

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

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Emilia Rabuske

**Santa Maria, RS, Brasil.
2016**

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

Jéssica Emilia Rabuske

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Proteção Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal.**

Orientadora: Marlove Fatima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil

2016

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

Emilia Rabuske, Jéssica

Colletotrichum sp. causando mancha foliar em Cassia fistula L.: patogenicidade, morfologia, caracterização molecular e controle in vitro / Jéssica Emilia Rabuske.- 2016.

93 p.; 30cm

Orientadora: Marlove Brião Muniz

Coorientador: Maristela Machado Araújo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2016

1. Fitopatologia I. Brião Muniz, Marlove II. Machado Araújo, Maristela III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado**

***Colletotrichum* sp. CAUSANDO MANCHA FOLIAR EM *Cassia fistula* L.:
PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E CONTROLE *IN VITRO***

elaborada por
Jéssica Emilia Rabuske

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Marlove Fátima Brião Muniz
(Presidente/Orientador)**

Igor Poletto (UNIPAMPA)

Lia Rejane Silveira Reiniger (UFSM)

Santa Maria, 25 de Fevereiro de 2016.

*Aos meus amados e adorados pais, Maria e Danilo pelo apoio,
A minha irmã, meu cunhado e sobrinhos por serem as alegrias dos dias difíceis.
E ao meu namorado pelo seu amor.*

Dedico-lhes esse trabalho.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Santa Maria que, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, possibilitou a realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, pela oportunidade e orientação prestada.

À Professora Maristela Araújo, pela co-orientação e disponibilidade sempre que solicitada.

À banca examinadora, constituída pela Prof^a. Lia Rejane Silveira Reinigere pelo Prof^o. Igor Poletto.

Ao meu namorado, Thiarles Brun, pelo amor, paciência, compreensão e por ser meu porto seguro.

Aos meus pais Maria Rohsmann Rabuske, Danilo José Rabuske pelo amor, carinho, atenção e ajuda durante toda minha vida.

À minha irmã Aline Maria Rabuske, pela amizade, cumplicidade e conselhos dados.

Ao meu cunhado Alvandir dos Passos Priebe e aos meus afilhados Eduardo Rabuske Priebe e Lorenzo Priebe, pelas brincadeiras, convivência e amizade.

À família do meu namorado pelo apoio.

Aos colegas Clair Walker e Tales Poletto pelos ensinamentos das metodologias em Fitopatologia.

À colega Caciara Maciel, pelo auxílio prestado nas correções da dissertação.

Aos demais colegas do laboratório de Fitopatologia: Ricardo Mezzomo, Jéssica Rolim, Victoria Rosenthal, Rosa Michelon, Pâmela Oruoski, Geísa Finger, Daniele Brum, Emanuele Junges, Leíse Hekcler, Camila Maydana, Felipe Vedovatto, Adriana Dutra, pela convivência e amizade durante o período de mestrado.

Aos meus amigos que próximos ou distantes geograficamente sempre deram apoio a minha formação profissional e pessoal.

À toda minha grande família, tios, tias, primos e primas.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

Universidade Federal de Santa Maria

Colletotrichum* sp. CAUSANDO MANCHA FOLIAR EM *Cassia fistula* L.: PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CONTROLE *IN VITRO

AUTORA: JÉSSICA EMILIA RABUSKE

ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

SANTA MARIA, 25 DE FEVEREIRO DE 2016

A espécie *Cassia fistula* L., conhecida popularmente como chuva-de-ouro, é uma arboreta exótica, utilizada para fins de arborização urbana, porém, apesar do seu valor ornamental, a espécie não tem sido objeto de pesquisa, principalmente os relacionados à diagnose ou descrição de microrganismos fitopatogênicos, que podem causar prejuízos e/ou levar a planta a morte. Anualmente, tem sido observados sintomas de manchas foliares com coloração escura e contorno irregular distribuídas pelo limbo foliar na espécie *Cassia fistula*, estas manchas ainda não possuem um diagnóstico conhecido e após verificações prévias essas manchas foram associadas ao gênero *Colletotrichum*. O presente trabalho teve como objetivo verificar a patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associado a folíolos de *Cassia fistula* e caracterizar morfológica, fisiológica e molecularmente o patógeno em nível de espécie, bem como, estudar a eficiência *in vitro* do controle biológico de produtos comerciais a base de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum*. O patógeno, ainda não relatado foi descrito morfológicamente através do tamanho dos conídios, pela coloração da colônia em BDA (Batata-Dextrose-Ágar), e para a caracterização fisiológica, testaram-se diferentes temperaturas, influencia do meio de cultura e da luminosidade no crescimento micelial do patógeno, e para a identificação molecular, foram sequenciadas três regiões genômicas do isolado, sendo elas: ITS, fator de alongação 1- α e beta-tubulina. Nos testes de controle biológico utilizou-se *Trichoderma* spp. nas formas comerciais Agrotich Plus[®], Biotrich[®] e Ecotrich[®]. Os testes de controle *in vitro* foram realizados pelo método de confronto pareado de culturas e pelo teste de metabólitos voláteis. Os isolados de *Colletotrichum* sp. foram patogênicos à *Cassia fistula* causando mancha foliar. Em geral, o meio Mathur apresentou melhores respostas de crescimento micelial e esporulação, porém os testes apresentaram variação entre os isolados analisados. As características morfológicas apresentaram grande variabilidade, inviabilizando a definição de espécie. A maioria dos isolados apresentou conídios com dimensões que permitiram a classificação como *C. gloeosporioides*. A ferramenta PCR foi capaz de identificar isolados da espécie *C. gloeosporioides* a partir do produto amplificado da região beta-tubulina e do fator de alongação. No entanto, nem todos os isolados foram identificados desta maneira, sugerindo que a espécie apresenta grande variabilidade nas regiões amplificadas. *Trichoderma* spp., pode ser utilizado como controle biológico da mancha foliar em *Cassia fistula*. No entanto, sugere-se a realização de testes *in vivo* para avaliar o potencial antagônico de *Trichoderma*.

Palavras-chave: Chuva-de-ouro. *Trichoderma* spp. ITS.

ABSTRACT

Master Thesis

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

Universidade Federal de Santa Maria

Colletotrichum* sp. CAUSING LEAF SPOT IN *Cassia fistula* L. : PATHOGENICITY, MORPHOLOGY, DESCRIPTION MOLECULAR AND CONTROL *IN VITRO

AUTHOR: JÉSSICA EMILIA RABUSKE

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Santa Maria, February 25th, 2016

The species *Cassia fistula* L., popularly known as chuva-de-ouro, is an exotic arboreta, used for the purpose of urban trees, however, despite its ornamental value, the species has not been the subject of research papers, especially those who involving the diagnosis or description of phytopathogenic microorganisms causing diseases which could cause harm and/or lead to plant death. So after observing symptoms of leaf spots with dark coloring and irregular contour, distributed by the leaf blade, the prior identification of the pathogen was made which attributed the symptoms to the fungal genus *Colletotrichum*. Thus, this study aimed to determine the pathogenicity of *Colletotrichum* sp. associated with leaflets of *Cassia fistula* and characterize morphological, physiological and molecular pathogen to the species level, and to verify the efficiency of *in vitro* biological control of the fungus. The morphological characterization was performed based on the size of the conidia and the color of the colony on PDA, and the physiological characterization, tested different temperatures, influences the culture medium and the brightness in the pathogen mycelial growth. Molecular identification were sequenced three genomic regions isolated, which are: ITS, elongation factor 1- α and beta-tubulin. In biological control test was used *Trichoderma* spp. in commercial forms Agrotich Plus[®], Biotrich[®] and Ecotrich[®]. *In vitro* control tests were conducted by paired comparison method of test cultures and the volatile metabolites. The isolates *Colletotrichum* sp. were pathogenic to *Cassia fistula* causing leaf spot. In general, Mathur means contributed best responses mycelial growth and sporulation, but both tests show variation between isolates analyzed. The morphological characteristics present great variability, hindering the definition of the species. Most isolates showed conidia with dimensions that can be classified as *C. gloeosporioides*. The PCR tool was able to identify isolates of *C. gloeosporioides* starting the amplified product of beta-tubulin and the elongation factor region. However, not all isolates were identified in this manner, suggesting that the species has great variability of the amplified regions. *Trichoderma* spp., can be exploited as biological control of leaf spot in *Cassia fistula*. However, it is suggested to carry out *in vivo* tests to evaluate the antagonistic potential of *Trichoderma*.

Key-works: Chuva-de-ouro. *Trichoderma* spp. ITS.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados.....	79
ANEXO 2 - Descrição dos produtos comerciais utilizados.....	80

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Diagnose de doença em plantas	19
2.2 Doenças em espécies florestais	20
2.3 <i>Cassia fistula</i> L.	20
2.4 O gênero <i>Colletotrichum</i> sp. e características fitopatogênicas	20
2.5 Variabilidade genética por sequenciamento do DNA ribossomal de fungos do gênero <i>Colletotrichum</i>	22
2.6 Controle biológico com produtos à base de <i>Trichoderma</i>	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Coleta do material vegetal e isolamento fúngico	26
3.2 Teste de patogenicidade	29
3.2 Dimensão dos esporos e pigmentação da colônia	31
3.2.1 Dimensão dos esporos	31
3.2.2 Pigmentação da colônia	32
3.3 Caracterização molecular dos isolados	32
3.3.1 Amplificação da região ITS do rDNA	32
3.3.2 Sequenciamento da região ITS do rDNA e análise filogenética	33
3.4 Caracterização fisiológica dos isolados	34
3.4.1 Influência da temperatura no crescimento micelial dos isolados	34
3.4.2 Influência do meio de cultura no crescimento micelial e na esporulação dos isolados	35
3.4.3 Influência da luminosidade no crescimento micelial dos isolados	37
3.5 Controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> sp. com <i>Trichoderma</i> sp.	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Teste de patogenicidade	41
4.2 Dimensão dos esporos e coloração da colônia	44
4.2.1 Dimensão dos esporos	45
4.2.2 Pigmentação da colônia	46
4.3 Caracterização fisiológica	49
4.3.1 Influência da temperatura no crescimento micelial dos isolados	49
4.3.2 Influência do meio de cultura no crescimento micelial e na esporulação dos isolados	53

4.3.3	Influência da luminosidade no crescimento micelial dos isolados.....	55
4.4	Caracterização molecular dos isolados	56
4.5	Controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> sp. com <i>Trichoderma</i> sp.....	70
5	CONCLUSÕES.....	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação e procedência dos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. obtidos de lesões em folíolos de <i>Cassia fistula</i> com sintomas de mancha foliar.	29
Tabela 2 - Critérios de avaliação dos sintomas causados por <i>Colletotrichum</i> sp. em folíolos de <i>Cassia fistula</i> inoculados com suspensão de esporos.	31
Tabela 3 - Severidade dos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp., em folíolos de <i>Cassia fistula</i> com ferimento (CF) e sem ferimento (SF) em diferentes períodos de avaliação (dias).	43
Tabela 4 - Comprimento e largura de conídios de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. cultivados em meio BDA durante sete dias, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25±2°C.	45
Tabela 5 - Variabilidade de cores dos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. isolados de <i>Cassia fistula</i> , observados em meio BDA, aos 7 dias de cultivo.	47
Tabela 6 - Valores de coeficientes e de R ² , para a temperatura de 20°C.	51
Tabela 7 - Valores de coeficientes e de R ² , para a temperatura de 25°C.	52
Tabela 8 - Valores de coeficientes e de R ² , para a temperatura de 30°C.	52
Tabela 9 - Crescimento micelial médio (cm) em função dos diferentes isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. em diferentes meios de cultura.	53
Tabela 10 – Médias de Índice de crescimento micelial (IVCM) em cm, em função da interação entre os isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. e os diferentes meios de cultura.	54
Tabela 11 - Esporulação de quatro isolados de <i>Colletotrichum</i> , em função de diferentes meios de cultura.	55
Tabela 12 – Médias de taxa de crescimento micelial em cm, em função da interação entre os isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. e os regimes luminosos.	56
Tabela 13 – Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região ITS.	58
Tabela 14 - Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região beta-tubulina.	60
Tabela 15 - Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma do fator de alongação.	61
Tabela 16 – Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região ITS.	63

Tabela 17 – Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região beta tubulina para o isolado PLAN.	64
Tabela 18 – Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referências utilizadas para a construção do dendrograma da região do fator de alongação para o isolado PLAN.	65
Tabela 19 – Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região ITS do isolado NC.....	67
Tabela 20 – Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região da calmodulina para o isolado NC.	68
Tabela 21 – Espécie de <i>Colletotrichum</i> , acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região da beta tubulina para o isolado NC.	69
Tabela 22 – Redução de crescimento micelial (%) de <i>Colletotrichum</i> sp. por produtos comerciais a base de <i>Trichoderma</i> spp.....	71
Tabela 23 - Efeitos dos metabólitos voláteis (% de redução do crescimento micelial) produzidos pelos produtos a base de <i>Trichoderma</i> sobre o crescimento micelial do fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> sp. do segundo ao sétimo dia de cultivo.....	73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Municípios de coleta de isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. em árvores de <i>Cassia fistula</i> (Fonte: Google Earth), 2016.....	26
Figura 2 - Diferentes indivíduos de <i>Cassia fistula</i> locais onde foram realizadas coletas de material vegetal para posterior isolamento do patógeno. Municípios de: A) Palmitinho. B) Alpestre. C) Santa Maria.	27
Figura 3 - A) Folíolo de <i>Cassia fistula</i> com sintoma característico de mancha foliar. B) Mancha foliar observada com auxílio de lupa. C) Formação de massa conidial de coloração alaranjada. D) Conídios de <i>Colletotrichum</i> sp. em microscópio no aumento de 40x.	27
Figura 4 - Folíolos de <i>Cassia fistula</i> utilizados para o teste de patogenicidade com <i>Colletotrichum</i> sp., contendo o inóculo (100 µL), disposto em seis gotas sobre o limbo foliar, neste caso os folíolos não apresentavam ferimentos.	30
Figura 5 - Representação da escala de notas para avaliação do teste de confronto direto, conforme Bell et al. (1982).....	39
Figura 6 - Sobreposição das placas contendo o patógeno e o antagonista, unidas lateralmente por Parafilme.	40
Figura 7–Sintomas observados após a inoculação de <i>Colletotrichum</i> sp. nos folíolos de <i>Cassia fistula</i> , nos diferentes dias após a inoculação. A) terceiro dia; B) quarto dia; C) oitavo dia; D) décimo dia; e E) décimo segundo dia.	42
Figura 8 – Teste de patogenicidade em folíolos destacados de <i>Cassia fistula</i> com o fungo <i>Colletotrichum</i> sp. mostrando a evolução da lesão em lupa, com a presença de sinais do patógeno. A) Detalhe do sintoma inicial. B) Evolução das lesões mostrando os sinais do patógeno. C) Esporulação sobre o folíolo com formação de massa conidial de coloração alaranjada.....	42
Figura 9 - Aspectos das colônias de <i>Colletotrichum</i> sp. em meio BDA, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h.	48
Figura 10 - Crescimento micelial de 12 isolados de <i>Colletotrichum</i> sp., ao longo de sete dias, em diferentes.....	51
Figura 11 - Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre 14 isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. O dendrograma foi construído através da técnica de análise de conglomerados, a partir da matriz Euclidiana, com quatro características morfológicas.....	57

Figura 13 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região ITS do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	59
Figura 14 - Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região beta tubulina do rDNA do isolado de <i>Collatotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	60
Figura 15– Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região fator de alongação do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	62
Figura 16 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região ITS do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	63
Figura 17- Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região beta tubulina do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	65
Figura 18– Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região fator de alongação do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	66
Figura 19 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região ITS do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado	

<i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	68
Figura 20– Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região da calmodulina do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium subglutinans</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.	68
Figura 21 - Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região beta tubulina do rDNA do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp. coletado de <i>Cassia fistula</i> comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado <i>Fusarium decemcellulare</i> obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições	69

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Cassia fistula* L., conhecida popularmente como chuva-de-ouro é uma arboreta exótica, utilizada para fins de arborização urbana e apesar do seu valor ornamental e seu largo emprego, ainda não são encontrados estudos que tratem de diagnose de doenças para a espécie. Contudo, esta espécie é suscetível a doenças, devido, principalmente, ao ambiente em que normalmente esta inserida. Anualmente, tem-se observado manchas foliares de coloração escura de contorno irregular e queda de folhas em árvores pertencentes à arborização urbana em diversos municípios do Rio Grande do Sul, estas manchas por suas características podem ser causadas por patógenos fúngicos do gênero *Colletotrichum*.

Espécies do gênero *Colletotrichum* têm sido identificadas causando mancha foliar em espécies florestais no Brasil, como em canela-da-índia (*Cinnamomum zeylanicum*) (COSTA et al., 2013 a) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) (COSTA et al., 2013b). Nestas espécies a mancha foliar pode evoluir causando a abscisão das folhas, sintomas semelhantes a estes também podem ser observados na espécie *Cassia fistula* L.

As doenças causadas por patógenos do gênero *Colletotrichum* em diferentes hospedeiros ocorrem com maior severidade em climas com temperatura amena a alta e em épocas com alta taxa pluviométrica. Com as condições ideais de ambiente, e quando não há um manejo adequado, as doenças causadas pelas espécies do gênero podem provocar grandes prejuízos.

Considerando-de às inúmeras diferenças entre as espécies de *Colletotrichum* é importante identificar, além do gênero causador da doença, a espécie vinculada à mancha foliar em um hospedeiro específico (CANNON; BRIDGE e MONTE, 2000). A alta variabilidade das características culturais e da patogenicidade, vem causando o aumento do número de espécies de *Colletotrichum* conhecidas.

Sutton (1992) num primeiro estudo propôs a existência de 22 espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, mas posteriormente em um levantamento realizado pelo mesmo autor, esse número foi atualizado para 39 espécies diferentes. Porém, esses estudos foram baseados em métodos tradicionais, os quais são considerados insuficientes atualmente para a caracterização em nível de espécie, pois sabe-se que as espécies do gênero *Colletotrichum* apresentam alta variabilidade fenotípica.

A análise morfológica, através da cor da colônia, tamanho do conídio, entre outras características, juntamente com o conhecimento sobre a análise molecular e a fisiologia do patógeno podem auxiliar na identificação de possíveis subespécies, biótipos ou as raças que fazem parte do complexo *Colletotrichum* (DAMM et al., 2009). Conforme Cai et al. (2009), a grande variabilidade morfológica observada no gênero *Colletotrichum*, mostra que a análise de sequências de ácidos nucleicos é a forma mais confiável para a classificação de espécies deste gênero (CROUCH et al., 2009; SATO et al., 2009). Segundo Tozze et al. (2006), a classificação em nível de espécie é de extrema importância, pois através desta pode-se estabelecer o método de controle mais adequado para se utilizar em determinada situação, neste sentido, atualmente, os métodos de controle mais empregados e estudados são: o químico e o biológico.

O controle da maior parte das doenças em plantas ainda é realizado com fungicidas. A utilização destes acarreta em efeitos imediatos, que controlam mais rapidamente a doença (COOPER e DOBSON, 2007). Porém, de acordo com Soylu; Kurt e Soylu (2010) a utilização contínua e indiscriminado do controle químico, acarreta em problemas ambientais como o surgimento de patógenos resistentes e a interrupção do controle biológico natural das doenças. Em longo prazo, os problemas citados podem ocasionar surtos de doenças e favorecer a manifestação de pragas secundárias (DINIZ et al., 2008; LEE et al., 2008).

Além disso, ainda não há registro de fungicidas para espécies florestais empregados na arborização urbana no Brasil, tornando-se, assim, essencial a busca por alternativas de controle para as doenças causadas por fungos. Nesse sentido, no contexto atual tem sido amplamente discutido o controle biológico de doenças, sendo que o gênero fúngico *Trichoderma* é o microrganismo mais estudado e citado na literatura.

Segundo Menezes (2002), *Trichoderma* é um fungo de solo e tem grande importância ecológica, pois participa da decomposição da matéria orgânica e mineralização de resíduos, disponibilizando nutrientes para as plantas. Além disso, possui a função de ser antagonista natural contra fitopatógenos. *Trichoderma* spp. é um antagonista muito eficiente contra diversos fungos e apresenta várias formas de ação, sendo que os três mecanismos básicos são: parasitismo, antibiose e competição, que ocorrem de maneira isolada ou conjunta.

Contudo, antes da utilização massiva do controle biológico é importante fazer testes preventivos com controle total das condições ambientais *in vitro*, para posteriormente testar essas alternativas em condições de viveiro, ou seja, *in vivo*. Reis (2014), iniciou seus estudos com testes *in vitro*, pois estes demandam menos tempo e espaço e implicam em menor

despesa para as pesquisas; os tratamentos com maior eficiência foram, posteriormente, testados em testes *in vivo* em casa de vegetação.

Diante do exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi identificar e caracterizar o agente causal da mancha foliar em *Cassia fistula* e avaliar a eficiência do controle biológico *in vitro*. E como objetivos específicos estabeleceram-se: a) Coletar e identificar o agente patogênico a *Cassia fistula* procedentes de diferentes locais do Rio Grande do Sul; b) avaliar a patogenicidade dos isolados coletados; c) caracterizar morfofisiologicamente os isolados; e) avaliar as regiões do genoma mais eficientes para identificar os isolados em nível de espécie. f) verificar a eficiência do controle biológico *in vitro* com *Trichoderma* spp. para o controle do patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diagnose de doença em plantas

Normalmente as doenças em plantas são diagnosticadas através dos sintomas que elas causam e pelo sinal do patógeno observado no hospedeiro, visto que é comum haver a descrição da sintomatologia das doenças para as plantas cultivadas, facilitando o diagnóstico correto da doença. No entanto, para outras espécies de plantas ainda não existem tais informações tornando necessário o estudo das doenças que ocorrem nestas plantas em particular (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM,1995).

Para ser possível descrever uma nova doença é necessário que a relação entre patógeno e hospedeiro seja confirmada através o comprimento de etapas, denominadas de postulados de Koch. Os enunciados deste postulado são: Associação constante patógeno-hospedeiro: deve ser possível associar determinado sintoma na planta a determinada espécie de organismo específico. Isolamento do patógeno: o patógeno deve ser isolado do tecido com sintoma e ser reproduzido em culturas puras, para tanto deve-se separar o patógeno dos microorganismo saprofíticos através de técnicas que favoreçam o desenvolvimento do primeiro em detrimento do segundo. Para obter sucesso no isolamento do patógeno o ideal é que se escolham regiões limítrofes entre o tecido sadio e o tecido com sintoma, pois é nestas regiões que o patógeno se encontra em maior atividade, posteriormente essa amostra deve ser desinfestada superficialmente com hipoclorito de sódio e colocado para um período de incubação. Após desenvolvimento das estruturas de reprodução do patógeno ele deve ser transferido para um meio de cultura que favoreça o desenvolvimento do mesmo. Inoculação do patógeno e reprodução dos sintomas: a cultura pura do patógeno deve ser inoculada em tecido sadio da planta e provocar os mesmos sintomas inicialmente observados, para tanto é imprescindível que as condições ambientais sejam favoráveis à infecção. Reisolamento do patógeno: Após o reaparecimento dos sintomas ocasionado pela inoculação artificial do organismo deve ser possível o reisolamento dele. Quando todas as etapas descritas anteriormente são cumpridas pode-se concluir que determinado microrganismo é o agente causal da doença em uma espécie de planta específica (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM,1995).

2.2 Doenças em espécies florestais

Ao longo do tempo, as doenças em espécies florestais foram negligenciadas, mas não por sua inexistência, pois se sabe que elas já causam prejuízos a muito tempo, como a diminuição na produtividade de plantios comerciais (AUER e GRIGOLETTI JUNIOR, 2015), a queda prematura de folhas em espécies de arborização urbana, e, em muitos casos, até a morte da planta (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM,1995). As doenças registradas em espécies florestais têm sido provocadas principalmente por fungos (AUER; GRIGOLETTI JUNIOR, 2015), embora sejam verificados relatos de doenças causadas por bactérias e vírus e, frequentemente, são relatadas novas doenças.

A complexidade e a heterogeneidade de locais em que as espécies florestais estão inseridas torna a resolução dos problemas fitossanitários de difícil solução. Com a globalização, ainda houve um aumento na entrada de novos organismos patogênicos em diferentes ecossistemas e, acredita-se que até os fenômenos ambientais podem estar influenciando no agravamento dos problemas fitossanitários em espécies florestais (BRAGANÇA et al., 2007).

O controle de fitopatógenos em espécies florestais é de difícil execução e apresenta alta complexidade, pois além da inexistência de produtos químicos legalizados no Brasil para o controle de doenças de plantas da arborização urbana, a sua utilização é cada vez mais criticada e desaconselhada, devido aos possíveis danos ambientais que estes podem causar. Além disso, o controle de doenças em espécies florestais é um processo multidisciplinar, que necessita de diagnóstico correto, além de conhecimento da biologia dos organismos patogênicos e sobre as operações culturais realizadas que possam amenizar o stress da planta ou que diminuam a dispersão do inóculo do fitopatógeno (BRAGANÇA et al., 2007).

Para entender a associação dos agentes patogênicos nas ocorrências de doenças em espécies florestais, é importante a realização de trabalhos sobre prospecção e diagnóstico, estudos que esclareçam a interação entre patógeno/hospedeiro e estabelecer novos meios de controle. Assim a primeira etapa, e a mais importante para o diagnóstico dos problemas

fitossanitários da arborização urbana é reconhecer os sintomas e os sinais característicos das doenças (ANDRADE, 2002).

2.3 *Cassia fistula* L.

A espécie *Cassia fistula* L., conhecida popularmente como chuva-de-ouro, cana imperial ou canafístula verdadeira, é uma espécie que integra a família *Fabaceae* – *Caesalpinioidea*. Esta arboreta é nativa de áreas tropicais da Ásia e está amplamente distribuída em todas as regiões do Brasil, principalmente no litoral (ROCAS, 2002).

No Brasil, a espécie é utilizada na arborização urbana, paisagismo de ruas, praças e jardins, principalmente devido a sua floração característica amarelo ouro, o que confere a planta aspecto ornamental. O indivíduo da espécie pode chegar aos 15 m de altura e possuir um diâmetro de copa de 4 a 6 m (CORRÊA, 1984).

Em outros países, a espécie também é conhecida devido ao seu valor terapêutico, apresentando efeitos cicatrizantes, antipiréticos, analgésicos e hipoglicemiantes, sendo utilizada para tratamento de hipercolesterolemia (LUXIMON-RAMMA et al., 2002). O fruto é utilizado como laxante moderado para crianças e mulheres grávidas (LUXIMON-RAMMA et al., 2002). A madeira possui o cerne duro, com longa durabilidade, própria para marchetaria, obras de torno, construção naval, rodas, marcenaria de luxo, postes, esteios, cabos de ferramentas e de instrumentos agrícolas, podendo ser utilizada como lenha. A casca é rica em tanino, o qual é empregado no curtimento de peles (LUXIMON-RAMMA et al., 2002).

A polpa albuminosa do fruto é de grande importância, pois pode ser utilizada como tempero, o qual é muito apreciado no preparo de certos tabacos orientais, sendo utilizada também em confeitarias e sorvetes. Na Índia, as flores são consideradas comestíveis, além de serem utilizadas na apicultura (ORWA et al., 2009). Há relatos que os galhos novos são aceitos como forragem pelo gado em época de escassez de alimento (SANTOS, 1987).

2.4 O gênero *Colletotrichum* sp. e características fitopatogênicas

O gênero *Colletotrichum* sp. engloba fungos anamórficos ou imperfeitos pertencentes à ordem *Melanconiales*, classe *Coelomycetes*, inclui espécimes saprófitas, endofíticas e fitopatogênicas que apresentam associação teleomórfica com estirpes homotáticas ou heterotáticas de ascomicetos do gênero *Glomerella* (PRIHASTUTI et al., 2009a). Os conídios são liberados dos acérvulos através de uma massa viscosa gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2002).

Em condições de laboratório quando o fungo é isolado, a coloração das colônias é muito variável, variando de cores com aspecto branco, passando a acinzentadas, esverdeadas chegando ao salmão (CANNON; BRIDGE e MONTE, 2000, WEIR; JOHNSTON e DAMM, 2012). Os fungos do gênero caracterizam-se por apresentarem micélio hialino, septado, formando acérvulos no tecido do hospedeiro (SOUSA et al., 2009).

O gênero *Colletotrichum* produz conidióforo curto e agrupado, formando acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, dispostos em círculos, com presença de setas em algumas espécies. Os conídios são hialinos unicelulares apresentando a forma que varia de ovalados a oblongos, com parede fina e delgada (SOUSA et al., 2009). Os conídios variam em tamanho e forma dependendo da espécie em questão; por exemplo, em *C.gloeosporioides*, são uninucleados, apresentam comprimento que varia de 12-19 μm e uma largura de 1-6 μm , arredondados nas extremidades e levemente curvos (WANG et al., 2010) já para *Colletotrichum acutatum*, segundo Sutton (1992), a média dos conídios encontra-se em um intervalo de 8,5 - 16,5 μm de comprimento e 2,5 – 4 μm de largura.

Os fungos desse gênero acometem os mais diversos hospedeiros, dentre eles estão as culturas agrícolas, frutíferas, plantas medicinais, árvores silvestres e espécies empregadas na arborização urbana. Nos hospedeiros, *Colletotrichum* spp. causa diversos sintomas, dentre os quais estão as manchas foliares, as podridões (colmo caules e frutos), seca de ponteiros, infecções latentes e antracnoses (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

Apesar dos vários estudos já apresentados, as interações entre espécies de *Colletotrichum* e seus hospedeiros precisam de mais pesquisas, pois a interação patógeno-hospedeiro é complexa, já que algumas espécies possuem uma pequena gama de hospedeiros ou estão associados a um hospedeiro específico, mas em muitos casos uma espécie do patógeno pode estar associada a diversas espécies de plantas. Em alguns casos também ocorre de um hospedeiro poder ser afetado por diferentes espécies do patógeno (FREEMAN; KATAN e SHABI, 1998; HYDE et al, 2009). Por exemplo, *C. siamense*, *C.*

fructicola, *C. nymphaeae* são espécies com ampla gama de hospedeiros afetando diversas culturas (PRIHASTUTI et al., 2009b).

Conforme Pereira et al. (2009), o gênero *Colletotrichum* possui uma distribuição geográfica ampla, porém este patógeno prefere climas quentes e úmidos, principalmente nas regiões dos trópicos. Devido à alta incidência de *Colletotrichum* em países com predominância de clima tropical, os prejuízos são maiores nestes locais, resultando em redução na quantidade e qualidade dos produtos, além de causar aumento nos custos de produção (LÓPEZ, 2001).

As formas mais comuns de dispersão dos conídios são: chuva, vento, insetos, ferramentas, etc, porém para que ocorra a liberação e disseminação dos conídios, é necessário que o acérvulo esteja úmido (DAMM et al., 2009). Menezes (2002) destaca que, para que haja germinação dos conídios é imprescindível água livre ou umidade relativa do ar muito elevada em torno de 100% de Umidade Relativa do Ar.

Quando se inicia o processo de infecção, o apressório se adere à superfície do hospedeiro formando uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas que crescem rapidamente no tecido do hospedeiro e, por fim, o patógeno coloniza todo o tecido (MENEZES, 2002). Os conídios são disseminados durante todo o ano e o micélio pode permanecer viável por um longo período, infectando os mais diversos tecidos, como: sementes, restos de cultura, como também na planta causando infecções latentes, sendo que, neste período, a planta permanece assintomática (RIBEIRO, 1997).

2.5 Variabilidade genética por sequenciamento do DNA ribossomal de fungos do gênero *Colletotrichum*

Nas últimas décadas, o uso das técnicas de identificação via análise molecular, tornou-se essencial para a classificação taxonômica em nível de espécie no gênero *Colletotrichum*, e é através destes estudos que foi possível a identificação de novas espécies (HIBBETT et al., 2007).

O sequenciamento de diferentes regiões do DNA é uma das maiores evoluções para identificação de espécies e para o gênero *Colletotrichum* mostrou-se muito eficiente, até mesmo nos casos em que a caracterização morfológica falhou, tornando-se, assim, a forma mais confiável de classificação para o gênero (ROJAS et al., 2010). Este método começou a

ser utilizado mais frequentemente aliando sempre novos genes utilizados na identificação, como também novas regiões do DNA (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Contudo, cabe salientar que a caracterização morfológica ainda é extremamente importante como complementação da análise molecular (SHIVAS; TAN, 2009; DAMM et al., 2012).

Os ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA) são distribuídos em todos os seres vivos sendo consideradas as moléculas com maior grau de conservação existente (JUNIOR et al., 2002). O DNA ribossomal é uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5,8S e 28S) e duas regiões conhecidas como espaçadoras (ITS). As regiões ITS1 e ITS2 são encontrados entre as subunidades, sendo que a pequena (18S) e a grande (28S) do ribossomo, aquela em que existe variabilidade intra-específica e a região gênica 5,8S que se encontra entre o ITS1 e o ITS2 (SHEN; GOODWIN; HSIANG, 2001).

A região do DNA conhecida como ITS é a que possui o maior número de sequências depositadas no GenBank, por isso é considerada de grande importância para a identificação em nível de espécie ou para alocar determinado isolado em algum dos complexos de espécie conhecidos (CAI et al., 2009). Esta região é considerada relativamente curta (500-800 pb) e se repete várias vezes no genoma, e com auxílio de certos softwares é possível fazer a comparação destas sequências auxiliando, assim, a análise filogenética (SCHOCH et al., 2012).

No entanto, somente com a análise da região ITS, muitas vezes não é possível determinar em nível de espécie qual é o patógeno que causa determinada enfermidade e, nestes casos, devem-se amplificar outras regiões do DNA. Para *Colletotrichum*, em conjunto com a região ITS, também podem-se amplificar outras regiões do genoma como: β -tubulina, Calmodulina, fator de alongação e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (PRIHASTUTI et al., 2009 a).

Conforme Geiser et al. (2004), a utilização do fator de alongação (representada também por TEF-1 ou 1 - alpha) se tornou usual para identificação de espécies fúngicas, pois o gene que o codifica é de cópia única, altamente informativo sobre espécies relacionadas. A região do fator de alongação é altamente conservada e esta envolvida na tradução e atualmente vem sendo utilizada para estudos sobre variação intra e interespecífica, como também para análises sobre a filogenia de vários grupos eucariotos (O'DONNELL et al., 1998). Segundo Van't Klooster et al. (2000), os genes que codificam o fator de alongação estão presentes em todas as fases de desenvolvimento e devido a esta conservação nucleotídica estes são utilizados em análises filogenéticas.

Outra região que é muito utilizada para a identificação dos fungos do gênero *Colletotrichum* é a β -tubulina. Talhinas et al. (2002), além de usarem a região ITS para determinar qual espécie de *Colletotrichum* que causava doença em tremoço (*Lupinus albus*), também utilizaram as regiões TUB2 e HIS4 determinando que a espécie responsável pelo problema era *C. acutatum*, concluindo que a região ITS é menos informativa do que a β -tubulina. Segundo Wade (2007), as tubulinas fazem parte dos microtubulos que são as estruturas responsáveis pela formação do citoesqueleto que possuem importantes funções celulares. Apesar do alto grau de conservação dos genes da β -tubulina, eles são ricos em íntrons e por isso úteis na filogenia fúngica (O'DONNELL et al., 1998). O gene calmodulina, também têm sido amplificado e utilizado na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (O'DONNELL, 1998). Todas as regiões citadas anteriormente estão entre as mais indicadas para a caracterização molecular de fungos fitopatogênicos

2.6 Controle biológico com produtos à base de *Trichoderma*

Trichoderma é um fungo que se classifica na Subdivisão *Deuteromycotina*, família *Moniliaceae*, é habitante natural do solo, ocorrendo principalmente em regiões de clima temperado e tropical do globo terrestre (HARMAN et al., 2004). As colônias de *Trichoderma* apresentam *in vitro* colorações que variam de uma coloração branca até verde intenso, o crescimento é muito rápido, chegando a tomar uma placa de Petri aos quatro dias de desenvolvimento. Os conídios são subglobosos, ovoides elipsóides ou elíptico cilíndricos (ADELL, 2004). Segundo Howel (2003), o micélio geralmente é composto por hifas ramificadas e de parede lisa.

Conforme Lucon (2008), a eficiência de *Trichoderma* no controle de microrganismos fitopatogênicos, especialmente fungos, se deve ao fato de que as espécies desse gênero fúngico apresentam vários mecanismos de ação. Os mecanismos mais conhecidos e estudados são: a) antibiose- O antagonista produz alguma substância tóxica (volátil ou não volátil) que inibe o desenvolvimento do fitopatógeno. *Trichoderma* foi eficiente no controle do crescimento *in vitro* de *Colletotrichum graminicola*, sendo que o aumento na inibição foi diretamente relacionado ao tempo de contato entre eles (MICHEREFF, et al., 2000); b) competição- Quando patógeno e antagonista competem por nutriente e/ou espaço, neste caso, como o *Trichoderma* apresenta rápido crescimento e desenvolvimento, o patógeno acaba se

deslocando do sítio de infecção ou não consegue desenvolver a doença plenamente (BARBOSA; MEZA, 2009); c) micoparasitismo- O patógeno é utilizado como alimento pelo antagonista. O antagonista cresce em direção do fitopatógeno ocorre um enrolamento das hifas, e por fim *Trichoderma* libera substâncias (enzimas líticas: quitinases, celulasas, glucanases e proteases) que degradam a parede celular e por fim ele se alimenta do conteúdo celular do outro microrganismo (LUCON, 2008); d) indução de resistência- Segundo Woo et al. (2006), é quando ocorre uma indução no metabolismo da planta hospedeira, adquirindo resistência a determinados patógenos. *Trichoderma* induz a resistência devido ao aumento na expressão de determinados genes relacionados com a defesa da planta e é similar ao processo de resistência adquirida (HARMAN et al., 2004).

Segundo Morandi et al. (2009), o fungo *Trichoderma* quando comercializado pode ser encontrado nas seguintes formulações: pós-molháveis, grânulos dispersíveis, suspensões concentradas, óleos emulsionáveis, grãos colonizados e esporos secos. A aplicação de *Trichoderma* pode ser feita nas sementes, no substrato ou na irrigação de culturas (LUCON, 2008).

Devido a toda versatilidade epidemiológica, à grande variabilidade existente dentro do gênero *Colletotrichum* e à carência de controle efetivo dos fungos deste gênero, são necessárias mais pesquisas, que estudem práticas mais efetivas para o controle das doenças causadas por esse importante agente patogênico (LÓPEZ, 2001), o que justifica o presente trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal e isolamento fúngico

Para a realização do estudo foram, primeiramente, realizadas coletas de material vegetal na região central e norte do Rio Grande do Sul nos municípios citados a seguir: Arroio do Tigre, Sobradinho, Passa Sete, Candelária, Novo Cabrais, Santa Maria, São Pedro das Missões, Seberi, Frederico Westphalen, Vista Alegre, Palmitinho, Alpestre e Planalto, todos no estado do Rio Grande do Sul (Figura 1).



Figura 1- Municípios de coleta de isolados de *Colletotrichum* sp. em árvores de *Cassia fistula* (Fonte: Google Earth), 2016.

Para a coleta foram selecionadas árvores que representassem o hábitat em que a espécie é encontrada, ou seja, áreas de arborização urbana (Figura 2).



Figura 2 - Diferentes indivíduos de *Cassia fistula* locais onde foram realizadas coletas de material vegetal para posterior isolamento do patógeno. Municípios de: A) Palmitinho. B) Alpestre. C) Santa Maria.



Figura 3 - A) Folíolo de *Cassia fistula* com sintoma característico de mancha foliar. B) Mancha foliar observada com auxílio de lupa. C) Formação de massa conidial de coloração alaranjada. D) Conídios de *Colletotrichum* sp. em microscópio no aumento de 40x.

O material (folíolos e frutos) que apresentava a mancha característica (Figura 3 A e B) foi coletado manualmente entre março e abril de 2015, colocado em sacolas plásticas e armazenado sob refrigeração, para posterior análise. Nos folíolos, as lesões eram geralmente numerosas e dispersas no limbo, apresentando uma porção central mais escura, algumas manchas também possuíam um halo clorótico de cor amarelada. Quando o folíolo sofria um ataque intenso, observaram-se lesões que se interligavam, necrosando e causando a queda precoce do folíolo.

Para isolamento do patógeno, o material apresentando sintomas foi lavado e desinfestado com etanol 70% (v/v) por 30 s e hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% (v/v) por 2 min e lavados duas vezes em água destilada e autoclavada, para retirada do desinfetante. Após esse procedimento, o material foi transferido para caixas gerbox (previamente desinfestados com etanol 70% (v/v) por 30 s e hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 2 min), forradas com duas folhas de papel filtro esterilizado no forno a 150°C, por 2 h.

O material foi incubado em sala climatizada a 25±2°C até a formação das estruturas reprodutivas do fungo (Figura 3C). Em seguida, as estruturas foram repicadas para o meio de cultura Mathur (Mathur, 1950). No total foram obtidos 14 isolados (Tabela 1), todos os isolados foram obtidos através das manchas presentes nos folíolos, após estes permanecerem dois dias em câmara úmida e formarem estruturas características pertencentes ao gênero *Colletotrichum* sobre as lesões observadas. Também haviam lesões nos frutos causando rachaduras e apodrecimento da casca, porém não foi possível o isolamento do patógeno neste órgão da planta.

Após o desenvolvimento do fungo, foram realizados os cultivos monospóricos. Para a obtenção da cultura monospórica, primeiramente, uma porção do meio com estruturas fúngicas foi diluída em 5 mL de água destilada e autoclavada e, posteriormente, esta foi transferida para o meio de cultura ágar-água (AA), após 12 h houve a repicagem de apenas uma unidade formadora de colônia (UFC) para o meio Mathur, obtendo-se, assim, culturas monospóricas (FERNANDES, 1993).

Tabela 1 - Identificação e procedência dos isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de lesões em folíolos de *Cassia fistula* com sintomas de mancha foliar.

Código de identificação	Procedência
AOT	Arroio do Tigre, RS
SHO	Sobradinho, RS
OS	Passa Sete, RS
CAND	Candelária, RS
NC	Novo Cabrais, RS
SM	Santa Maria, RS
SP	São Pedro das Missões, RS
SEB	Seberi, RS
FW	Frederico Westphalen, RS
VISTA	Vista Alegre, RS
PALM	Palmitinho, RS
ALP	Alpestre, RS
PLA	Planalto, RS

3.2 Teste de patogenicidade

O experimento foi realizado no laboratório de Fitopatologia no Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria. O teste de patogenicidade foi realizado em folíolos destacados de *Cassia fistula*. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 15 x 2 (Fator F: Inoculação dos isolados de *Colletotrichum* sp.; Fator C: presença de ferimento nos folíolos, totalizando 30 tratamentos, com oito repetições de uma folha cada. Os níveis dos fatores foram assim compostos:

Fator F:

FO: inoculação dos isolados de *Colletotrichum* sp. da Tabela 1.

FS: inoculação de água como controle.

Fator C:

C0: Folíolo sem ferimento.

C1: Folíolo com ferimento.

O inóculo foi obtido a partir de culturas monospóricas cultivadas durante sete dias em meio Mathur, para obter a concentração de esporos desejada. A inoculação foi feita através da deposição de seis gotas, que somadas totalizavam 100 µL de suspensão por folha (Figura 4).

A concentração de esporos utilizada foi de 10^6 conídios/ml e para a testemunha, foi utilizada apenas água destilada e esterilizada no lugar da suspensão de esporos.

Os folíolos utilizados no teste de patogenicidade foram coletados no município de Santa Maria, tomando-se o cuidado de coletar apenas folíolos saudios, sem a presença de qualquer alteração na área do limbo foliar. Posteriormente, os folíolos foram desinfestados com etanol 70% (v/v) e hipoclorito de sódio a 1% (v/v) após este processo, foram transferidos para caixas gerbox desinfestadas com etanol 70% (v/v) e hipoclorito de sódio a 1% (v/v) as caixas gerbox foram forradas com duas folhas de papel filtro (esterilizado em forno) e os folíolos foram dispostos sobre duas lâminas esterilizadas em autoclave e acondicionadas sobre o papel filtro (modificado de Matsumoto, 2002).



Figura 4 - Folíolos de *Cassia fistula* utilizados para o teste de patogenicidade com *Colletotrichum* sp., contendo o inóculo (100 μ L), disposto em seis gotas sobre o limbo foliar, neste caso os folíolos não apresentavam ferimentos.

Os folíolos foram mantidos em sala climatizada a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h durante 12 dias. As avaliações de incidência e da severidade da doença foram realizadas em três períodos diferentes de avaliação (4, 8 e 12 dias após a inoculação). Para a avaliação foi utilizada uma escala de notas adaptada de Várzea (1995) (Tabela 2).

Para evitar o ressecamento dos folíolos, foi colocado algodão esterilizado e embebido em água destilada autoclavada no pecíolo dos mesmos (Figura 4). Os ferimentos (furos) foram realizados na face adaxial dos folíolos, com agulhas entomológicas flambadas.

Tabela 2 - Critérios de avaliação dos sintomas causados por *Colletotrichum* sp. em folíolos de *Cassia fistula* inoculados com suspensão de esporos.

Número de lesões	Severidade
0	0%
1	17%
2	33%
3	50%
4	67%
5	83%
6	100%

Fonte: Várzea (1995)

Após a avaliação da patogenicidade, para completar os Postulados de Koch realizou-se o reisolamento do patógeno para meio de cultura BDA de forma asséptica. O reisolamento se deu a partir dos folíolos de *Cassia fistula* inoculados artificialmente, as quais apresentaram os mesmos sintomas característicos observados nas plantas, a partir dos quais foi realizado o primeiro isolamento.

Os dados obtidos no teste de patogenicidade foram submetidos à análise da variância para verificação da significância e, quando os dados eram significativos, foi aplicado o teste de comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, a 95% de confiança, com auxílio do programa SISVAR[®] versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

3.2 Dimensão dos esporos e pigmentação da colônia

3.2.1 Dimensão dos esporos

Para a determinação das dimensões dos conídios, primeiramente foram preparadas cinco placas contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) para cada um dos isolados, as quais foram incubadas durante sete dias, e, de cada placa, confeccionada uma lâmina semi permanente, sendo determinadas as dimensões de 20 conídios de cada, totalizando, desta forma, 100 conídios medidos por isolado (LOPES, 2013). As medidas foram obtidas com

auxílio de uma régua acoplada em uma ocular do microscópio ótico no aumento de 40X, sendo o valor obtido através dessa medição multiplicado por 2,5, para que a medida fosse obtida em micrometros (μm).

A relação comprimento/largura e a forma dos conídios foi obtida segundo Feitosa et al. (1977). Estes autores consideram: Ccc = cilíndrico muito curto (quando a relação comprimento/largura for menor que 2,00); Cc = cilíndrico curto (relação entre 2,00 e 2,50); C = cilíndrico (entre 2,50 e 3,00); f = fusiforme entre (3,00 e 3,50); ff = fusiforme muito alongado (relação com valor maior que 3,5).

3.2.2 Pigmentação da colônia

Para a avaliação da pigmentação da colônia, primeiramente, uma pequena porção do micélio do fungo foi transferida para placas contendo o meio BDA e este material foi incubado por sete dias, em temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. A cor da colônia foi determinada visualmente nas duas faces da placa de Petri. Foi utilizada a escala de cores Munsell[®] Soil Color Charts (1979). Nesta ocasião também foi avaliada a presença e a característica do micélio aéreo, sendo realizadas observações sobre as características da borda da colônia.

3.3 Caracterização molecular dos isolados

3.3.1 Amplificação da região ITS do rDNA

Para a caracterização molecular, primeiramente, fez-se a extração do DNA do fungo, conforme descrito por Doyle e Doyle (1991), método conhecido como CTBA (Cetiltrimetil Brometo de Amônio). Posteriormente as amostras foram amplificadas nas regiões ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990); Para o fator de alongação utilizou-se os primers EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1- 1567R

(ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (REHNER; BUCKLEY, 2005); e beta-tubulina foi amplificada com o par de primers Btub-F (AAGGGHCAYTAYACYGARGG) e Btub-R (CATGTTGGACTCDGCCTC) e para gene calmodulina, o par de primers CL1 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC e CL2A 5'- TTTTGCATCATGAGTTGGAC (O'DONNELL, 1998).

Posteriormente para a amplificação das amostras foi realizada a reação com 30 ng de DNA, tampão 10x, 2,5µM de cada Dntp, 20 nM de MgCl₂, 25 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima Taq polimerase e água ultra pura até completar o volume da reação. As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, programado para realizar as desnaturações a 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 min. Também foi utilizada uma amostra sem DNA como controle.

Após as reações, as amostras foram mantidas armazenadas a 4°C. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X que é constituído por 10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA a 0,5 M e 4 mL de água destilada, contendo brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta.

3.3.2 Sequenciamento da região ITS do rDNA e análise filogenética

Para a purificação dos produtos da PCR foi utilizado o PEG 8000 a 13% e as sequências geradas apresentaram de 400 a 900 pb, que correspondem aos segmentos das regiões ITS1, 5.8S e ITS2. Para efetivar o sequenciamento utilizou-se o sequenciador Mega BACE 500 (Amersham).

As sequências geradas foram comparadas com o banco de dados GenBank do National Center for Biotechnological Information (NCBI), utilizando-se o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2012). Sequências de referência com alta similaridade e cobertura, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises. A espécie *Fusarium decemcellulare* foi utilizada como outgroup. Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram gerados, utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994) no Bioedit, e após o corte das arestas foi realizada a análise

filogenética pelo método de neighbor Joining utilizando o programa Mega 6 (com 1000 replicatas) (TAMURA; KUMAR; NEI, 2004).

Os dados quantitativos da caracterização morfofisiológicos, (comprimento e largura de conídios, relação comprimento e largura, crescimento micelial a 25°C) foram utilizados para a realização da técnica de análise multivariada para agrupamento dos isolados de *Colletotrichum* sp. executada no programa Bioestat (5.3[®] software). A matriz Euclidiana foi utilizada como medida de dissimilaridade e para agrupar os isolados pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean).

Com base nas da análises morfofisiológica, percebeu-se que houve a formação de três grupos distintos de isolados que foram unidos devido a semelhança de suas características morfofisiológicas, a partir disso foram escolhidos um representante de cada grupo para a análise molecular, sendo que foram sequenciados três isolados (AOT, PLAN e NC) e, para cada isolado foram amplificadas três regiões específicas do DNA, que foram: ITS, Beta-tubulina e fator de alongação, no caso do isolado NC não foi possível amplificar a região de alongação e por isso a mesma foi substituída pela região da calmodulina.

3.4 Caracterização fisiológica dos isolados

3.4.1 Influência da temperatura no crescimento micelial dos isolados

Discos de micélio de 7 mm das culturas monospóricas dos isolados considerados patogênicos foram transferidos para placas de Petri (80 mm de diâmetro) contendo 20 mL de BDA. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 12 x 3 (Fator F: Isolados de *Colletotrichum* sp.; Fator C: diferentes temperaturas, totalizando 36 tratamentos, com seis repetições constituídas com uma placa cada. Os níveis dos fatores foram assim compostos:

Fator F:

F1: Isolados de *Colletotrichum* sp. apresentados na tabela 1.

Fator C:

C1: Temperatura de 20 °C.

C2: Temperatura de 25 °C.

C3: Temperatura de 30 °C.

Após a repicagem, as placas foram incubadas a 20, 25 e 30°C, em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 h, durante sete dias, acondicionadas em câmara de crescimento.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada a partir do segundo dia de crescimento, a cada 24 h, com a medição do diâmetro das colônias em duas posições ortogonais com o auxílio de paquímetro digital, desde o segundo até o sétimo dia de crescimento das mesmas. Após fez-se o ajuste dos modelos linear, quadrático, exponencial, logístico e beta-binomial. O modelo escolhido, foi aquele com maior R^2 , menor Quadrado Médio dos Desvios e melhor gráfico de distribuição de resíduos.

3.4.2 Influência do meio de cultura no crescimento micelial e na esporulação dos isolados

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 (Fator F: Isolados de *Colletotrichum* sp.; Fator C: diferentes meios de cultura, totalizando 16 tratamentos, com seis repetições constituídas por uma placa cada. Os níveis dos fatores foram assim compostos:

Fator F:

F1: Isolados NC.

F2: Isolados AOT.

F3: Isolados PLAN.

F4: Isolados SM.

Fator C:

C1: Meio de cultura BDA.

C2: Meio de cultura Mathur.

C3: Meio de cultura V8 (Suco V8-Ágar).

C4: Meio de cultura Aveia (Aveia-Ágar).

As fórmulas dos meios de cultura utilizados encontram-se no Anexo 1. Conforme observações anteriores foram selecionados os quatro isolados mencionados anteriormente devido principalmente as diferentes capacidades de esporulação que eles apresentavam nos testes anteriores.

Apartir das culturas monospóricas dos isolados, cultivadas em meio BDA por sete dias a $25\pm 2^\circ\text{C}$, foi repicado um disco de 5 mm de diâmetro de micélio do patógeno para o centro das placas de Petri, contendo os diferentes meios de cultura. As placas foram vedadas e mantidas a $25\pm 2^\circ\text{C}$, em fotoperíodo de 12 h por sete dias.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada diariamente no mesmo horário, durante sete dias consecutivos ou até que o micélio já tivesse tomado por completo a superfície da placa com o meio de cultura. A medição do diâmetro das colônias foi determinada com auxílio de um paquímetro digital, medindo-se a colônia em dois sentidos opostos.

As medidas obtidas na avaliação do crescimento micelial foram utilizadas no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e na taxa de crescimento micelial, empregando-se a expressão adaptada por Oliveira (1991);

$$\text{IVCM} = \frac{\text{Somatório } ((D - D_a) / N)}{N}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro médio atual da colônia;

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação

No sétimo dia de avaliação, além do crescimento micelial, também foi determinada a concentração de esporos em cada uma das placas. Para isso adicionaram-se 5 mL de água destilada autoclavada em cada placa, e procedeu-se à raspagem da superfície das colônias com o auxílio da alça de Drigalski, até que houvesse a liberação dos conídios.

A suspensão obtida foi filtrada em dupla camada de gaze e, em seguida, adicionou-se duas gotas de Tween[®] e procedeu-se a agitação no agitador magnético. Posteriormente, foi utilizada a câmara de Neubauer para a contagem dos esporos em microscópio óptico. Para cada placa, foi avaliada uma lâmina gerando, assim, um total de quatro lâminas por tipo de meio de cultura.

Os dados obtidos no teste da influência dos diferentes meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação dos isolados de *Colletotrichum* sp. foram submetidos à análise da variância para verificação da significância e, quando os dados eram significativos, foi aplicado o teste de comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, a 95% de confiança, com auxílio do programa SISVAR[®] versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

3.4.3 Influência da luminosidade no crescimento micelial dos isolados

Para determinar a influência do regime luminoso no crescimento micelial dos isolados, primeiramente, foram obtidos discos de micélio com um vazador de metal de 5 mm diâmetro, de uma colônia do fungo desenvolvida em meio BDA durante 7 dias, os quais foram depositados no centro de outras placas de Petri de 80 mm contendo BDA.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 (Fator F: Isolados de *Colletotrichum* sp.; Fator C: diferentes regimes luminosos, totalizando 12 tratamentos, com seis repetições constituídas por uma placa cada. Os níveis dos fatores foram assim compostos:

Fator F:

F1: Isolados AG.

F2: Isolados PS.

F3: Isolados FW.

F4: Isolados SEB.

Fator C:

C1: Regime luminoso escuro.

C2: Regime luminoso fotoperíodo alternado (de 12h).

C3: Regime luminoso luz contínua

Os isolados mencionados anteriormente foram escolhidos devido à diferença observada na taxa de crescimento micelial existente entre os mesmos na temperatura de 25°C, segundo o item 4.3.1.

Para o tratamento escuro, as placas foram envoltas com papel alumínio, enquanto que no tratamento fotoperíodo alternado as placas foram dispostas dentro de uma câmara de crescimento, sob temperatura controlada de (25±2°C), onde permaneceram por sete dias em fotoperíodo de 12 horas e no tratamento de luz contínua as placas foram acondicionadas em outra câmara de crescimento, com regime de luz contínua (com temperatura controlada 25±2°C).

3.5 Controle *in vitro* de *Colletotrichum* sp. com *Trichoderma* sp.

Para testar o efeito antagonista de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum*, foram empregadas duas metodologias específicas: confronto direto e metabólitos voláteis. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 (Fator F: Isolados de *Colletotrichum* sp.; Fator C: diferentes produtos a base de *Trichoderma*, totalizando 12 tratamentos, com seis repetições contínuas por uma placa cada. Os níveis dos fatores foram assim compostos:

Fator F:

F1: Isolados AG.

F2: Isolados PS.

F3: Isolados FW.

F4: Isolados SEB.

Fator C:

C1: Produto Biotrich[®].

C2: Produto Agrotrich[®].

C3: Produto Ecotrich[®].

Os isolados mencionados anteriormente foram escolhidos devido à diferença observada na taxa de crescimento micelial existente entre os mesmos na temperatura de 25C°, segundo o item 4.3.1. Os produtos a base de *Trichoderma* foram colocados em placas de Petri através de uma alíquota de 2 mL do produto que foi transferida para o meio BDA com auxílio de uma pipeta volumétrica, para proporcionar o desenvolvimento do fungo sobre o meio de cultura e para que fosse possível o desenvolvimento das metodologias de confronto direto e de metabólitos voláteis.

Para as duas metodologias de avaliação, primeiramente repicou-se os isolados de *Colletotrichum* e *Trichoderma* para placas contendo meio BDA, que a seguir foram incubadas durante sete dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h, para posterior prosseguimento das metodologias descritas abaixo:

Confronto direto: um cilindro de meio de cultura de 5 mm de diâmetro com *Colletotrichum* sp., foi transferido para uma placa de Petri de 80 mm com BDA, a aproximadamente, 0,5 cm da borda da placa. Após dois dias colocou-se um disco de mesmo tamanho, contendo *Trichoderma* spp., no lado oposto da placa (ETHUR, 2007).

As placas consideradas controle foram compostas somente com *Trichoderma* ou *Colletotrichum*, isoladamente. As placas foram transferidas para a câmara de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. As medições do crescimento micelial foram realizadas diariamente, até o sétimo dia de crescimento. No sétimo dia também utilizou-se a escala de Bell et al. (1982) (Figura 5). A escala esta descrita a seguir: 1. *Trichoderma* se sobressaiu e colonizou toda a superfície do meio de cultura; 2. *Trichoderma* se sobressaiu e colonizou pelo menos $2/3$ da superfície do meio de cultura; 3. *Trichoderma* e patógeno colonizaram mais de $1/3$ e menos de $2/3$ da superfície do meio de cultura; 4. Não houve sobreposição do *Trichoderma* e o patógeno colonizou ao menos $2/3$ da superfície do meio; 5. Patógeno se sobressaiu e colonizou toda a superfície do meio.

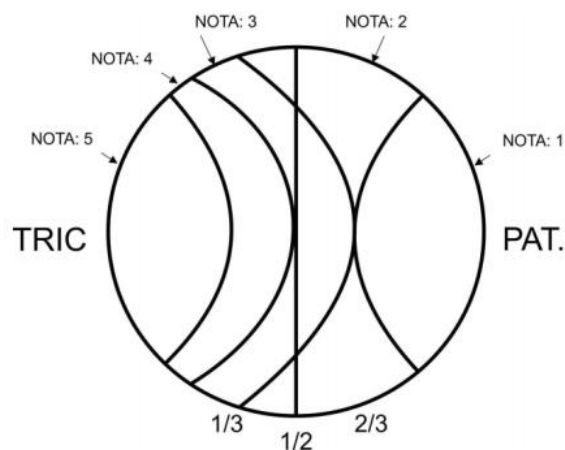


Figura 5 - Representação da escala de notas para avaliação do teste de confronto direto, conforme Bell et al. (1982).

Avaliação do efeito de metabólitos voláteis: Para verificar a inibição do crescimento do patógeno pelos compostos voláteis que são produzidos pelo antagonista, utilizou-se o método de placas sobrepostas (BOMFIM et al., 2010), onde discos com micélio de 5 mm do patógeno e do antagonista foram inoculados separadamente em meio BDA, sendo estes dispostos no centro das placas de Petri. As placas contendo micélio e conídios do fitopatógeno foram sobrepostas às faltou informação do antagonista após 48 h de desenvolvimento dos isolados de *Colletotrichum* sp. (Figura 6). Após a sobreposição, as placas foram unidas lateralmente por Parafilme.

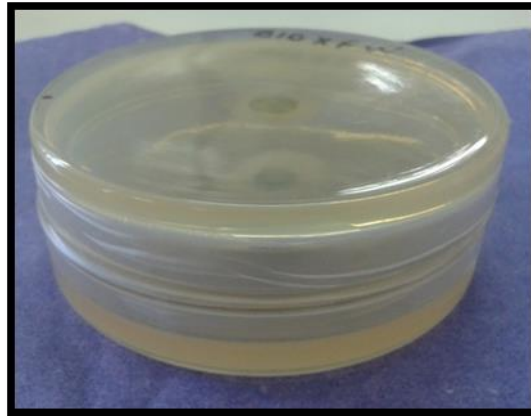


Figura 6 - Sobreposição das placas contendo o patógeno e o antagonista, unidas lateralmente por Parafilme.

A incubação foi feita em câmara de crescimento, à temperatura de ± 25 °C, por sete dias. Para a avaliação do crescimento micelial a partir do segundo dia de crescimento mediu-se o diâmetro das colônias diariamente (em dois sentidos), com o auxílio de um paquímetro digital. A testemunha recebeu apenas os isolados de *Colletotrichum* na placa disposta sobre a outra contendo apenas meio de cultura.

Para os dois experimentos de controle *in vitro* com *Trichoderma* spp., posteriormente foram realizados os cálculos da percentagem de redução do crescimento micelial dos isolados fúngicos de *Colletotrichum* sp. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte expressão (Menten et al., 1976):

$$\%RC = ((Dc - Dt) / Dc * 100)$$

Sendo:

%RC= Percentagem de redução do crescimento micelial;

Dc= diâmetro médio do tratamento controle;

Dt= diâmetro médio do tratamento com *Trichoderma*;

Os dados obtidos no teste de controle *in vitro* de *Colletotrichum* sp. foram submetidos à análise da variância para verificação da significância e, quando os dados eram significativos, foi aplicado o teste de comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, a 95% de confiança, com auxílio do programa SISVAR[®] versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Teste de patogenicidade

Todos os isolados estudados mostraram-se patogênicos à *Cassia fistula*, apresentando sintomas semelhantes àqueles inicialmente observados nos folíolos no momento do isolamento do patógeno (Figura 7 e 8).

No início, os sintomas caracterizaram-se pelo aparecimento de lesões com aspecto encharcado, de coloração escura (7A e 8A), onde posteriormente, observou-se o aparecimento de lesões maiores (B, C) que ao final do período de análise tomaram grande parte ou todo o limbo foliar (D e E). Também foi possível observar que, com o passar do tempo de avaliação e o desenvolvimento da doença, houve a formação de uma massa de coloração alaranjada, formada por conídios do patógeno (8B e 8C).

Aos quatro dias de avaliação, apenas o isolados VISTA e a testemunha não apresentaram sintomas (Tabela 3), folíolos CF apresentavam maior variabilidade na agressividade quando comparados aos folíolos SF, porém a partir dos oito dias, a variabilidade aumentou nos folíolos SF. Porém para os isolados AOT, ALP e AG observou-se diferença significativa na severidade entre folíolos CF e SF nos três períodos de avaliação nos dois primeiros os folíolos CF apresentavam maior severidade, para o isolado AG, ao contrário, apresentou maior severidade nos folíolos SF.

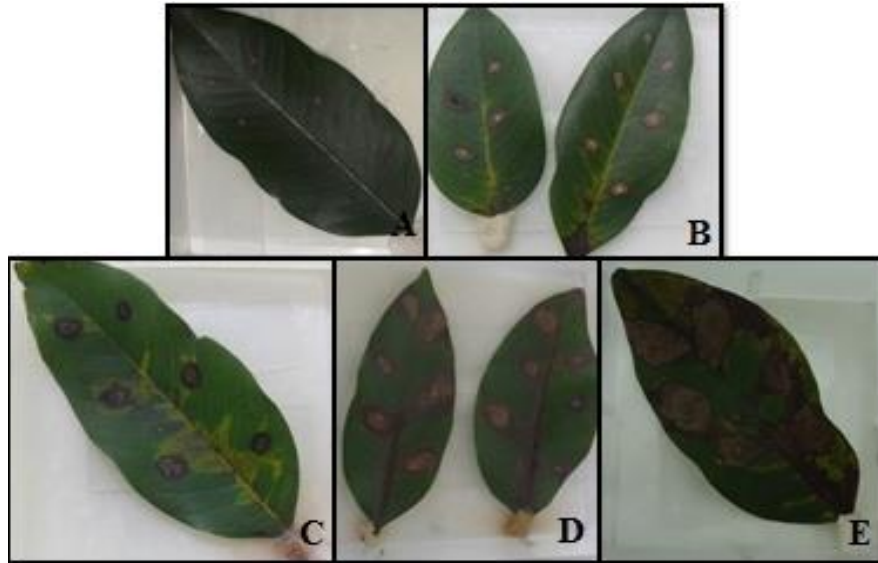


Figura 7–Sintomas observados após a inoculação de *Colletotrichum* sp. nos folíolos de *Cassia fistula*, nos diferentes dias após a inoculação. A) terceiro dia; B) quarto dia; C) oitavo dia; D) décimo dia; e E) décimo segundo dia.



Figura 8 – Teste de patogenicidade em folíolos destacados de *Cassia fistula* com o fungo *Colletotrichum* sp. mostrando a evolução da lesão em lupa, com a presença de sinais do patógeno. A) Detalhe do sintoma inicial. B) Evolução das lesões mostrando os sinais do patógeno. C) Esporulação sobre o folíolo com formação de massa conidial de coloração alaranjada.

Lazarotto, Maciel e Muniz, (2013), trabalhando com camélia (*Camellia japonica* L.) relataram que as folhas destacadas que foram inoculadas com *Colletotrichum* sp. Apresentaram sintomas apenas dez dias após a montagem do teste de patogenicidade. Esta diferença no tempo de aparecimento dos sintomas pode estar ligada a inexistência de ferimentos provocados nas folhas nos testes realizados pelos autores, ou devido ao local da inoculação do patógeno, sendo que os autores citados anteriormente realizaram a aplicação do inóculo na face abaxial das folhas e no presente estudo, a aplicação se deu na face adaxial dos

folíolos. O fato ainda pode estar ligado à própria anatomia do órgão vegetal que pode ser constituído de forma diferente nas duas espécies.

Aos quatro dias, o isolado que demonstrou maior severidade aos folíolos de *Cassia fistula* foi SHO, no tratamento com a presença de ferimento. Aos doze dias, quando comparou-se a inoculação realizada com ferimento e sem ferimento, quando se tratava do mesmo isolado, observou-se que os folíolos com ferimentos possuíam lesões maiores, com grande esporulação e formação de intensa massa conidial de coloração alaranjada, quando comparado com os folíolos inoculados sem ferimento, sendo que nestes também houve esporulação, contudo a formação de massa conidial foi menor, por vezes inexistente. Contudo, estas observações foram apenas visuais, sem análise estatística.

Tabela 3 - Severidade dos isolados de *Colletotrichum* sp., em folíolos de *Cassia fistula* com ferimento (CF) e sem ferimento (SF) em diferentes períodos de avaliação (dias).

Isolados	4		8		12	
	CF	SF	CF	SF	CF	SF
AOT	47,92 Ac*	27,08 Ba	72,91 Ab	52,08 Bc	97,22 Aa	68,05 Bb
SHO	93,75 Aa	35,41 Ba	97,92 Aa	85,71 Aa	97,92 Aa	93,75 Aa
PS	39,58 Ac	10,42 Bb	83,33 Aa	45,24 Bc	91,67 Aa	76,19 Ab
CAND	79,17 Ab	37,50 Ba	87,50 Aa	80,56 Aa	85,42 Ab	88,89 Aa
NC	54,17 Ac	45,83 Aa	79,17 Aa	52,08 Bc	93,75 Aa	64,58 Bb
SM	12,94 Ad	10,42 Ab	64,29 Ab	66,67 Ab	100,0 Aa	83,33 Ba
SP	64,96 Ab	31,63 Ba	73,33 Ab	61,11 Ab	76,67 Ab	69,44 Ab
SEB	0,00 Ad	6,25 Ab	66,67 Ab	38,09 Bc	80,95 Ab	47,62 Bc
FW	72,92 Ab	25,00 Ba	89,58 Aa	64,58 Ab	95,24 Aa	83,33 Aa
VISTA	0,00 Ad	0,00 Ab	64,29 Ab	25,00 Bd	78,57 Ab	41,67 Bc
PALM	42,86 Ac	35,24 Aa	83,33 Aa	80,95 Ba	95,24 Aa	90,48 Aa
ALP	64,58 Ab	18,75 Bb	85,42 Aa	45,24 Bc	93,75 Aa	76,19 Bb
AG	6,25 Bd	31,25 Aa	60,41 Bb	81,25 Aa	66,67 Bb	83,33 Aa
PLA	43,06 Ac	29,79 Aa	76,67 Ab	66,67 Ab	83,33 Ab	70,83 Ab
Testemunha	0,00 Ad	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ae	0,00 Ac	0,00 Ad
Média	41,48	22,97	72,32	56,35	82,43	69,18
CV (%)	40,34		14,67		11,12	

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%): Coeficiente de Variação.

A penetração do patógeno nos folíolos de *Cassia fistula* ocorreu tanto nos que sofreram como nos que não sofreram ferimentos. Porém, nos folíolos onde foram realizados

os ferimentos, os sintomas apareceram em um período de tempo menor e com maior severidade, para a maioria dos isolados. O fato relatado anteriormente ocorre, pois os ferimentos facilitaram a penetração e colonização do tecido do hospedeiro pelo patógeno. Provavelmente, a lesão alcançaria o mesmo tamanho nos folíolos onde não houve os ferimentos, porém em maior período de tempo. Desta forma, é importante ressaltar que a doença é favorecida pela presença de ferimentos no tecido do hospedeiro.

Nenhum dos folíolos que foram inoculados com água destilada esterilizada (testemunha) expôs qualquer forma de lesão que pudesse estar associada ao patógeno (Tabela 9). A partir desta observação, pode-se assegurar que as lesões observadas nos folíolos foram realmente provenientes dos isolados de *Colletotrichum* sp. inoculados. Após o encerramento da patogenicidade, foi realizado o reisolamento do patógeno que gerou culturas semelhantes às originais, confirmando a patogenicidade dos isolados através dos Postulados de Koch.

4.2 Dimensão dos esporos e coloração da colônia

Na caracterização morfológica observou-se variação entre os isolados nos testes realizados. Essa variação pode ser justificada devido à variabilidade das características morfológicas dos diferentes isolados de *Colletotrichum* e a ocorrência, em um mesmo hospedeiro de mais de uma espécie pertencente ao gênero, este fato foi relatado por Serra et al. (2011), que em seu trabalho com isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos da mangueira (*Mangifera indica* L.), classificaram-nos por meio de análises morfológicas em duas espécies diferentes, a saber: *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Através das determinações das variações morfológicas pode-se conhecer a plasticidade do fungo no ambiente em que ocorre a doença, entender a interação entre patógeno e hospedeiro, ou, ainda, compreender possíveis estratégias de controle do patógeno (RANATHUNGE et al., 2012).

4.2.1 Dimensão dos esporos

Na caracterização morfológica dos conídios, observou-se que os isolados apresentaram conídios hialinos, unicelulares com formato cilíndrico a fusiforme. O tamanho dos conídios variou de 7,5 a 14,2 μm para o comprimento e 4,33 a 5,25 μm para a largura. Os conídios do isolado PLA (14,2 μm) apresentaram os maiores valores médios para o comprimento, já para a largura o que apresentou maior tamanho médio foi o VISTA (5,22 μm), conforme pode-se observar na Tabela 4, enquanto o isolado PS foi o que apresentou os menores tamanhos de conídios, para o comprimento (11,6 μm) e largura (4,33 μm).

Tabela 4 - Comprimento e largura de conídios de isolados de *Colletotrichum* sp. cultivados em meio BDA durante sete dias, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$.

Isolados	Comprimento μm		Largura μm		Relação Comprimento/Largura	
	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude
AOT	13,00	10-17,5	4,73	2,5-5,0	2,87	2,50-3,55
SHO	12,23	7,5-17,5	4,90	2,5-5,0	2,52	2,38-2,67
PS	11,60	7,5-17,5	4,33	2,5-7,5	2,48	2,55-3,28
CAND	12,47	10-15,0	4,74	2,5-5,0	2,73	2,52-3,22
NC	11,65	7,5-17,5	5,00	2,5-5,0	2,33	1,50-3,50
SM	12,95	7,5-17,5	4,90	2,5-5,0	2,28	1,50-3,50
SP	13,75	5,0-20,0	5,25	2,5-7,5	2,75	1,33-3,50
SEB	13,02	7,5-18,75	4,83	2,5-7,5	2,84	2,58-3,13
FW	13,00	10-17,5	5,02	2,5-7,5	2,67	2,53-2,81
VISTA	13,63	10-17,5	5,22	2,5-7,5	2,74	2,56-2,99
PALM	12,50	10-17,5	4,81	2,5-7,5	2,69	2,53-2,98
ALP	12,65	10-17,5	5,12	2,5-7,5	2,51	1,67-3,50
AG	13,14	7,5-17,5	4,90	2,5-5,0	2,73	1,50-3,50
PLA	14,20	10-17,5	5,00	2,5-5,0	2,84	2,70-3,00
Média	12,84		4,91		2,64	
CV (%)	5,58		4,05		9,36	

Em estudos realizados por Sutton (1992) o autor constatou que os conídios com dimensões entre 12 a 17 μm de comprimento por 3,5 a 6 μm de largura, estão mais próximos de *C. gloeosporioides*. No presente estudo, 12 dos 14 isolados (AOT, SHO, CAND, SP, FW,

VISTA, PALM, SM, SEB, AG, ALP e PLA) apresentaram conídios que correspondem às medidas mencionadas. Os isolados PS e NC apresentam comprimento dos conídios (11,6 e 11,65 μm) menor do que os descritos por Sutton (1992) para *C. gloeosporioides*, porém há relatos de medidas semelhantes que foram descritas para a espécie *C. musae*, com comprimento do conídio que varia de $10,87 \pm 1,2 \mu\text{m}$, largura de $4,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$ e relação comprimento largura entre $2,3 \pm 0,5$ (GOES, 2013).

Lazarroto, Maciel e Muniz (2013) estudando *Colletotrichum gloeosporioides* causando mancha foliar em Camélia, também relataram características semelhante às encontradas neste trabalho, como os conídios sendo hialinos e unicelulares e dimensões médias de 4,88 μm de diâmetro e 12,25 μm de comprimento.

A diferenciação entre espécies com base nas dimensões de conídios foi dificultada pela sobreposição dos valores descritos por Sutton (1992), descritos anteriormente. Outras características também podem dificultar a utilização da morfometria dos conídios, como forma de diferenciação das espécies, como destacado por Menezes (2002), que comenta, em seu trabalho que os conídios produzidos em acérvulos são mais uniformes que àqueles produzidos em conidióforos fialídicos. Também cabe salientar que cada isolado de *Colletotrichum* é constituído por uma população de biótipos, causando variabilidade nas características morfológicas do patógeno (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000).

Em relação às estruturas morfológicas dos isolados estudados no presente trabalho, cabe destacar que não foi identificada a presença de setas nos acérvulos. Neste sentido, Menezes e Hanlin (1996) relataram que a formação de setas não é uma característica estável, variando de acordo com as condições do ambiente físico e nutricional, os autores ainda afirmaram que em vários isolados de *Colletotrichum*, particularmente, em *C. gloeosporioides*, a produção de setas no acérvulo pode variar de abundante, rara ou ausente.

4.2.2 Pigmentação da colônia

As colorações das colônias observadas variaram dentro das tonalidades de cores já descritas para o gênero *Colletotrichum* (Sutton, 1992) e se apresentaram bastante heterogêneas (variando de salmão a negra). As colônias do fungo foram separadas em três grupos distintos (Tabela 5). No grupo A foram reunidos nove isolados (AG, FW, PLAN,

SHO, AOT, PS, ALP e SM), três isolados (PALM, CAND e SEB) foram classificados no grupo B e um isolado (NC) apresentou características do grupo C.

A topografia das colônias apresentaram dois padrões distintos: (I) micélio aéreo reduzido (crescimento micelial rente ao meio de cultura) e (II) micélio aéreo moderadamente abundante (colônias com crescimento micelial aéreo de até 2 mm de altura). Nenhuma das colônias observadas apresentaram o micélio submerso, como também não foram observadas colônias com micélio aéreo abundante, com altura maior que 2 mm, ao final do período de avaliação (7 dias). Características semelhantes com as encontradas neste trabalho também foram encontradas por Andrade et al. (2007), em pesquisa realizada com *Colletotrichum* spp. isolados de diversas espécies vegetais como manga (*Mangifera indica*), mamão (*Carica papaya*), maçã (*Malus domestica*) e morango (*Fragaria vesca*) e de diferentes órgãos da planta (frutos, folhas e pecíolos).

Tabela 5 - Variabilidade de cores dos isolados de *Colletotrichum* sp. isolados de *Cassia fistula*, observados em meio BDA, aos 7 dias de cultivo.

Grupo	Isolados	Cor da colônia	Borda da colônia	Reverso da colônia	Micélio aéreo
A	AG FW PLAN SHO AOT PS SM	Cinza no centro com bordas brancas	Branca	Cinza escuro no centro bordas brancas	Moderadamente abundante cor branca
B	PALM ALP CAND SEB	Salmão	Branca	Salmão	Reduzido e branco
C	NC	Cinza escuro	Branca	Centro negro e borda branca	Presente mas reduzido

Conforme Sutton (1992), quando a pigmentação das colônias varia de cinza claro a escuro, contendo bordas brancas, estas colônias apresentaram características semelhantes à *C. gloeosporioides*, e no presente trabalho, os isolados classificados no Grupo A apresentaram essas características. Já o Grupo B reuniu as colônias de coloração salmão, com borda branca e reverso salmão, sendo estas características comuns à *C. acutatum* (SUTTON, 1992).

Na Figura 9 podem ser observadas colônias características de cada grupo de colorações descritas na Tabela 5. Dessa forma, 9A e 9D são colônias que foram agrupadas no grupo A, pois apresentaram a coloração cinza e borda branca. Já a imagem 9B e 9E são representante do grupo B, com colônias de cor salmão e 9C e 9F são colônias pertencentes ao grupo C, representado pelo NC, que apresentou esporulação maior que os demais no centro da colônia aos sete dias.

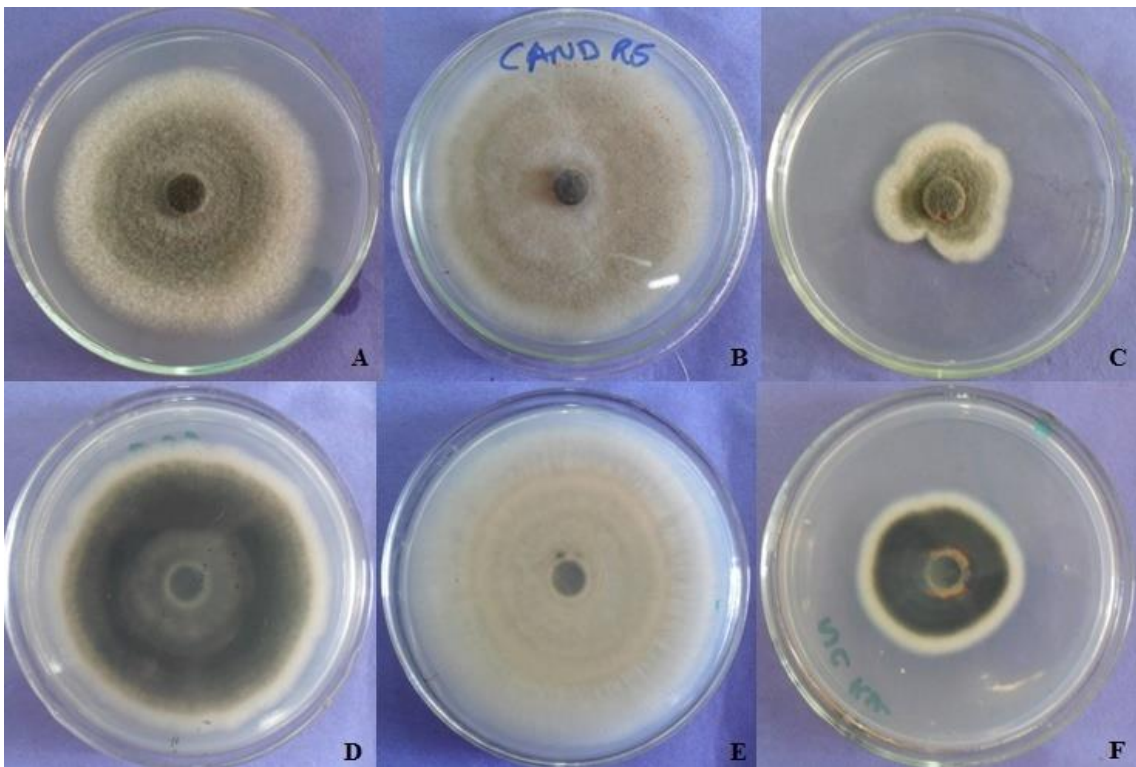


Figura 9 - Aspectos das colônias de *Colletotrichum* sp. em meio BDA, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Os grupos de caracterização observados no presente trabalho apresentaram padrões particulares que podem ser relacionados a algumas espécies de *Colletotrichum*, porém, há relatos que ressaltam a dificuldade de identificação em nível de espécie baseando-se somente nas características das colônias, pois tais características não são suficientes para fins taxonômicos (PERES et al., 2002).

Mesmo havendo a padronização dos fatores citadas anteriormente, o fungo está sujeito à variabilidade causada pelo ambiente e, também, por características intrínsecas. Essas características também são consideradas subjetivas, dependendo da interpretação pessoal.

Porém, essa característica pode ser interessante se for analisada conjuntamente com outros aspectos morfológicos, fisiológicos e com a análise molecular.

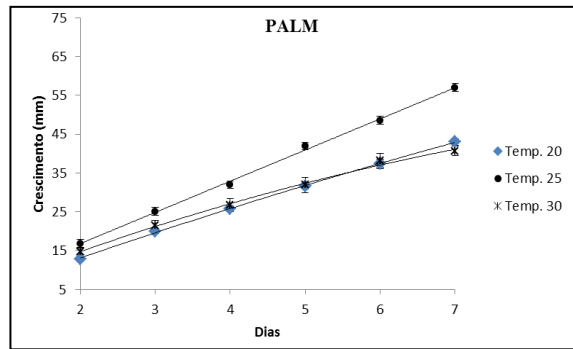
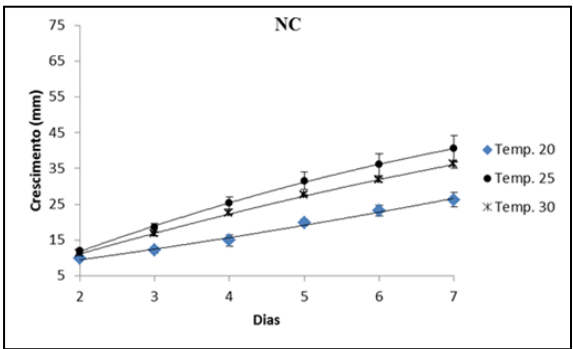
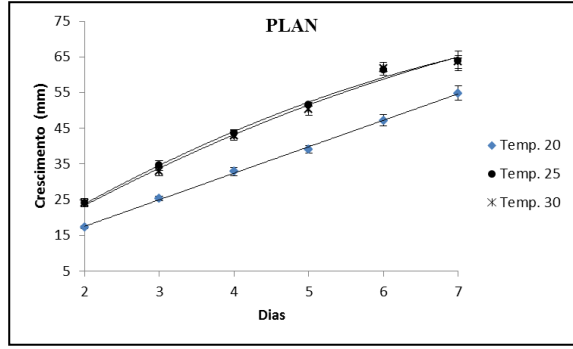
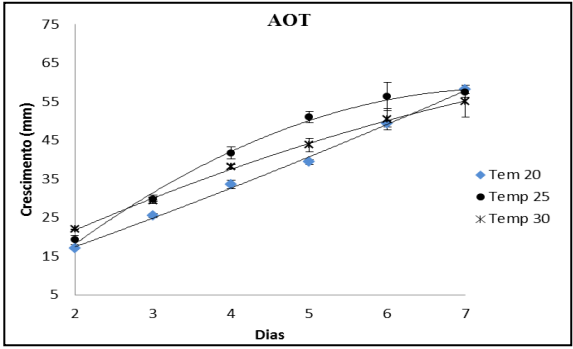
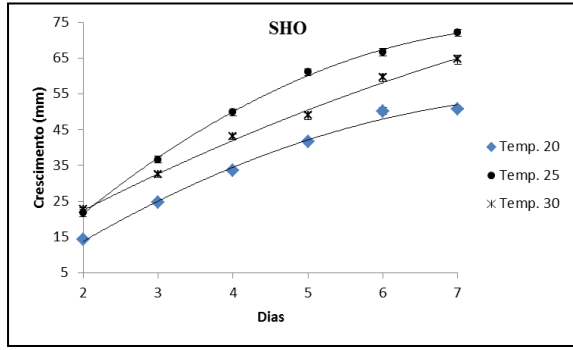
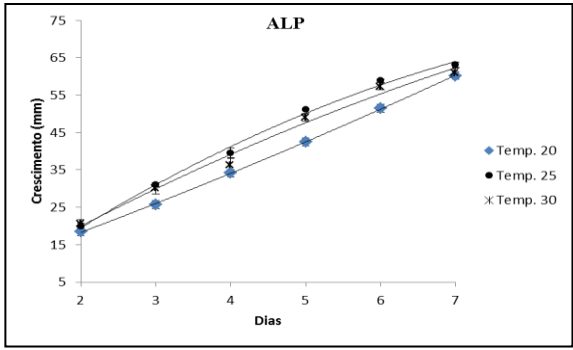
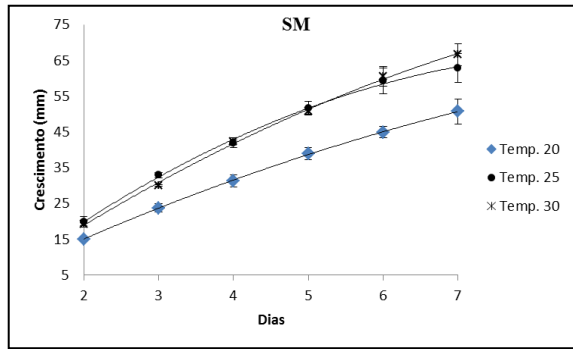
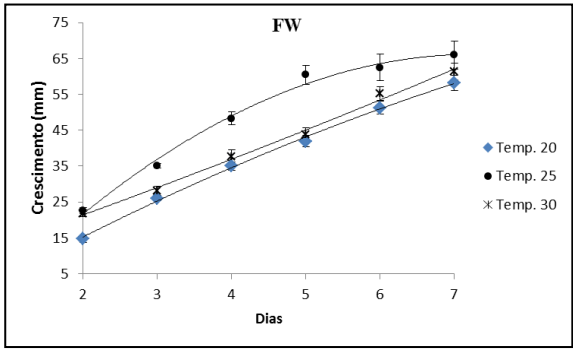
4.3 Caracterização fisiológica

4.3.1 Influência da temperatura no crescimento micelial dos isolados

Neste trabalho, o maior crescimento micelial ocorreu na temperatura de 25 °C, com o isolado CAND, ao passo que a menor média de crescimento micelial foi encontrada na temperatura de 30 °C para o isolado PS. A temperatura de 25 °C mostrou-se como a melhor temperatura para o crescimento de todos os isolados de *Colletotrichum* sp. No entanto, para alguns isolados (AOT, NC, SEB, FW, e PLA), não houve diferença significativa entre as temperaturas testadas, sendo que os isolados mantiveram o crescimento micelial contínuo, mesmo variando a temperatura de incubação (Figura 10).

Entre as temperaturas analisadas, nenhuma pode ser considerada limítrofe para o crescimento do patógeno, pois não foi possível perceber uma redução drástica no crescimento micelial dos isolados estudados. Apesar disso, pode-se destacar que a maioria dos isolados (AOT, SHO, PS, CAND, NC, SM, SEB, FW, PALM, AG e PLA) demonstrou desenvolvimento menor na temperatura de 20°C, havendo diminuição do crescimento micelial e diferindo estatisticamente das demais temperaturas testadas (Tabela 6, 7 e 8).

O crescimento micelial menor está associado com o aumento do tempo para iniciar uma epidemia, como também a temperatura pode atuar de maneira direta nos componentes da doença, como por exemplo, aumentando o período latente e o de incubação do patógeno (ROTEM, 1978).



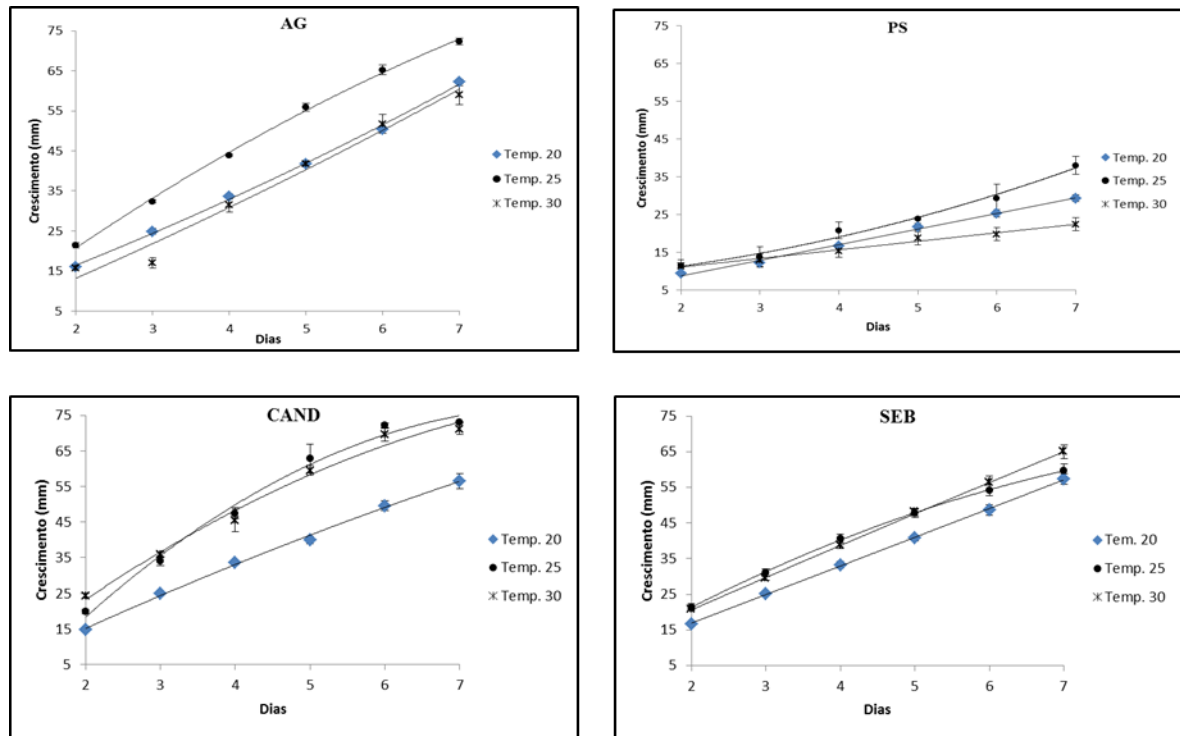


Figura 10 - Crescimento micelial de 12 isolados de *Colletotrichum* sp., ao longo de sete dias, em diferentes.

Tabela 6 - Valores de coeficientes e de R^2 , para a temperatura de 20°C.

20°C				
Isolado	b0	b1	b2	R^2
AG	9,0175	7,1538	0,2692	99,81
ALP	10,9080	7,2158	0,1702	99,99
AOT	10,3667	6,9348	0,1653	99,72
CAND	5,4397	9,9192	-0,2366	99,78
FW	4,5260	11,1185	-0,3663	99,80
NC	6,6995	2,6796	0,1080	99,13
PALM	6,3197	6,9144	-0,1371	99,96
PLAN	10,0890	7,4711	-0,0067	99,89
PS	5,2440	3,7296	0,0550	99,57
SEB	8,9200	7,9899	0,0081	99,95
SHO	0,7635	13,9546	-0,9026	99,28
SM	5,7367	9,7126	-0,3706	99,98

Tabela 7 - Valores de coeficientes e de R^2 , para a temperatura de 25°C.

25°C				
Isolado	b0	b1	b2	R ²
AG	7,2625	13,9737	-0,5045	99,84
ALP	6,7295	13,4643	-0,6544	99,58
AOT	2,19425	17,2995	-1,3296	99,45
CAND	-0,6130	21,0520	-1,4088	98,83
FW	3,1700	20,0762	-1,5992	99,17
NC	3,9880	8,1841	-0,3482	99,93
PALM	8,7710	8,0413	-0,0016	99,81
PLAN	11,7305	12,7364	-0,6449	99,49
PS	9,8880	2,0602	0,3525	95,80
SEB	10,13525	11,8092	-0,5933	99,97
SHO	3,14725	19,7898	-1,3881	99,89
SM	5,5165	15,3420	-0,9537	99,84

Tabela 8 - Valores de coeficientes e de R^2 , para a temperatura de 30°C.

30°C				
Isolado	b0	b1	b2	R ²
AG	20,0858	0,3365	0,9796	58,87
ALP	9,2370	11,0987	-0,3761	98,77
AOT	12,6528	9,4920	-0,3997	99,85
CAND	8,0623	15,9848	-0,8578	98,66
FW	13,9985	7,2775	0,1228	99,44
NC	5,0085	6,3342	-0,1916	99,97
PALM	7,6833	7,3585	-0,2981	99,66
PLAN	11,8485	12,0612	-0,5342	98,96
PS	8,8203	2,3081	-0,0065	98,71
SEB	11,4040	9,2816	-0,0583	99,98
SHO	11,4295	11,4662	-0,4246	99,54
SM	5,6533	13,8200	-0,6016	99,88

Os isolados foram obtidos a partir de lesões foliares nas condições climáticas do Estado do Rio Grande do Sul, deste modo, conforme a presente pesquisa, nesses locais o gênero *Colletotrichum* encontra condições de temperatura favoráveis para constituir o processo doença, pois a temperatura média nos meses de primavera e verão encontram-se próximas dos valores obtidos como melhores para o crescimento micelial do patógeno *in vitro*. Alguns isolados apresentaram crescimento variando de 9,1 mm/dia, até 10,3 mm/dia (SHO,

FW, ALP, AG e PLA, AOT) e pelo padrão de crescimento observado nos demais isolados, esses estão entre os limites vinculados ao crescimento mostrado por *C. gloeosporioides*, conforme resultados obtidos por Vinniere (2004). Conforme SHI et al. (1996), isolados com crescimento micelial menor podem ser classificados como do complexo de *C. acutatum*. Dessa forma o crescimento micelial tem sido útil para diferenciar populações de *Colletotrichum* spp. (SHABI et al., 1994).

4.3.2 Influência do meio de cultura no crescimento micelial e na esporulação dos isolados

Os meios de cultura, de maneira geral, induziram um bom crescimento micelial para todos os isolados testados. Houve diferença significativa tanto para os meios de cultura testados como também para os diferentes isolados. (Tabela 9). Entre os meios de cultura, o meio Mathur foi o que obteve os melhores resultados para a taxa de crescimento micelial, com médias que variaram de 1,05 cm a 0,82 (isolados AOT e NC, respectivamente).

Tabela 9 - Crescimento micelial médio (cm) em função dos diferentes isolados de *Colletotrichum* sp. em diferentes meios de cultura.

Isolados	Meios de cultura			
	BDA	MATHUR	V8	AVEIA
AOT	0,80 Bb*	1,05 Aa	0,85 Ba	0,80 Bb
NC	0,54 Bc	0,82 Ac	0,86 Aa	0,74 Ac
SM	1,01 Aa	0,95 Ab	0,77 Ba	0,76 Bc
PLAN	0,84 Bb	1,14 Aa	0,86 Ba	1,14 Aa
Média	0,79	0,99	0,83	0,86
CV (%)	8,42			

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%): Coeficiente de Variação.

Os resultados de crescimento micelial obtidos com meio mathur não diferiram estatisticamente do meio aveia para os isolados PLAN e NC (Tabela 10). Os resultados obtidos por Assis et al. (2001) corroboram em parte com os resultados obtidos nesta pesquisa, pois em seu experimento, estes autores testando diferentes fontes de carbono para o cultivo de *C. gloeosporioides*, concluíram que o amido proporcionou maior crescimento micelial para

alguns isolados. 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). Segundo o mesmo autor, o meio BDA, apesar de também apresentar amido em sua composição, apresenta também dextrose, que pode ser uma substância que causa diferença de crescimento entre os dois meios de cultura (REBELO, 1989).

Tabela 10 – Médias de Índice de crescimento micelial (IVCM) em cm, em função da interação entre os isolados de *Colletotrichum* sp. e os diferentes meios de cultura.

Isolados	Meio de cultura			
	BDA	MATHUR	V8	AVEIA
AOT	0,51 Bb*	0,74 Aa	0,56 Ba	0,68 Ab
NC	0,33 Bc	0,59 Ab	0,55 Aa	0,55 Ab
SM	0,71 Aa	0,67 Ab	0,53 Ba	0,61 Bb
PLAN	0,51 Cb	0,76 Ba	0,55 Ca	0,89 Aa
Média	0,515	0,69	0,55	0,68
CV (%)	13,01			

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%): Coeficiente de Variação.

Na natureza, os conídios são produzidos comumente nos acérvulos, porém, em condições artificiais, eles são produzidos em pseudoacérvulos, como, também, na ponta de hifas (GOES, 2013). Neste experimento houve interação entre os meios de cultura e a esporulação (Tabela 11). Todos os isolados esporularam em todos os meios de cultura, porém, em alguns, não foi possível visualizar a presença de massa conidial de cor alaranjada que é uma característica típica do gênero (Figura 10). Este fato leva a crer que houve a formação de conídios a partir de hifas conidiógenas dispersas na colônia, como já foi citado por Goes (2013), em seu trabalho com isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de tomateiro.

O número de esporos variou de forma geral entre todos os isolados de $2,68 \times 10^4$ a $1,12 \times 10^7$ mL⁻¹, evidenciando a variação para esta característica. A imagem abaixo (Figura 12) exemplifica a diferença no desenvolvimento do isolado NC, nos diferentes meios de cultura utilizados.

Na Tabela 11 observa-se que a maior concentração de esporos para todos os isolados testados foi obtida no meio Mathur quando comparado aos de mais meios de cultura. O

isolado que obteve a maior esporulação foi o NC e o que obteve a menor esporulação foi o SM, para todos os meios testados. O meio de cultura Mathur foi sugerido pela primeira vez por Mathur et al. (1950), para a esporulação de *C. lindemuthianum* e também, na presente pesquisa, se mostrou eficiente para a esporulação de isolados de *Colletotrichum* obtidos de folíolos de *Cassia fistula*.

Tabela 11 - Esporulação de quatro isolados de *Colletotrichum*, em função de diferentes meios de cultura.

Isolados	Meio de cultura			
	BDA	MATHUR	V8	AVEIA
AOT	5,04 x10 ⁵ Ab*	1,42 x10 ⁶ Ab	7,75 x10 ⁵ Ab	6,12 x10 ⁵ Ab
NC	3,23 x10 ⁶ Ba	8,07 x10 ⁶ Aa	1,67 x10 ⁶ Ba	1,12 x10 ⁷ Aa
SM	4,32 x10 ⁴ Ac	2,68 x10 ⁴ Ac	2,65 x10 ⁵ Ac	4,08 x10 ⁴ Ac
PLAN	4,14 x10 ⁵ Bb	1,33 x10 ⁶ Ab	8,58 x10 ⁵ Ab	4,26 x10 ⁵ Bb
CV (%)	27,42			

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CV (%): Coeficiente de Variação.

Através da análise dos resultados obtidos nesse experimento, verificou-se que o maior crescimento micelial nem sempre está vinculado a uma maior esporulação do isolado, isso fica explícito para o isolado NC, que obteve a menor taxa de crescimento e de IVCm para todos os meios de cultura testados, ao contrário, a esporulação foi superior em todos os meios de cultura.

4.3.3 Influência da luminosidade no crescimento micelial dos isolados

Os tratamentos de avaliação da influência da luminosidade sobre o crescimento micelial dos isolados apresentaram diferença estatística, segundo o teste de Skott-Knott a 5% de significância. Observou-se que houve diferença no crescimento micelial entre os isolados em função da luminosidade (Tabela 12), enquanto que o isolado AOT, aos sete dias, desenvolveu-se melhor no fotoperíodo de 12 horas, chegando a atingir 72,36 mm de crescimento em média, já o isolado PS apresentou maior crescimento micelial em luz

contínua durante todo o período de avaliação. Para os isolados FW e SEB, não houve diferença significativa entre os regimes luminosos aos sete dias. Porém, é importante salientar que apesar da grande variabilidade entre os isolados testados, três apresentaram um crescimento menor no escuro.

Tabela 12 – Médias de taxa de crescimento micelial em cm, em função da interação entre os isolados de *Colletotrichum* sp. e os regimes luminosos.

Isolados	Luminosidade		
	Escuro	12 h	Luz contínua
AOT	0,76 Cb*	1,34 Aa	0,90 Ba
NC	0,39 Cc	0,48 Bc	0,58 Ab
SEB	0,91 Aa	0,91 Aa	0,88 Aa
FW	0,84 Aa	0,82 Ab	0,87 Aa
Média	7,27	8,12	10,34
CV (%)	15,31		

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CV (%): Coeficiente de Variação.

Russo e Pappelis (1990) corroboram com os resultados encontrados neste experimento, pois, em sua pesquisa, observaram que houve aumento no crescimento de colônias de *Colletotrichum dematium* na ordem de 17%, quando estas foram irradiadas com luz fluorescente em comparação com as que foram mantidas em escuro contínuo.

Já Teixeira (2001), observaram que não houve diferença significativa na utilização de diferentes fotoperíodos no crescimento micelial de *C. gossypii*, somente quando se utilizou uma fonte diferente de radiação, a luz negra (NUV) foi que o crescimento se diferenciou. Contudo, é importante relatar que na literatura existe uma grande variação de resultados em relação ao efeito da luz sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. e que a maior parte das espécies deste gênero parece estar adaptada as condições do regime diário de alternância da luminosidade.

4.4 Caracterização molecular dos isolados

Algumas características levantadas neste trabalho podem ser utilizadas para separar os isolados em grupos (Figura 11). Através do dendrograma gerada com a utilização do método de agrupamento foi possível separar os isolados com o uso das variáveis: crescimento micelial na temperatura de 25 °C, largura, comprimento dos conídios e relação largura e comprimento dos conídios.

Através da análise do dendrograma dos isolados de *Colletotrichum* sp. verificou-se a formação de três grandes grupos: o primeiro constituído pelos isolados FW , ALP, PALM, SM, CAND, SHO e AOT sendo que entre eles a dissimilaridade é inferior a 20%. o segundo, por PS e NC e com dissimilaridade em torno de 30%, ainda, o terceiro formado por PLA, SP, AG, SEB, e VISTA, Os e os isolados com cerca de 30% de dissimilaridade.

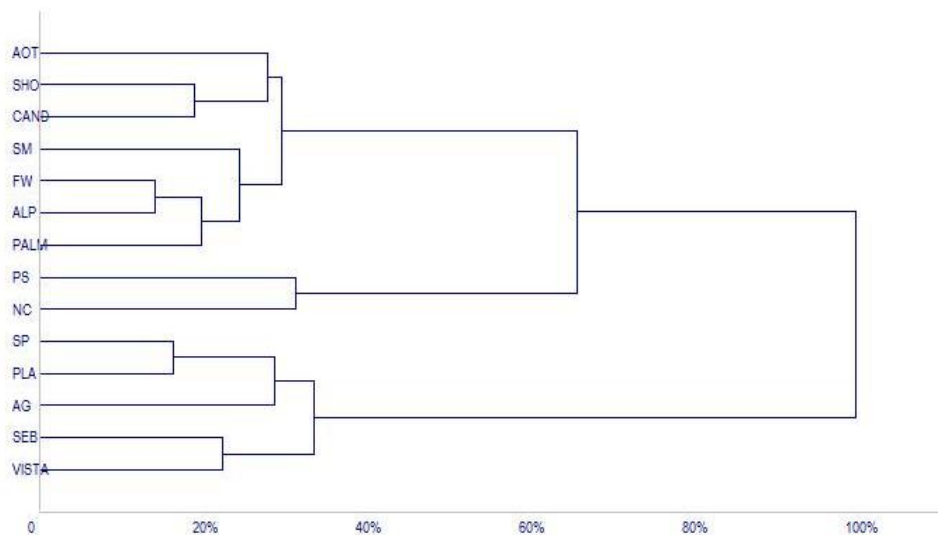


Figura 11 - Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre 14 isolados de *Colletotrichum* sp. O dendrograma foi construído através da técnica de análise de conclomerados, a partir da matriz Euclidiana, com quatro características morfológicas.

Nesse procedimento de agrupamento também observou-se as maiores e menores distância euclidianas entre os isolados, as quais são as responsáveis pela formação dos cladros (ramos) no dendrograma. A partir dos fatos citados acima se conclui que, por exemplo, o isolado AOT possui o maior valor de distância Euclidiana para VISTA e a menor para SHO e CAND, por isso eles são agrupados no mesmo clado.

Michereff et al. (2003), também utilizaram o mesmo agrupamento utilizado no presente trabalho para verificar a variabilidade entre 38 isolados de *Alternaria brassicola* que

causavam doenças em crucíferas no estado de Pernambuco. Lazarotto (2014a) e Lazarotto et al (2014b), também utilizaram a mesma técnica para verificar a variabilidade existentes entre 16 isolados de *Fusarium* spp. e 14 de *Pestalotia* spp. associados a *Carya illionensis* no Rio Grande do Sul.

Devido as diferenças morfofisiológicas observadas no teste de distância Euclidiana os dendrogramas foram construídos separadamente para cada representante do grupo de isolados analisados. Foram construídas árvores filogenéticas com auxílio do software Mega 3.1 a partir das sequências obtidas e alinhadas no BioEdit. Foram escolhidas sequências cuja similaridade fosse maior que 80%. A alta porcentagem de similaridade permitiu identificar os isolados utilizados neste trabalho, permitindo relacionar as sequencias dos isolados desta pesquisa com as do GenBank.

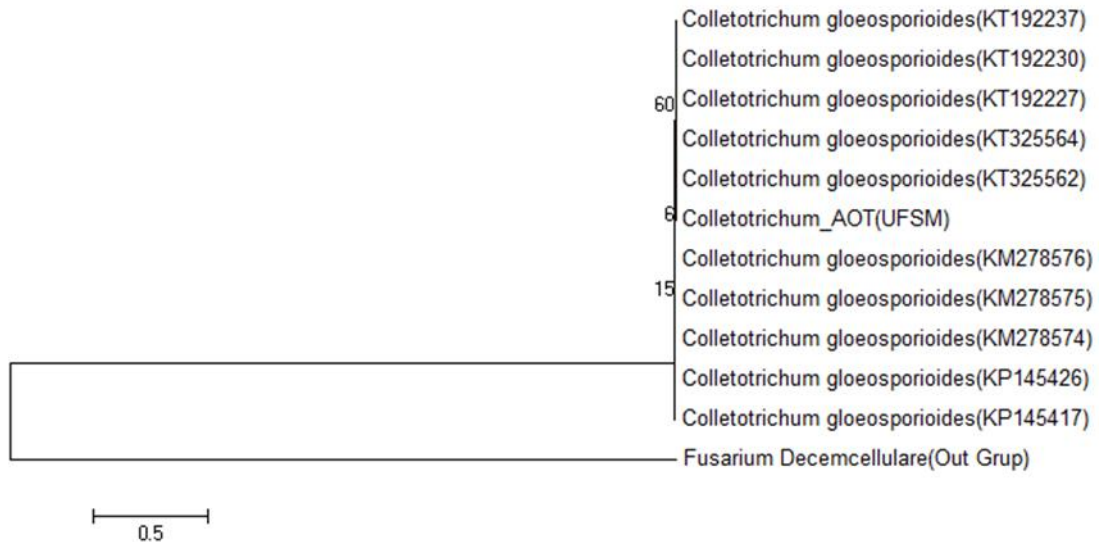
Foram sequenciados três isolados, sendo que, para cada isolado, foram amplificadas três regiões específicas do DNA: ITS, Beta-tubulina e fator de alongação. Contudo não foi possível, através das regiões amplificadas, classificar com precisão alguns isolados em nível de espécie. Assim, para este trabalho será demonstrado apenas os dendrogramas obtidos para o isolado AOT. A seguir pode ser observado o dendrograma para a região ITS (Figura 12).

Tabela 13 – Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região ITS.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>C. gloeosporioides</i>	KT192237	100	100	Bu; Yu, 2015*
<i>C. gloeosporioides</i>	KT192230	100	100	Bu; Yu, 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KT192227	100	100	Bu; Yu, 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KT325564	100	100	Mithun, et al., 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KT325562	100	100	Mithun, et al., 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KM278574	100	99	Waculicz-Andrade, 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KM278576	100	99	Waculicz-Andrade, 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KP145426	100	99	Diao; Zhang; Liu, 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KP145517	100	99	Diao; Zhang; Liu, 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	KM278575	100	99	Waculicz-Andrade, 2015

Com o sequenciamento da região ITS não foi possível definir a espécie do isolado AOT, já que, apesar da sequência do isolado ter sido semelhante à espécie *Colletotrichum gloeosporioides* e apresentado similaridade considerada satisfatória (entre 99 e 100%,

conforme pode ser observado na Tabela 13), o suporte de bootstrap foi muito baixo (6%), pois, para serem expressivos, os valores desse suporte devem ser superiores a 90% (SCHROERS et al., 2009).



*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

Figura 122 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região ITS do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

A região ITS é mais conservada quando comparada às regiões do fator de alongação 1- α e beta-tubulina, assim é mais eficiente na separação de gêneros. O fato das regiões serem compostas por segmentos conservados, relativamente curtos e se repetirem várias cópias no genoma, permite a amplificação e o sequenciamento da região com facilidade (FUNGARO, 2000), assim é grande o número de sequências ITS que estão disponíveis no GenBank, porém para nesse estudo essa região não foi eficiente para discriminar a espécie

Neste sentido, é imprescindível o sequenciamento de mais de uma região genômica, que, posteriormente, poderia se complementar com as demais regiões (FUNGARO, 2000). Com o sequenciamento da região beta-tubulina, o dendrograma apresentou valores de *bootstrap* de 97%, considerado significativo. O clado em que o isolado de *Colletotrichum* sp. do presente estudo está alocado apresenta outros cinco acessos que correspondem a espécies

de *Colletotrichum gloeosporioides*, além de elevados valores de cobertura e de similaridade (Tabela 14 e Figura 13).

Tabela 14 - Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região beta-tubulina.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>C. ignotum</i>	GU994471	100	98	Rojas, et al, 2010*
<i>C. ignotum</i>	GU994472	100	98	Rojas, et al, 2011
<i>C. siamense</i>	HM585413	100	98	Yang, et al, 2011
<i>C. fruticola</i>	JQ247636	100	98	Peng, et al, 2012
<i>C. fruticola</i>	JF811017	100	98	Xia, 2011
<i>C. gloeosporioides</i>	KT161311	100	100	Li, 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	HG972854	100	100	Ismail, 2014
<i>C. gloeosporioides</i>	JX145213	100	100	Doyle, 2013
<i>C. gloeosporioides</i>	JX145199	100	100	Doyle, 2013
<i>C. gloeosporioides</i>	JX827449	100	100	Mahmodi, 2012

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

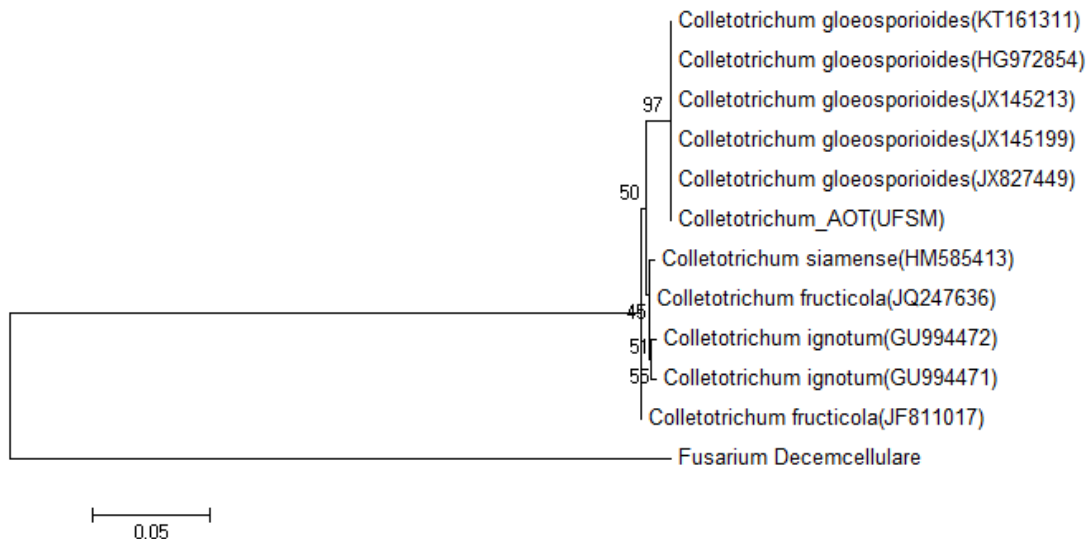


Figura 133 - Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região beta tubulina do rDNA do isolado de *Collatotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

O dendrograma da região do fator de alongação 1- α apresentou valores de bootstrap confiáveis (99%) com dois acessos da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (GU994268 e GU174573) (Tabela 15 e Figura 14), além de elevados percentuais de cobertura e similaridade. Portanto, após a criação do dendrograma para o fator de alongação foi possível determinar com total confiabilidade que o isolado do estudo em questão pertence à espécie *Colletotrichum gloeosporioides*.

Fungaro (2000), verificou que através do rDNA é possível a separação dos isolados em espécies diferentes e, conseqüentemente, a diferenciação dos isolados dentro de cada espécie. Porém é importante salientar que muitos acessos depositados no GenBank não são confiáveis (Maharach et al., 2011), pois os dados que são lançados no GenBank nem sempre são identificados de forma correta.

Tabela 15 - Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma do fator de alongação.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>C.gloeosporioides</i>	GU994268	85	97	Rojas, et al, 2010*
<i>C.gloeosporioides</i>	GU174573	80	97	Weir; Johnston, 2009
<i>C. horri</i>	JQ071901	94	83	Rojas, 2010
<i>C. ignotum</i>	GU994289	85	82	Rojas, 2010
<i>C. ignotum</i>	GU994288	85	82	Rojas, 2010
<i>C. siamense</i>	KC790612	94	90	Sharma, 2010
<i>C.gloeosporioides</i>	HQ022742	95	90	Gazis; Rehner; Chaverri 2010
<i>C.gloeosporioides</i>	HQ022744	95	90	Gazis; Rehner; Chaverri 2010
<i>C. hymenocallidis</i>	JQ071907	89	81	Sharma; Kumar; Shenoy 2011
<i>C.gloeosporioides</i>	AB970996	53	89	Qureshi; Galea 2014

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados

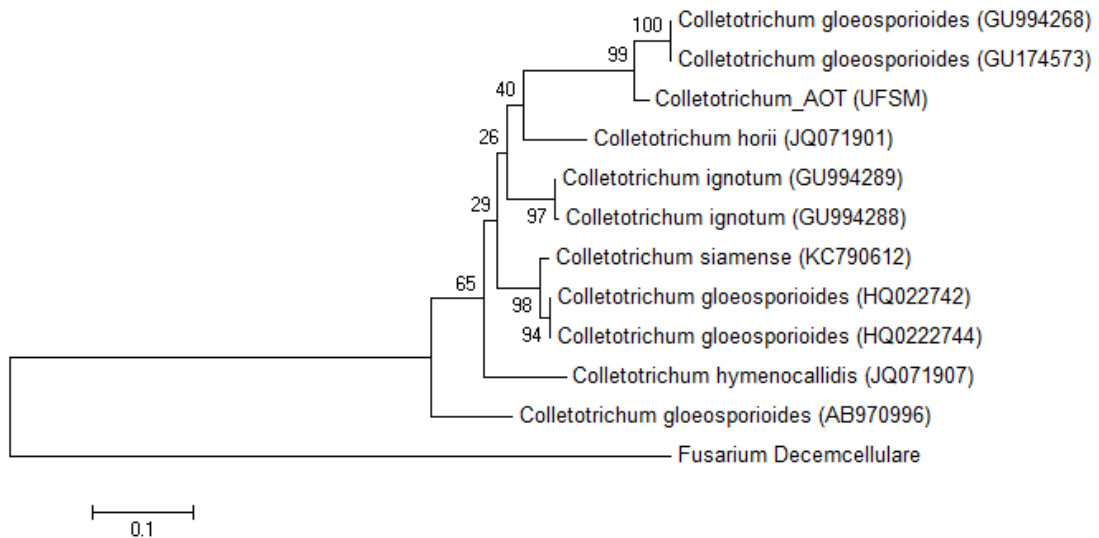


Figura 144– Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região fator de alongação do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

Colletotrichum gloeosporioides já foi encontrado associado a outras espécies utilizadas como ornamentais. Lins e Coelho (2004) encontraram o patógeno associado a diversas espécies ornamentais tropicais em Pernambuco Segundo esses autores, o fungo pode atacar as espécies de *Heliconia rostrata* (helicônias), *Etilingera elatior* (bastão-do-imperador) e *Tapeinochilos ananassae* (tapeinóquilos); Carnaúba et al. (2007) relataram a associação do patógeno a manchas foliares em *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) e Sales et al. (2009) encontraram o esse fungo associado à mancha-foliar em *Yucca elephantipes* (yucagigante). *Colletotrichum gloeosporioides* já foi relatado como agente causal de mancha-foliar em *Camellia japonica* em Portugal (VAZQUEZ, 2002).

Com o sequenciamento da região ITS não foi possível definir a espécie do isolado PLAN, já que, apesar da sequência do isolado ter sido semelhante à espécie *Colletotrichum gloeosporioides* e apresentado similaridade considerada satisfatória (entre 99 e 100%, conforme pode ser observado na Tabela 16), pode-se observar que o dendrograma nem chegou a formar clados distintos entre as diferentes espécies de *Colletotrichum*, porém pode-se afirmar que o isolado PLAN pertence ao gênero *Colletotrichum*, pois o isolado ficou mais distante geneticamente do out group utilizado na construção do dendrograma (*Fusarium decemcellulare*) e mais próximo às espécies de *Colletotrichum* (Figura 15).

Tabela 16 – Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região ITS.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>C. gloeosporioides</i>	KT218694	100	100	Numponsak; 2015*
<i>C. gloeosporioides</i>	CQ407097	100	100	Numponsak; 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	CQ120493	100	100	Numponsak; 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	CQ120490	100	100	Numponsak; 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	CQ120487	100	100	Numponsak; 2015
<i>G. cingulata</i>	JQ341131	100	100	Douanla-Meli, Langer, 2012
<i>G. cingulata</i>	JQ341127	100	100	Douanla-Meli, Langer, 2012
<i>C. fruticola</i>	KR445679	100	100	Aponte; Rivera, 2015
<i>C. fruticola</i>	KT161313	100	100	Aponte; Rivera, 2015
<i>G. cingulata</i>	HM989903	100	99	Zhou; Tang, 2010

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

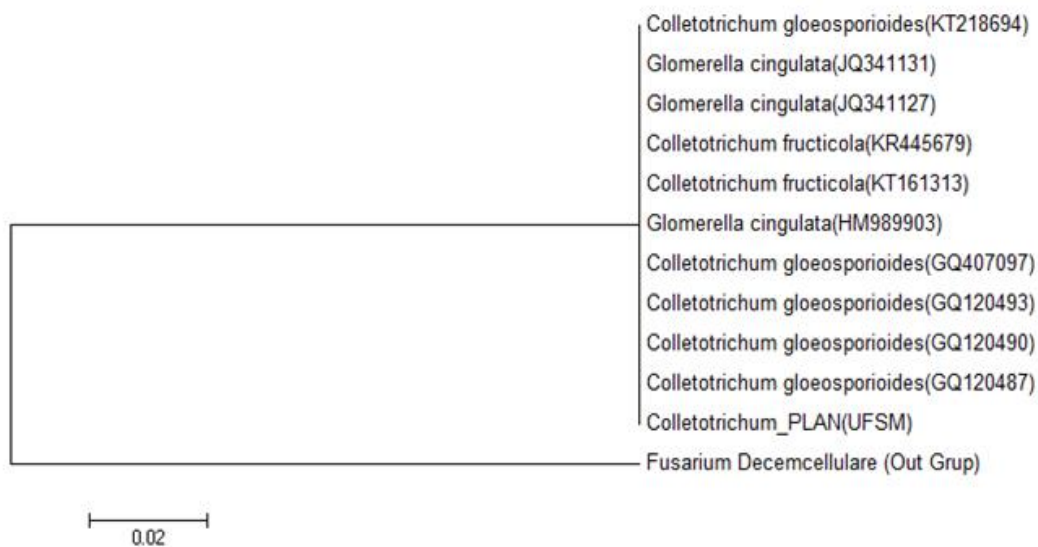


Figura 155 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região ITS do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

Com o sequenciamento da região beta-tubulina, o dendrograma apresentou valores de bootstrap de no máximo 68%, considerado muito baixo e, portanto através deste ainda não pode-se classificar o isolado com precisão, apesar da similaridade entre as sequências serem consideradas satisfatórias (entre 99 e 100%, conforme pode ser observado na Tabela 17). O

clado em que o isolado de *Colletotrichum* sp. do presente estudo está alocado apresenta um acesso que corresponde a espécie de *Colletotrichum gloeosporioides*, além de outras espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum* (Figura 16).

Tabela 17 – Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região beta tubulina para o isolado PLAN.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>G. fruticola</i>	KM245092	100	100	Hu; Schnabel, 2014*
<i>C. fruticola</i>	KM251866	100	100	Baroncelli, et al., 2014
<i>C. fruticola</i>	KM258565	100	100	Baroncelli, et al., 2014
<i>C. ignotum</i>	GU994472	100	100	Rojas, et al., 2010
<i>C. ignotum</i>	JX145215	100	100	Doyle, et al., 2013
<i>C. gloeosporioides</i>	KT071709	99	99	Yan, et al., 2015
<i>C. siamense</i>	KJ829534	99	99	Larran, et al., 2014
<i>C. siamense</i>	KF877326	99	99	James, et al., 2015
<i>C. siamense</i>	KC790871	99	99	Sharma, et al., 2013

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

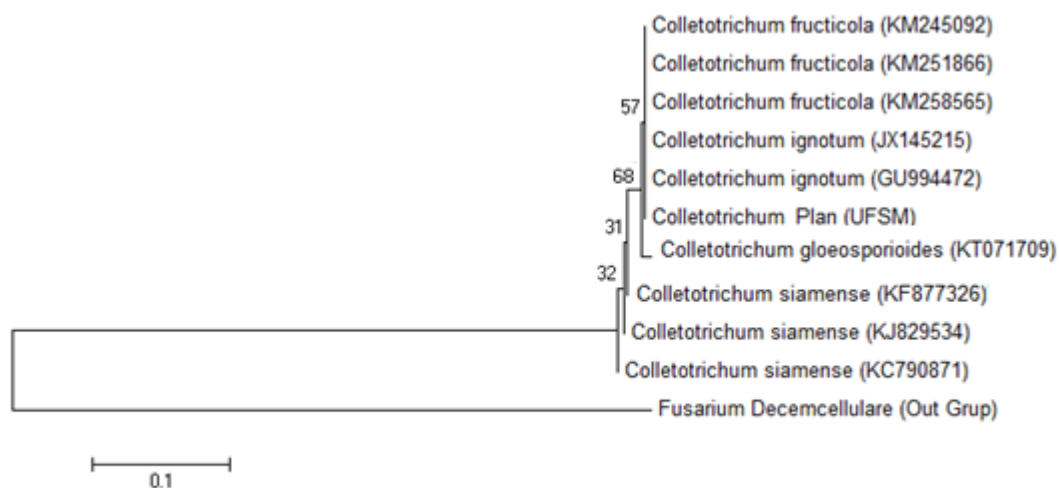


Figura 16 - Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região beta tubulina do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

O dendrograma da região do fator de alongação 1- α apresentou valores de bootstrap confiáveis (91%) com três acessos da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (GU994268 e GU174573) (Tabela 18 e Figura 17), além de elevados percentuais de cobertura e similaridade. Portanto, após a criação do dendrograma para o fator de alongação foi possível determinar com total confiabilidade que o isolado PLAN é da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tabela 18 – Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referências utilizadas para a construção do dendrograma da região do fator de alongação para o isolado PLAN.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>C. gloeosporioides</i>	KQ022690	95	99	Liu, et al., 2015*
<i>C. siamense</i>	KC790609	94	98	Sharma, et al., 2015
<i>C. siamense</i>	KC790594	94	98	Sharma, et al., 2015
<i>C. siamense</i>	KC790593	94	98	Sharma, et al., 2015
<i>C. ignotum</i>	GU994289	85	99	Rojas, et al., 2010
<i>C. ignotum</i>	GU994288	85	99	Rojas, et al., 2010
<i>C. gloeosporioides</i>	HQ718465	94	89	Deng, et al., 2010
<i>C. gloeosporioides</i>	HQ022738	95	89	Deng, et al., 2010
<i>C. gloeosporioides</i>	HQ022732	95	89	Deng, et al., 2010
<i>C. asianum</i>	JQ071902	94	88	Sharma, 2011

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

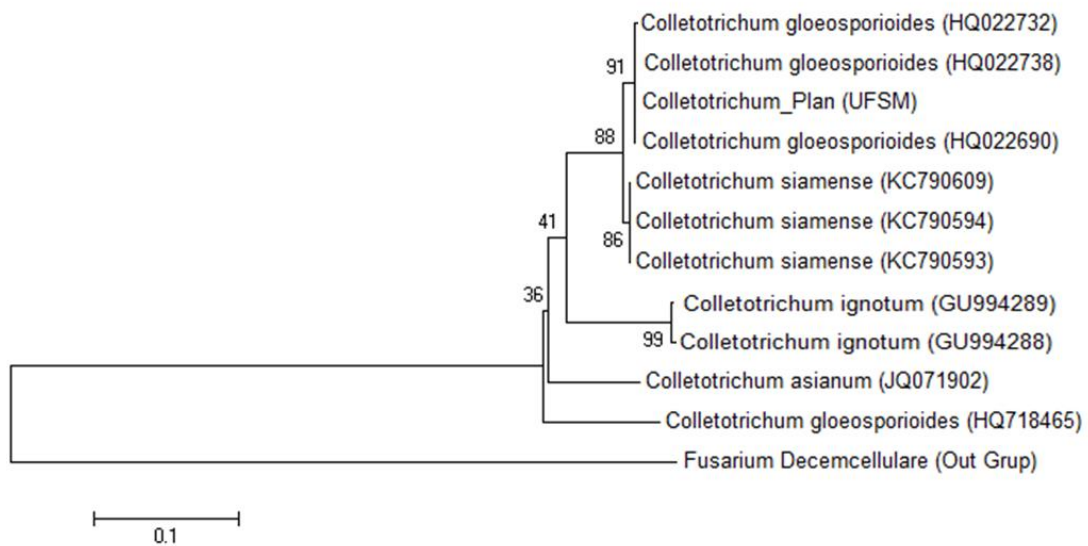


Figura 167 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região fator de alongação do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

Observou-se que para o isolado de *Colletotrichum* NC a identificação molecular não foi conclusiva, mesmo utilizando-se três regiões genômicas distintas (Figuras 18, 19, 20 e Tabelas 19, 20, 21). Aproximando-se de várias espécies diferentes, porém como já dito não se pode afirmar com precisão a que espécie de *Colletotrichum* pertence o isolado NC. A situação relatada anteriormente já foi encontrada por Lazzarotto (2014b) em seu trabalho, contudo neste caso o gênero trabalhado era o *Pestalotiopsis*.

Para a região ITS, o isolado NC não pode ser identificado como uma única espécie, pois ele foi agrupado com mais cinco espécies *G. acutata*, *C. acutatum*, *C. lupini*, *C. simmondsii* e *C. scovillei* que pertencem a grupos diferentes, conforme Damm (2012). Além do fato anteriormente relatado, apesar de terem sido encontradas sequências da região ITS que apresentavam altos valores de cobertura e similaridade (entre 100 e 98%), não houve a formação de clados com valores de *bootstrap* considerados satisfatórios para a classificação em nível de espécie.

O isolado NC não pode ser identificado mesmo com o sequenciamento dos genes (beta-tubulina e calmodulina), pois o isolado continuou em clados dos dendrogramas com várias espécies diferentes e com valores de *bootstrap* considerados muito baixos, pois como já

foi dito anteriormente somente valores de bootstrap acima de 90% são considerados confiáveis.

Tabela 19 – Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região ITS do isolado NC.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>C. simmondsii</i>	KR534716	100	100	Rojas-Jimenez, 2015*
<i>C. simmondsii</i>	KT582128	100	100	Hunupolagama, 2015
<i>C. lupini</i>	JQ936134	100	100	Leite, et al., 2012
<i>C. lupini</i>	KM246190	99	99	Leite, et al., 2012
<i>C. acutatum</i>	KT215297	100	99	Rashid, 2015
<i>C. acutatum</i>	KT215296	100	99	Rashid, 2015
<i>C. acutatum</i>	KC816048	100	99	Yang; Hu,2013
<i>G. acutata</i>	FN566877	99	99	Ramos, 2009
<i>G. acutata</i>	FJ972610	100	99	Prihastuti, 2009
<i>C. scovillei</i>	JQ071902	99	98	Sharma, et al., 2013

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

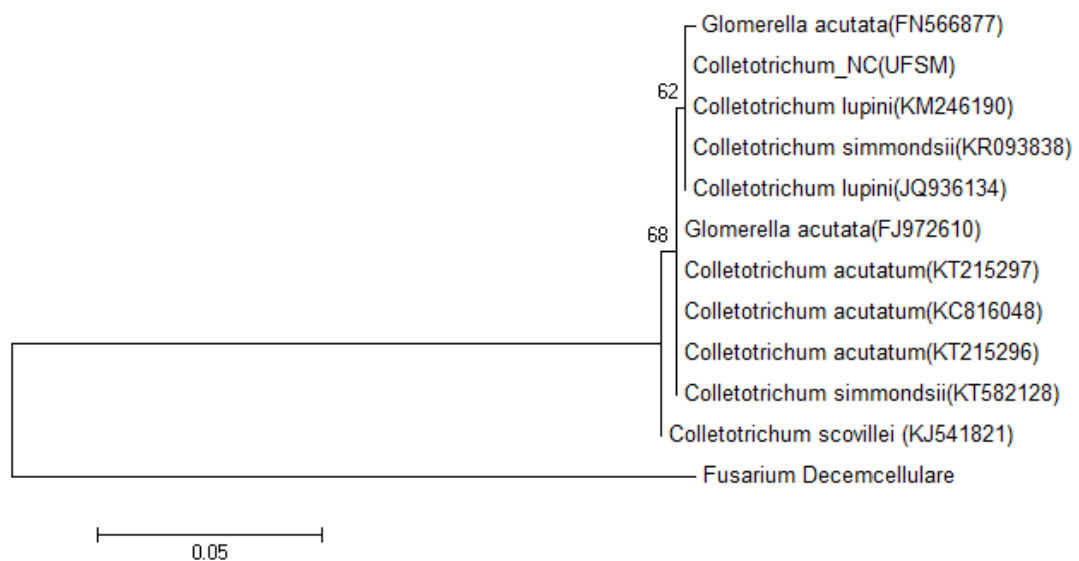


Figura 178 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região ITS do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

Tabela 20 – Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região da calmodulina para o isolado NC.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>C. nymphae</i>	KJ534725	99	96	Yang; Liu, 2014*
<i>G. acutata</i>	HM575366	100	96	Cheng; Li, 2010
<i>G. acutata</i>	KC293702	100	96	Huang, 2012
<i>C. acutatum</i>	KP943585	99	99	Mithun, et al., 2015
<i>C. acutatum</i>	KT600771	100	99	Ramos, 2009
<i>C. acutatum</i>	KP943584	100	99	Mithun, et al., 2015
<i>C. simmondsii</i>	GQ849454	100	96	Yang, et al., 2015
<i>C. simmondsii</i>	KT600795	99	96	Ramos, 2009
<i>G. acutata</i>	FJ917511	100	99	Prihastuti, 2012
<i>C. fioriniae</i>	JQ071902	99	98	Sharma, et al., 2013

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

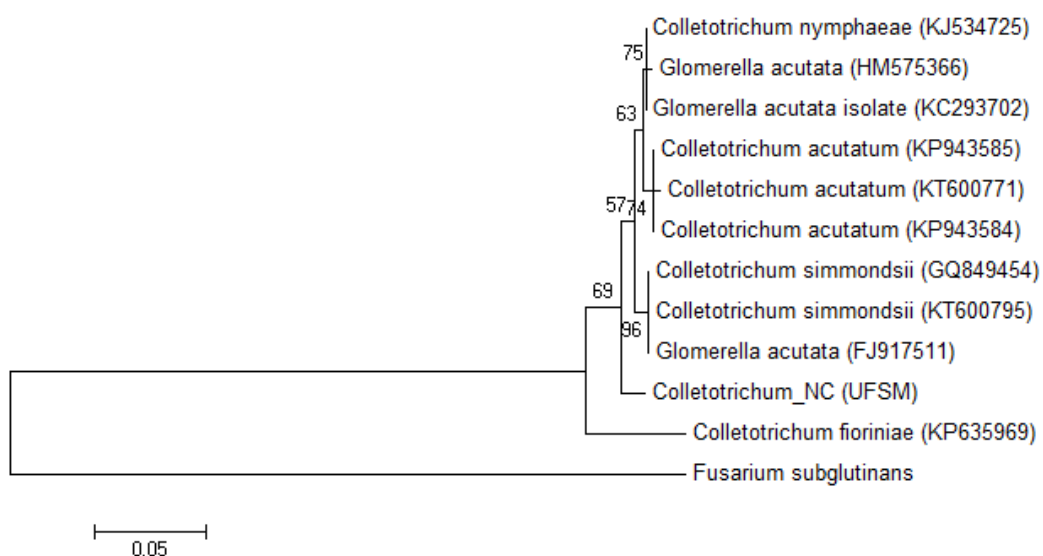


Figura 19 – Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região da calmodulina do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência

do isolado *Fusarium subglutinans* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições.

Tabela 21 – Espécie de *Colletotrichum*, acesso do GenBank, cobertura, similaridade e respectiva referência utilizadas para a construção do dendrograma da região da beta tubulina para o isolado NC.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>G. acutata</i>	AM992148	100	97	Talhinhas, et al., 2009*
<i>C. acutatum</i>	AJ409296	100	97	Talhinhas, et al., 2002
<i>C. scovillei</i>	AB777443	96	98	Moriwaki; Sato, 2013
<i>C. scovillei</i>	AB744080	100	98	Moriwaki; Sato, 2013
<i>C. scovillei</i>	KM251964	99	98	Baroncelli, et al., 2015
<i>C. ignotum</i>	GU994288	85	99	Rojas et al., 2010
<i>C. nymphaeae</i>	KM251946	99	97	Baroncelli, et al., 2015
<i>C. nymphaeae</i>	KM251938	99	97	Baroncelli, et al., 2015
<i>C. limetticola</i>	KM251962	99	98	Baroncelli, et al., 2015
<i>C. limetticola</i>	KM251963	99	98	Baroncelli, et al., 2015

*Acessos lançados no GenBank porém ainda não publicados.

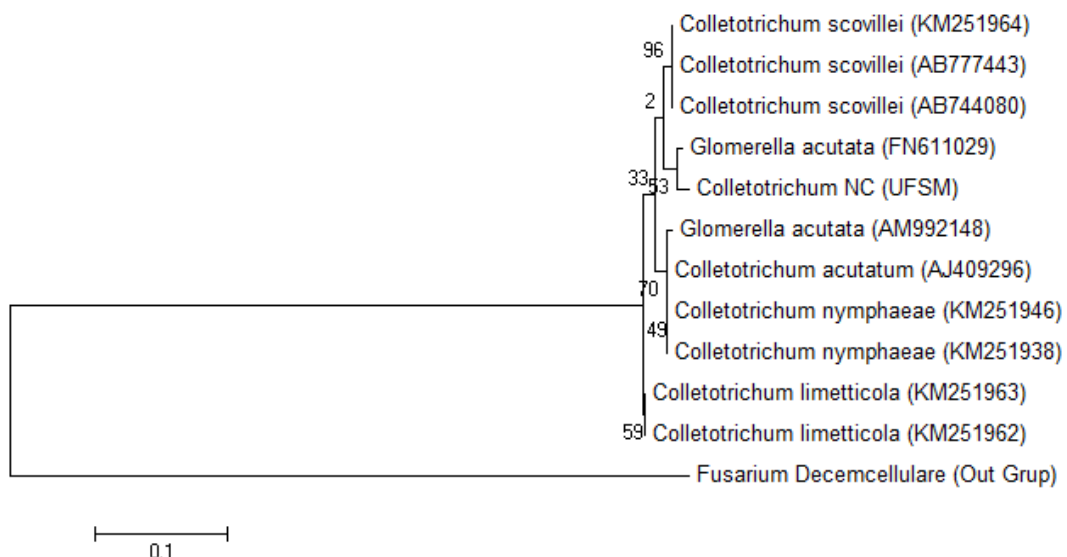


Figura 20 - Dendrograma construído pelo software Mega 3.1 a partir de uma sequência da região beta tubulina do rDNA do isolado de *Colletotrichum* sp. coletado de *Cassia fistula* comparado com os depósitos do GenBank, através do método Neighbor-Joining. A sequência do isolado *Fusarium decemcellulare* obtida no GenBank foi empregada como outgroup. Com análise de bootstrap com 1000 repetições

4.5 Controle *in vitro* de *Colletotrichum* sp. com *Trichoderma* sp.

4.5.1 Confronto direto

Nos testes com cultivo pareado, todos os tratamentos a base de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* sp., sendo que houve diferença significativa entre os tratamentos. No sétimo dia de avaliação o produto que obteve os melhores resultados de redução de crescimento micelial para todos os isolados testados foi o Agrotrich[®] sendo que os valores variaram de 52,94% (PS) e 64,93% (AG). Porém para um isolado (PS), aos sete dias não houve diferença significativa entre os produtos apresentando os valores Agrotrich[®] (52,94%), Ecotrich. O isolado que foi mais sensível e apresentou os maiores valores de redução do crescimento micelial causado por *Trichoderma* spp. foi o AG (64,93%).

Os produtos foram eficientes na redução de crescimento micelial e apresentam como constituição *T. veiride* e *T. harzianum*, sendo que a inibição de crescimento por essas espécies já foi relatada por Bomfim et al. (2010) que relataram a inibição do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* por *T. viride* e *T. harzianum*, quando analisaram a potencialidade antagônica de espécies de *Trichoderma viride*, *T. virens*, *T. harzianum* a *Rhizopus stolonifer*.

Sangeetha et al. (2009) em seu estudo realizado para o biocontrole de *C. musae* com *Trichoderma* spp., constataram valores de inibição que chegaram a 86,30%. Ressalta-se que a inibição do crescimento micelial relatada nos estudos citados anteriormente foi superior a encontrada no presente estudo, que variou de 42,16% a 64,93% no sétimo dia de avaliação.

A partir do sétimo dia de avaliação também foi possível observar que *Trichoderma* spp. começou a multiplicar-se sobre o patógeno na maioria das placas analisadas, reduzindo ainda mais o crescimento micelial do fitopatógeno. Segundo Wells, Bell e Jaworki (1972), espécies de *Trichoderma* podem ser seletivas contra diferentes espécies fúngicas, sendo que o nível de controle pode variar, dependendo do isolado e de sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies de *Trichoderma* (DENNIS; WEBSTER, 1971a,b).

Tabela 22 – Redução de crescimento micelial (%) de *Colletotrichum* sp. por produtos comerciais a base de *Trichoderma* spp.

Tempo (dias)	Produto	Isolado				CV%
		FW	AG	PS	SEB	
2	Bio	15,51 Aa*	20,98 Aa	9,62 Aa	11,56 Ab	28,46
	Eco	15,34 Ba	28,52 Aa	15,58 Ba	28,18 Aa	
	Agro	5,28 Aa	13,44 Aa	11,53 Aa	8,52 Ab	
3	Bio	22,12 Aa	22,05 Aa	11,33 Aa	15,69 Ab	19,85
	Eco	17,71 Ba	29,84 Aa	17,45 Ba	30,87 Aa	
	Agro	9,52 Aa	17,62 Aa	20,96 Aa	13,62 Ab	
4	Bio	26,79 Ab	23,68 Aa	16,96 Aa	27,70 Aa	13,17
	Eco	35,80 Ab	32,73 Aa	22,36 Ba	32,94 Aa	
	Agro	24,07 Aa	26,08 Aa	26,26 Aa	26,64 Aa	
5	Bio	52,62 Aa	29,77 Ba	32,74 Ba	50,71 Aa	21,82
	Eco	41,82 Aa	35,84 Aa	35,96 Aa	33,29 Ab	
	Agro	41,41 Aa	44,07 Aa	31,06 Aa	52,11 Aa	
6	Bio	60,72 Aa	38,56 Ba	41,02 Ba	52,04 Aa	17,1
	Eco	45,83 Ab	47,54 Aa	42,52 Aa	40,74 Aa	
	Agro	51,75 Ab	48,39 Aa	50,31 Aa	56,25 Aa	
7	Bio	54,22 Ab	42,16 Bb	46,77 Ca	54,91 Ba	12,11
	Eco	52,03 Ab	51,16 Aa	50,09 Aa	47,65 Aa	
	Agro	64,93 Aa	53,98 Aa	52,94 Aa	58,12 Ba	

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%): Coeficiente de Variação.

Mishra et al. (2010), pesquisando três isolados de *Trichoderma viride* (Tr 3, 12 e 14) contra *C. capsici*, constataram a diminuição de inibição de 66,25%, 61,23 e 62,50% respectivamente, para os diferentes isolados, dados estes semelhantes a máxima inibição encontrada no presente estudo. Porém, a maioria dos tratamentos testados alcançou índices menores de diminuição do crescimento micelial do que os encontradas na pesquisa citada. Já Amin et al. (2010), analisando *T. viride* (Tv-1) e *T. harzianum* (Th-1) sobre *C. capsici*, constataram uma inibição de 55,98% e 53,63% respectivamente, sendo estes resultados semelhantes aos observados para a maioria dos tratamentos testados no presente estudo.

O antagonismo de *Trichoderma* spp. pode ser realizado pela produção de antibióticos, de amplo espectro, como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina e dermadina, que inibe o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (DENIS e WEBSTER 1971a,b). Vey; Hoagalnd e Butt, (2001), afirmam que além de antibióticos, *Trichoderma* spp. produz

enzimas, como celulase e hemicelulase, que degradam materiais lignocelulolíticos e podem causar lise na parede de células de outros fungos. A redução do crescimento micelial e diminuição da esporulação do patógeno também podem ser causadas pelo micoparasitismo direto pelos antagonistas (BELL, WELLS e MARKHAM, 1982).

Nesta pesquisa, a ação antagônica de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum* sp, na maior parte dos tratamentos recebeu nota 2, Araújo et al., (2011) em seu trabalho testando a ação antagonista de diferentes espécies de *Trichoderma* contra *Colletotrichum gloeosporioides* relataram que o isolado de *T. virens* apresentou boa eficiência no controle do fitopatógeno o qual recebeu nota 2, enquanto os isolados de *T. viride* apresentaram eficiência menor e receberam nota 3 e outros isolados de *Trichoderma* foram altamente antagonistas (nota 1). O resultado encontrado demonstra a variação que podem ocorrer quando se testa o controle de fitopatógenos através de microorganismos, e em parte os dados encontrados por Araújo et al., (2011), corroboram com os dados da presente pesquisa.

4.5.2 Metabolitos voláteis

Houve diferença estatística entre os diferentes produtos a base de *Trichoderma* spp.e os isolados de *Colletotrichum* sp. utilizados (Tabela 18). Em relação aos componentes voláteis, após sete dias de incubação observou-se que em algumas placas, os isolados de *Trichoderma* spp.começaram a crescer sobre o *Colletotrichum* sp., uma vez que, no 6º dia, todos haviam preenchido quase a totalidade da placa de Petri (80 mm).

No segundo dia após a introdução do *Trichoderma* spp. na placa de Petri oposta ao isolados de *Colletotrichum*, já foi possível visualizar a diminuição do crescimento de todos os isolados de *Colletotrichum* sp.utilizados neste experimento, apesar do percentual de inibição ser considerado baixo (de 1,42 a 10,64 de percentual de redução de crescimento micelial), e a formulação comercial que mais se destacou foi o Biotrich[®] que proporcionou a maior redução do crescimento micelial.

O produto comercial de *Trichoderma* spp., Biotrich[®], foi a que melhor controlou *Colletotrichum* sp. *in vitro* durante todo o experimento, porém no sétimo dia de avaliação não diferiu de Ecotrich[®] para os isolados AG, PS e SEB, com níveis de redução que chegaram a 42,12%, resultado este menor que o obtido por Ajith e Lakshmidivi (2010), onde componentes voláteis de *T. harzianum* provocaram a máxima inibição (67%), sendo

importante salientar que esta espécie está presente como ingrediente ativo de dois dos três produtos utilizados (Biotrich[®], Ecotrich[®] E Agrotich[®]).

Prasad e Kumar (2011) demonstraram que metabólitos antimicrobianos produzidos por *Trichoderma* spp. são eficazes contra uma ampla gama de fitopatógenos fúngicos, por exemplo, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *C. lagenarium*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. A supressão do crescimento micelial descrita anteriormente pode ter ocorrido devido a grande variedade de metabólitos secundários voláteis produzidos pelos fungos do gênero *Trichoderma* tais como etileno, cianeto de hidrogênio, aldeídos e cetonas que desempenham papel importante no controle dos patógenos de plantas (VEY, HOAGLAND; BUTT, 2001).

Tabela 23 - Efeitos dos metabólitos voláteis (% de redução do crescimento micelial) produzidos pelos produtos a base de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum* sp. do segundo ao sétimo dia de cultivo.

Tempo (dias)	Produto	Isolado				CV%
		FW	AG	PS	SEB	
2°	Bio	2,1 Ac*	9,46 Ab	8,47 Ab	13,23 Aa	27,09
	Eco	1,95 Aa	1,42 Ba	8,63 Aa	2,47 Bb	
	Agro	1,97 Ab	3,18 Bb	5,22 Ab	10,64 Aa	
3°	Bio	7,84 Ab	12,27 Aa	10,05 Ab	14,10 Aa	11,71
	Eco	4,82 Bb	4,07 Bb	10,16 Aa	4,58 Bb	
	Agro	4,08 Bb	6,29 Bb	7,15 Bb	12,72 Aa	
4°	Bio	14,34 Ab	18,13 Aa	15,15 Ab	18,29 Aa	9,15
	Eco	7,71 Bc	7,75 Bc	18,06 Aa	11,59 Bb	
	Agro	5,58 Bc	7,62 Bc	11,36 Bb	16,58 Aa	
5°	Bio	20,79 Aa	29,36 Aa	22,69 Aa	28,97 Aa	16,2
	Eco	12,21 Bb	12,39 Bb	24,38 Aa	22,02 Aa	
	Agro	10,51Ba	13,39 Ba	19,88 Aa	22,87 Aa	
6°	Bio	25,70 Ab	35,69 Aa	25,88 Ab	32,89 Aa	27,99
	Eco	15,50 Bb	23,01 Aa	26,81 Aa	14,60 Bb	
	Agro	10,51 Bb	14,76 Bb	25,94 Aa	23,36 Aa	
7°	Bio	34,93 Ab	42,12 Aa	28,66 Ab	31,93 Ab	23,13
	Eco	19,79 Bb	30,31 Aa	23,88 Aa	27,75 Aa	
	Agro	16,49 Bb	15,04 Bb	28,67 Aa	25,82 Aa	

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%): Coeficiente de Variação.

Metabólitos voláteis possuem vantagens sobre os não voláteis, como já foi relatado por vários autores como Claydon et al. (1987) e Simon;Dunlop; Ghisalberti (1988) que afirmaram que a natureza volátil de certos antibióticos, como as pironas, produzidas por *Trichoderma harzianum* e por *T. koningii*, confere uma benefício diferente sobre inibidores não voláteis, já que sua ação antagônica pode atingir microrganismos fisicamente distantes dos sítios de produção.

Segundo Dennis e Webster (1971 b), várias espécies de *Trichoderma* são produtoras de metabólitos voláteis em meio de cultura. Esses autores comentam que os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis através da inibição do crescimento micelial e que alguns isolados, apesar de produzirem substâncias não voláteis que são eficientes no controle de fitopatógenos, muitas vezes não produzem substâncias voláteis com as mesmas propriedades.

5 CONCLUSÕES

- *Colletotrichum* é o agente causal de mancha foliar em *Cassia fistula*.
- Todos os isolados de *Colletotrichum* sp. são patogênicos a *Cassia fistula*.
- O meio de cultivo Mathur proporcionou melhores respostas de crescimento micelial e esporulação.
- O maior crescimento micelial ocorre a 25 °C, para a maior parte dos isolados analisados.
- Através da dimensão dos conídios e pigmentação da colônia é possível classificar a maioria dos isolados estudados como *Colletotrichum gloeosporioides*.
- A ferramenta PCR para as regiões amplificadas, para os isolado NC nas condições de realização do experimento, não foi eficiente para determinar a espécie.
- Para o isolado AOT e PLAN, o fator de alongação e beta-tubulina são eficientes para classificar o isolado a nível de espécie, sendo este classificado como *Colletotrichum gloeosporioides*.
- *Trichoderma* spp. pode ser utilizado no controle biológico da mancha foliar em *Cassia fistula*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELL, C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica.** 2004. 220 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil. 2004.

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

AJITH, P.S. and N. LAKSHMIDEVI. Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. Against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. **Nat. Sci.**,[S.l.],v. 8: p. 265-269, 2010.

AMIN, F. et al. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in vitro*. **Journal of Phytotherapy**, Berlin, v. 2, n.10, p. 34-37, 2010.

ANDRADE, E.M.; et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

ANDRADE, T. O. **Inventário e análise da arborização viária da Estância turística de Campos do Jordão.** 2002. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2002.

ARAÚJO, M. A. G., et al. Potencial antagônico *in vitro* de *Trichoderma* spp., originários de um sistema agroflorestral, contra *Colletotrichum gloeosporioides*. In: X CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2011 São Lourenço – MG, **Anais eletrônicos...**São Lourenço: 2011. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/1953.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2016.

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 mangaueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 21, p.208-212, 2001.

AUER C. G. e GRIGOLETTI JUNIOR A. **Ambiente Florestal.** <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/florestal/artigos/doencas_presentes_em_pinus.html> acesso em: 20 de nov de 2015.

BARBOSA, R.J.F.; MEZA, C.L.S. En el antagonismo *in vitro* *Trichoderma harzianum* acerca de *Fusarium oxysporum* schlecht f. sp *passiflora* en maracuyá (*Passiflora eduliss* ims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. **Rev. Fac. Nat. Agr.** Medellín, v.62, n.1, p.4743-4748, 2009.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, St. Paul., v. 72, n. 4, p.379-382, 1982.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. ed. São Paulo, v. 1. Ceres, p. 919, 1995.

BRAGANÇA H., et al. *Cryphonectria parasitica* in Portugal - Diversity of vegetative compatibility types mating types and occurrence of hypovirulence. **Forest Pathology**, [S.l.], 37: 391 – 402, 2007.

BOMFIM, M.P. et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stoloniferem* maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n.1, p.61-67, 2010.

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

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

CARNAÚBA, J. P. et al. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Mimosa caesalpinaefolia* Benth. no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.313, 2007.

CLAYDON, N. et al. Antifungal alkyl - pyrones produced by *Trichoderma harzianum*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, [S.l.], v.88, n.4, p.503-13, 1987.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, [S.l.], v. 26, p. 1337-1348, 2007.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: MA/IBDF, v. 1, 747 p., 1984.

COSTA, R. C.; et al. *Colletotrichum gloeosporioides* causando manchas foliares em plantas de canela-da-índia no Estado do Pará. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 3, p. 218, 2013a.

COSTA, R. C.; et al. Ocorrência de mancha foliar causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) no Estado do Pará; **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 3, p. 217, 2013b.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 648–656, 2009.

DAMM, U.; et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, 1-36, 2012.

DAMM, U.; et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 39, p. 45-87, 2009.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* Production of non-volatile antibiotics. **Trans. Brist. Mycol. Soc.**, [S.l.], v.57, p.25-39, 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. II - Production of volatile antibiotics. **Trans Bris Mycol.**, [S.l.], v.57, p.41-48, 1971.

DINIZ, S. P. S. S.; et al. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.4, p.9-11, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.l.], v. 12, p. 13-15, 1991.

ETHUR, L. Z. et al. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1801-1804, 2007.

FEITOSA, M. I.; et al. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33-54, 1977.

FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPACNPT, 1993. 128 p.

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

FUNGARO, M.H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, 2000.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, [S.I.], v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004.

GOES L. B. de O. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de tomateiro**, 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.

HARMAN, G. E. *Trichoderma* not just for biocontrol anymore. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 39, p. 103-108, 2004.

HIBBETT, D.S., et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, [S.I.], v.111: 509-547, 2007.

HOWEL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, Minnesota, v. 87, n. 1, 2003. 10 p.

HYDE, K.D.; et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 39, p. 147-182, Dec. 2009.

JUNIOR, F. B. R. et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microorganismos do solo**. Documentos/Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2002. 33p.

LAZAROTTO, M.; et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v. 13, p. 9390-9402, 2014a.

LAZAROTTO, M.; et al. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 49, p. 440-448, 2014b.

LAZAROTTO, M.; MACIEL, C.G.; MUNIZ, M. F. B. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em camélia no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 19, p. 145-147, 2013.

LEE, Y.; et al. Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour Fragrance Journal**, [S.l.], v. 23, p. 23-28, 2008.

LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.3, p.332-335, 2004.

LOPES, M. E. **Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* sp, agente causal da antracnose em goiabeira serrana (*Acca selowiana*)(O. Berg) Burret.** 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

LÓPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [S.l.], v.9, p.291-337, 2001.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Informativo. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. **Instituto Biológico**, São Paulo, n. 77, 2008.

LUXIMON-RAMMA, A.; et. al. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 18, p. 5042-5047, 2002.

MAIA, F.G.M.; et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 2, p. 205-210. 2011.

MATHUR, R. S.; BARNETT, H. L.; LILLY, V. G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, St. Paul., v. 40, n. 1, p. 104-114, Jan. 1950.

MATSUMOTO, K., A. T. Método da folha destacada para avaliar resistência da soja ao oídio. **Scientia Agraria**, Curitiba, vol. 3, p. 124, 2002.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolin* (Tass) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.57-66, 1976.

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

MENEZES, M. e HANLIN, R.T. Apressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnoses diseases. **Revista de Microbiologia**, [S.l.],v. 27, p. 247–251, 1996.

MICHEREFF, S.J. et al. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n. 6, p. 656-663, nov./dez. 2003.

MICHEREFF, S.J.; et al. Quantificação de doenças de plantas. In: **Desafio do manejo integrado de pragas e doenças**. Livro de palestras e minicursos. “Semana de fitossanidade”, Recife, p. 63-77, 2000.

MISHRA, V.K. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium phanidermatum*. **Journal of Phytology**, Berlin, v. 2, n.9, p. 28-35, 2010.

MORANDI, M.A.B. e BETTIOL, W. (2009) - Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Bettiol, W; Morandi, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p.07-14.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. s/n, p. 2044-2049. 1998.

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.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 1991.

ORWA, C.; et al. **Agroforestry database: a tree reference and selection guide version 4.0**. Giriri: Word Agroforestry Center, 2009. Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

PEREIRA I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.1 , p.117-123, 2009.

PERES, N.A.R.; et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 128-134, 2002.

PRASAD, B.N.; KUMAR, M.R. Effect of non-volatile compounds produced by *Trichoderma* spp. on growth and sclerotial viability of *Rhizoctonia solani*, incitant of sheath blight of rice. **Ind. J. Fund. Appl. Lif. Sci.**, ., [S.l.],v.1, n.2, p.37-42, 2011.

PRIHASTUTI, H.; et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 39, p. 89-109, Dec. 2009a.

PRIHASTUTI, H.; et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 147-182, 2009b.

RANATHUNGE, N. P.; et al. *Colletotrichum truncatum* Pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. **Australasian Plant Pathology**. Sep 2012, Volume 41, 463-473.

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.

REIS, M. T dos. **Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***. 2014. 117f. Dissertação (mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da Mangueira In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J.A. M. **Manual de Fitopatologia**. E. ed., São Paulo. Ed. Agron. Ceres, v.2, cap. 49, p. 511-524, 1997.

ROCAS, A. N. *Cassia fistula* L. In: VOZZO, J. A. **Tropical tree seed manual**. Washington: United States Department of Agriculture, Forest Service, p. 366-368, 2002.

- ROJAS E.I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, [S.l.], 102:1318-1338, 2010.
- ROTEM, J. Climate and weather influence on epidemics. In: HORSFALL, J. G.; DIMOND, A. E. (Ed.). **Plant disease: how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. p. 317-436.
- RUSSO, V.M.; PAPPELIS, A.J. The effects of discrete wavelenghts of light on sporulation of *Colletotrichum dematium*. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, Carbondale, v.43, p.63-69, 1990.
- SALES, T.T. et al. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* e fungos associados a mancha foliar de *Yuca elephanthipes*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, 34: 194. 2009.
- SANGEETHA, G.; et al. Biocontrol with *Trichoderma* species for the management of postharvest crown rot of nana. **Phytopathology**, St. Paul., v.48, n.1, p.214-225, 2009.
- SANTOS, E. **Nossas madeiras**. Vol. 7. Belo Horizonte: Itatiaia. Coleção Vis Mea in Labore, 1987. 313 p.
- SATO, K., et al. Differential requirements for clathrin in receptor-mediated endocytosis and maintenance of synaptic vesicle pools. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 106, 1139-44, 2009.
- SCHOCH C.L;etal. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 109, 6241–6246, 2012.
- SCHROERS, H. J. et al. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. **Mycologia**, [S.l.], v. 101, n. 1, p. 44–70, 2009.
- SERRA, I. M. R. S.; et al. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n 1, p. p. 44–70, 2011.
- SHABI, E., R. et al. 1994. Leaf spot (*Spilocaea oleaginea*) of olive in Israel and its control. **Acta Hort.**, [S.l.],v. 356 p. 390–394

SHEN, S.H.; GOODWIN, P.; HSIANG, T. Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1340-1347, 2001.

SHI, Y.J.C. et al. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. **Plant Disease**, Minnesota, v. 80: 692-696, 1996.

SHIVAS, R. G.; TAN, Y.P. 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum* in Australia, introducing *C. fiorinae* comb. Nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Diversity**. 39: 111-122.

SIMON, A. et al. *Trichoderma koningii* produces a pyrone. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, n.2, p.263-264, 1988.

SOUSA, I.T.S.; et al. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**. Florianópolis, SC, v. 22, n.3, p.77-83, 2009.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 143, n. 3., p. 183-189, 2010.

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

TALHINHAS, P.; et al. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of Lupins. **Phytopathology**, St. Paul., v. 92, p. 986-996, Sept. 2002.

TAMURA, K.; KUMAR, S.; NEI, M.. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proc. Natl Acad Sci. USA**. Jul. 27; 101(30) 2004.

TEIXEIRA, H. **Variabilidade de *Acremonium strictum* sua transmissibilidade e efeitos em sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 127 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

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

VAN'T KLOOSTER, J. W. et al. Tef1, a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 alpha. **Gene**, v. 249, n. 1-2, p. 145-151, 2000.

VARZEA, V. M. P. **Variabilidade em *Colletotrichum* spp. de cafeeiro. Pesquisa de fontes de resistência ao *C. kahawae***. 1995. 128 p. Dissertação (Investigação auxiliar) – Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, 1995.

VÁZQUEZ, J.P. M et al. Situação fitopatológica das camélias na região do Entre Douro e Minho de Portugal. **Boletín Sanidad Vegetal Plagas**[S.l.], v.28, p.609-622, 2002.

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.N. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. **Bristol: CAB International**, p.311-346, 2001.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. **Comprehensive Summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science ad Technology**, Uppsala, v. 917, 2004. 72 p. Disponível em: http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902-1_fulltext.pdf. Acesso em: 10 jan. 2016.

WADE, R. H., Microtubules: An overview. **Methodos in Molecular Medicine**, New York, v. 137, p. 1-16, 2007.

WANG, B., et al. First reports of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on ramie in China. **Plant Disease**, Minnesota, v.94, n. 4, p. 1508, 2010.

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

WELLS, H.D.; BELL, D.K.; JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* a biocontrol agent for *Sclerotium rolsfsii*. **Phytopathology**, St. Paul.,v.62, n.4, p.442-447, 1972.

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

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

WOO, S.L.; et al., The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, St. Paul., v.96, p.181-185, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho.

Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura.

Meio de cultura Ágar-água (AA)

- 17 g de Ágar;
- 1 L de água destilada.

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

Meio de cultura Mathur

- 2,0 g peptona; dextrose (2,8 gl-1)
- 2,8 g dextrose
- 1,73 g MgSO₄
- 2,72 g KH₂PO₄
- 20 g ágar
- 1 L de água destilada

Meio de cultura V8

- 100 ml de V8
- 20 g de ágar
- 900 ml de água destilada

ANEXO 2 - Descrição dos produtos comerciais utilizados no trabalho.

AGROTRICH PLUS[®] é um produto biológico à base do fungo *Trichoderma* spp. na quantidade de 10⁸ UFCs g⁻¹ de produto e farinha de arroz qsp 1,0 kg, na forma de pó seco solúvel altamente concentrado para o tratamento de sementes ou pulverização. É eficaz para prevenção de vários fungos e doenças de solo como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Phomopsis*. Pode ser aplicado de várias formas dentre elas: substrato (2 g kg⁻¹ de substrato), semente (200 a 250 g ha⁻¹ misturado às sementes), adubo (2 kg ha misturado ao adubo) e solo (2 g m⁻² incorporados superficialmente) e é recomendado para as culturas de trigo, feijão, café, e demais hortaliças. Informações no rótulo do produto.

BIOTRICH[®] é um produto biológico à base do fungo *Trichoderma* spp. Modo de ação Atua por antibiose, parasitismo, competição, indução de resistência e promoção de crescimento. Características do agente de biocontrole Composto Orgânico Biotrich à base de *Trichoderma* (um isolado de *Trichoderma viride* e três isolados de *Trichoderma harzianum*). Além da ação de combate, o produto possui efeito estimulatório direto no crescimento e no florescimento de plantas, através da ativação da Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas 57 flora microbiana, contribuindo para o aumento da fixação do nitrogênio atmosférico, favorecendo também o desenvolvimento de radículas de absorção, encurtando o tempo de emissão de raízes, evitando que a semente ou partes vegetais fiquem Formulações disponíveis e vida de prateleira Formulação em pó molhável e Premium, ambas contendo 1010 ufc/g dos agentes. Métodos de aplicação: Aplicação via pulverização ou irrigação. Em culturas irrigadas deve-se usar a água como veículo de aplicação, fazendo o plantio das mudas no período da tarde. Registro e comercialização do

ECOTRICH[®] é um Fungicida Microbiológico formulado a base do fungo *Trichoderma harzianum* IBLF006, registrado no MAPA sob o N° 04213, para o controle do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). O *Trichoderma* é um fungo saprófito e micoparásita presente em diversos tipos de solo, principalmente nos que possuem matéria orgânica e restos vegetais em decomposição. Os principais mecanismos de ação do *Trichoderma* sobre os fungos no solo são Antibiose, Competição e Predação. O *Trichoderma harzianum* IBLF006 tem diversas vantagens no uso como agente de controle biológico, pois possui um rápido crescimento e desenvolvimento e também produz grande quantidade de antibióticos e enzimas extracelulares nocivas aos fungos patógenos. Sua grande tolerância a diversas condições ambientais e crescimento no mesmo habitat onde os fungos patógenos se desenvolvem, lhe conferem as

características de um eficiente agente de biocontrole. Para a aplicação deve-se utilizar pulverizador costal ou de barra. Efetuar as aplicações de forma que possibilitem uma boa cobertura da parte aérea das plantas, sem causar escorrimento. Recomenda-se aplicar nas horas mais frescas do dia, preferencialmente no final da tarde. Evitar aplicação em condição de temperatura acima de 27 °C ou na presença de ventos fortes (velocidade acima de 10 Km/hora), bem como com umidade relativa do ar abaixo de 70%.