, Penicillium, Phoma, Verticillium, Botrytis, Curvularia, Cladosporium, Alternaria, Epicoccum, Gliocladium</i>	<i>Botrytis, Pestalotiopsis, Fusarium, Phomopsis, Alternaria, Aspergillus, Epicoccum, Cladosporium, Penicillium, Verticillium</i>	<i>Botrytis, Pestalotiopsis, Epicoccum, Fusarium, Alternaria, Verticillium, Cladosporium, Curvularia, Phoma, Trichothecium, Myrothecium, Aspergillus, Gliocladium, Rhizoctonia, Penicillium</i>	<i>Fusarium, Aspergillus, Cladosporium, Epicoccum, Botrytis, Drechslera, Phomopsis, Rhizopus, Curvularia, Stigmina</i>
H	<i>Phomopsis, Pestalotiopsis, Fusarium, Aspergillus, Botrytis, Epicoccum, Alternaria, Cladosporium, Phoma</i>	<i>Cladosporium, Fusarium, Phoma, Pestalotiopsis, Alternaria, Botrytis, Epicoccum</i>	<i>Fusarium, Pestalotiopsis, Botrytis, Verticillium, Cladosporium, Penicillium, Myrothecium, Epicoccum, Trichoderma, Aspergillus, Alternaria</i>	<i>Fusarium, Epicoccum, Cladosporium, Pestalotiopsis, Phomopsis, Botrytis, Aspergillus, Myrothecium, Rhizoctonia</i>	<i>Botrytis, Fusarium, Epicoccum, Pestalotiopsis, Rhizoctonia, Phomopsis, Cladosporium, Penicillium, Alternaria, Verticillium</i>	<i>Pestalotiopsis, Botrytis, Verticillium, Cladosporium, Penicillium</i>	<i>Verticillium, Fusarium, Pestalotiopsis, Phoma, Botrytis, Aspergillus, Epicoccum, Alternaria</i>	<i>Fusarium, Aspergillus, Cladosporium, Epicoccum, Alternaria, Botrytis</i>

Fonte: Autor.

ANEXO B – COLETA DE FRUTOS SINTOMÁTICOS DE GOIABA-SERRANA



Fonte: Autor.