

Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo

Hugo José Tozze Júnior¹, Ana Carolina Firmino², Ivan Herman Fischer³, Edson Luiz Furtado⁴, Nelson Sidnei Massola Júnior¹

¹Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, CP.09, CEP 13418-900, Piracicaba, São Paulo.

²Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, Km. 651, CEP 17900-000, Dracena, São Paulo. ³Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, n. 40, CEP 17030-000, Bauru, São Paulo. ⁴Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rua José Barbosa de Barros, n.1780, CEP 18610-307, Botucatu, São Paulo.

Autor para correspondência: Hugo José Tozze Junior (htozze@gmail.com)

Data de chegada: 29/07/2014. Aceito para publicação em: 14/07/2015.

10.1590/0100-5405/2021

RESUMO

Tozze Júnior, H.J.; Firmino, A.C.; Fischer, I.H.; Furtado, E.L.; Massola Júnior, N.S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.4, p.270-280, 2015.

O Estado de São Paulo é um dos maiores produtores de frutas no Brasil. A competitividade no comércio internacional de frutas demanda a minimização de danos pós-colheita, especialmente os causados pela antracnose. Para o controle eficaz da antracnose em uma região é necessário conhecer quais espécies estão associadas a cada hospedeiro e qual a variabilidade dos agentes causais. Este trabalho objetivou caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum* de frutíferas cultivadas no Estado de São Paulo, Brasil. Foram analisados 93 isolados obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego, por meio de morfometria de conídios e

colônias e análise molecular (amplificação por PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos e análise de sequências de nucleotídeos das regiões ITS e β -tubulina). Alta variabilidade morfométrica foi observada entre os isolados. A análise molecular indicou que, no Estado de São Paulo, as antracnoses do abacate, manga, maracujá e pêssego podem ser causadas por diferentes espécies do complexo *C. gloeosporioides*, revelando também a presença de *C. boninense* associada à antracnose do maracujá e de espécies não identificadas dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* causando antracnose em pêssego.

Palavras-chave: Pós-colheita; Antracnose; Abacate; Manga; Maracujá; Pêssego.

ABSTRACT

Tozze Júnior, H.J.; Firmino, A.C.; Fischer, I.H.; Furtado, E.L.; Massola Júnior, N.S. Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.4, p.270-280, 2015.

The state of São Paulo is one of the largest fruit producers in Brazil. Competitiveness in the international trade in fruits has demanded the minimization of postharvest damage, especially that caused by anthracnose. For the effective control of anthracnose in a certain region, it is necessary to know which species are associated with each host and the variability of the causal agents. This study aimed to characterize and identify *Colletotrichum* isolates from fruit trees grown in the state of São Paulo, Brazil. A total of 93 isolates obtained from avocado, mango, passion fruit and peach were analyzed according

to conidium and colony morphology and molecular analysis (PCR amplification with species-specific primers and analysis of nucleotide sequences of the ITS regions and β -tubulin). There was high morphometric variability among isolates. Molecular analysis indicated that, in the state of São Paulo, anthracnose of avocado, mango, passion fruit and peach can be caused by different species of the *C. gloeosporioides* complex, also revealing the presence of *C. boninense* associated with passion fruit anthracnose and unidentified species of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* complexes causing anthracnose in peach.

Additional key-words: Postharvest; anthracnose; avocado; mango; passion fruit; peach.

O gênero *Colletotrichum*, responsável por doenças conhecidas como antracnoses, é considerado um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos do mundo (10). Esses fungos estão distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais e afetam especialmente a produção de frutas (8). A antracnose é frequentemente causada por mais de uma espécie de *Colletotrichum*. O abacateiro, por exemplo, pode ser infectado por *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. acutatum* J.H. Simmonds e por *C. boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib. (5, 23) que também

causam antracnose em maracujá (3, 14, 27). Por sua vez, a manga e o pêssego são hospedeiros tanto de *C. gloeosporioides* como de *C. acutatum* (1, 2, 6, 12, 16, 22).

A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro dificulta o controle da antracnose. Este fato se deve ao comportamento diferenciado entre espécies, como já foi verificado para a antracnose do pimentão no Brasil, que pode ser causada por cinco espécies distintas de *Colletotrichum* com reações diferentes aos fungicidas utilizados no seu controle (26). Desta forma,

para cada doença, é importante conhecer quais espécies do agente causal ocorrem, quais predominam, e qual a variabilidade intra e inter-específica do patógeno, regionalmente.

Os estudos de caracterização baseados na integração de métodos são fundamentais para que se identifique corretamente e se conheça a amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de medidas de controle eficazes da doença (7).

Este trabalho objetivou caracterizar e identificar isolados de *Colletotrichum* causadores de antracnose em frutíferas no Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados utilizados

Utilizaram-se 93 isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego coletados no Estado de São Paulo (Tabela 1). Todos os isolados tiveram a patogenidade confirmada no hospedeiro de origem por meio de inoculações segundo Cai et al. (7), reproduzindo sintomas típicos da antracnose.

Caracterização morfo-cultural

Discos de BDA Acumedia® com 6 mm de diâmetro, contendo estruturas do fungo, foram retirados das bordas de colônias com 5 dias de cada isolado e transferidos para o centro de placas de Petri contendo o mesmo tipo de meio. Após a transferência, os isolados foram incubados nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35±1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Diariamente mensuraram-se diâmetros perpendiculares das colônias com paquímetro. A velocidade média de crescimento da colônia, expressa em milímetros por dia, foi utilizada para as análises estatísticas. Após cinco dias de cultivo, avaliou-se a coloração da colônia e a presença de escleródios, setas e massa de esporos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada parcela experimental composta por uma placa. Os dados correspondentes à velocidade de crescimento da colônia dos isolados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (UFLA, Lavras).

A caracterização morfológica foi realizada com lâminas semi-permanentes, preparadas com lactofenol, contendo conídios obtidos de colônias de cada isolado, cultivadas em meio de aveia (40 g de aveia, 15 g de agar, 1 L de água destilada) por 7 dias, sob luz constante e temperatura de 25±1 °C. Cem conídios de cada isolado foram classificados de acordo com os seguintes formatos: (1) fusiforme, com ápices afilados; (2) oblongo, com ápices arredondados; (3) clavado, afilado em uma extremidade e oblongo na outra; (4) oblongo com constrição na região mediana (28). O comprimento, largura e relação entre o comprimento e a largura dos conídios, foram determinados pela mensuração de 50 conídios de cada isolado. Para as análises morfológicas foi utilizado sistema de vídeo-câmara instalado em microscópio óptico Opton®, modelo TA-0124XS. A imagem foi transmitida para computador e analisada por meio do programa EDN-2, previamente calibrado com a utilização de lâmina micrométrica. Os resultados da morfometria foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (UFLA, Lavras).

Caracterização molecular

A extração de DNA foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray & Thompson (17). O DNA obtido foi quantificado em GenQuant (Pharmacia, Biotech, San Francisco, CA, EUA), à razão A260nm/A280nm e as suspensões diluídas até a concentração de 10 ng DNA/μL. A reação de polimerase em cadeia para identificação do gênero *Colletotrichum* foi realizada com os oligonucleotídeos Cc1F1 (5'-ACC TAA CTG TTG CTT CGG CG-3') e Cc2R1 (5'-AAA TTT GGG GGT TTT ACG GC-3'), de acordo com Cullen et al. (9). Para identificação do complexo *C. acutatum* utilizaram-se os oligonucleotídeos CaInt2 (5'-GGG GAA GCC TCT CGC GG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), conforme Sreenivasaprasad et al. (24). A identificação do complexo *C. gloeosporioides* foi realizada pelos oligonucleotídeos CgInt (5'-GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG-3') e ITS4 segundo Mills et al. (16). Os oligonucleotídeos Col1 (5'-GCC GTC CCC TGA AAA G-3') e ITS4, desenvolvidos para uma espécie de *Colletotrichum* não identificada que ocorre em algumas frutíferas na Colômbia e que amplificaram fragmentos de DNA de isolados do complexo *C. boninense* no trabalho de Pileggi et al. (20) foi utilizado de acordo com Afanador-Kafuri et al. (2). Após a amplificação, os produtos das PCRs foram aplicados em gel de agarose 1% contendo 0,5 μL/mL de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada em corrente constante de 5 volts/cm por 1 h. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta e fotografadas. Todas as análises foram realizadas utilizando-se amostras de DNA de isolados padrões das espécies *C. acutatum* (TUT-137), *C. gloeosporioides* (AVO-33-4B) e *Colletotrichum* sp. (Man-76), o qual reage com os oligonucleotídeos Col1/ITS4 (2).

Para a análise das sequências de nucleotídeos, isolados representativos dos hospedeiros estudados tiveram a região ITS-5.8S rDNA amplificada com os pares de oligonucleotídeos ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS 4, que geram um fragmento de aproximadamente 600 pb (29). A região do gene da β-tubulina foi amplificada com os oligonucleotídeos Bt2-F (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3') e Bt2-R (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'), gerando um fragmento de aproximadamente 500 pb (13). Para sequenciamento dos fragmentos amplificados, 100 μL do produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®). O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen, Seul, Coreia do Sul, utilizando-se o kit BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing, em sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas usando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005), concatenadas com o auxílio do programa Mega 5.05 e alinhadas pelo Clustal W. A árvore filogenética foi construída pelo programa Mega 5.05 usando o modelo de comparação *Neighbor-Joining* com o método "p-distance" (18). A consistência dos agrupamentos foi verificada com *bootstrap* de 10.000 replicações. Sequências de isolados pertencentes a diferentes espécies foram obtidas do GenBank e utilizadas na análise (Tabela 2).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Caracterização morfo-cultural

As colônias, após cinco dias de cultivo à 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, apresentaram crescimento denso e cotonoso. Para 60,2% dos isolados o micélio demonstrou-se predominantemente branco-acizentado, enquanto os demais isolados produziram colônias com micélio cinza (Figura 1). O reverso da colônia foi predominantemente castanho para 86,0 % dos isolados, salmão para 12,9% dos isolados e

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

Denominação	Hospedeiro	Município de origem	Ano de Coleta	Denominação	Hospedeiro	Município de origem	Ano de Coleta
AV-01	Abacate	Itapetininga, SP	2008	MN-49	Manga	Borborema, SP	2009
AV-02	Abacate	Itapetininga, SP	2008	MN-50	Manga	Jaú, SP	2009
AV-03	Abacate	Olimpia, SP	2008	MN-51	Manga	Jaboticabal, SP	2009
AV-04	Abacate	Piracicaba, SP	2008	MN-52	Manga	Borborema, SP	2009
AV-05	Abacate	Bauru, SP	2008	MN-53	Manga	Bauru, SP	2009
AV-06	Abacate	Bauru, SP	2008	MN-54	Manga	Bauru, SP	2009
AV-07	Abacate	Limeira, SP	2008	MN-55	Manga	Monte Alto, SP	2009
AV-08	Abacate	Piracicaba, SP	2008	MN-56	Manga	Magda, SP	2009
AV-09	Abacate	Olimpia, SP	2008	MN-57	Manga	Cabrália Paulista, SP	2009
AV-10	Abacate	Bernardino de Campos, SP	2008	MN-58	Manga	Botucatu, SP	2009
AV-11	Abacate	Bauru, SP	2008	PS-59	Maracujá	Adamantina, SP	2007
AV-12	Abacate	Limeira, SP	2008	PS-60	Maracujá	Bauru, SP	2010
AV-13	Abacate	Bernardino de Campos, SP	2008	PS-61	Maracujá	Jaú, SP	2007
AV-14	Abacate	Bauru, SP	2008	PS-62	Maracujá	Valinhos, SP	2007
AV-15	Abacate	Dois Córregos, SP	2008	PS-63	Maracujá	Bariri, SP	2007
AV-16	Abacate	Itapetininga, SP	2008	PS-64	Maracujá	Campinas, SP	2007
AV-17	Abacate	Piracicaba, SP	2008	PS-65	Maracujá	Campinas, SP	2007
AV-18	Abacate	Piracicaba, SP	2008	PS-66	Maracujá	Irapuru, SP	2007
AV-19	Abacate	Olimpia, SP	2008	PS-67	Maracujá	Valinhos, SP	2007
AV-20	Abacate	Jardinópolis, SP	2008	PS-68	Maracujá	Irapuru, SP	2007
AV-21	Abacate	Dois Córregos, SP	2008	PS-69	Maracujá	Adamantina, SP	2007
AV-22	Abacate	Bernardino de Campos, SP	2008	PS-70	Maracujá	Pacaembu, SP	2007
AV-23	Abacate	Limeira, SP	2008	PS-71	Maracujá	Bauru, SP	2007
AV-24	Abacate	Bernardino de Campos, SP	2008	PE-72	Pêssego	Paranapanema, SP	2010
AV-25	Abacate	Bernardino de Campos, SP	2008	PE-73	Pêssego	Paranapanema, SP	2010
AV-26	Abacate	Dois Córregos, SP	2008	PE-74	Pêssego	Botucatu, SP	2010
AV-27	Abacate	Jardinópolis, SP	2008	PE-75	Pêssego	Botucatu, SP	2010
AV-28	Abacate	Olimpia, SP	2008	PE-76	Pêssego	Botucatu, SP	2010
AV-29	Abacate	Itapetininga, SP	2008	PE-77	Pêssego	Botucatu, SP	2010
AV-30	Abacate	Jardinópolis, SP	2008	PE-78	Pêssego	Marília, SP	2010
MN-31	Manga	Jaboticabal, SP	2009	PE-79	Pêssego	Marília, SP	2010
MN-32	Manga	Bauru, SP	2009	PE-80	Pêssego	Marília, SP	2010
MN-33	Manga	Cabrália Paulista, SP	2009	PE-81	Pêssego	Pindorama, SP	2010
MN-34	Manga	Monte Alto, SP	2009	PE-82	Pêssego	Bauru, SP	2010
MN-35	Manga	Magda, SP	2009	PE-83	Pêssego	Bauru, SP	2010
MN-36	Manga	São José do Rio Preto, SP	2009	PE-84	Pêssego	Paranapanema, SP	2010
MN-37	Manga	Borborema, SP	2009	PE-85	Pêssego	Paranapanema, SP	2010
MN-38	Manga	Bauru, SP	2009	PE-86	Pêssego	Paranapanema, SP	2010
MN-39	Manga	Monte Alto, SP	2009	PE-87	Pêssego	Pindorama, SP	2010
MN-40	Manga	Cabrália Paulista, SP	2009	PE-88	Pêssego	Bauru, SP	2010
MN-41	Manga	Magda, SP	2009	PE-89	Pêssego	Pindorama, SP	2010
MN-42	Manga	Jaú, SP	2009	PE-90	Pêssego	Pindorama, SP	2010
MN-43	Manga	Borborema, SP	2009	PE-91	Pêssego	Bauru, SP	2010
MN-45	Manga	Catanduva, SP	2009	PE-92	Pêssego	Paranapanema, SP	2010
MN-46	Manga	Monte Alto, SP	2009	PE-93	Pêssego	Pindorama, SP	2010
MN-47	Manga	São José do Rio Preto, SP	2009	PE-94	Pêssego	Paranapanema, SP	2010
MN-48	Manga	Jaú, SP	2009				

Tabela 2. Sequências de nucleotídeos obtidas do GenBank de isolados representativos de espécies utilizadas na análise filogenética.

Espécie	Isolado	Acesso		Hospedeiro	Origem
		ITS	β -tubulina		
<i>C. siamense</i>	ICMP17795	JX010162	JX010393	<i>Malus domestica</i>	USA
<i>C. siamense</i>	ICMP18578	JX010171	JX010404	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia
<i>C. fructicola</i>	ICMP18581	JX010165	JX010405	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia
<i>C. fructicola</i>	CBS125397	JX010173	JX010409	<i>Tetragastris paramensis</i>	Panamá
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP1778	JX010276	JX010414	<i>Carica papaya</i>	Austrália
<i>C. alienum</i>	ICMP12071	JX010251	JX010411	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia
<i>C. salsolae</i>	ICMP19051	JX010242	JX010403	<i>Salsola tragus</i>	Hungria
<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP17673	JX010176	JX010392	<i>Aeshynomene virginica</i>	USA
<i>C. tropicale</i>	CBS124949	JX010264	JX010407	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá
<i>C. asianum</i>	ICMP18580	FJ972612	JX010406	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI356875	JX010152	JX010445	<i>Citrus</i>	Itália
<i>C. musae</i>	CBS116870	JX010146	HQ596880	<i>Musa</i> sp.	USA
<i>C. musae</i>	ICMP17817	JX010142	JX010395	<i>Musa</i> sp.	Quênia
<i>C. theobromicola</i>	ICMP17814	JX010288	JX010379	<i>Fragaria vesca</i>	USA
<i>C. clidemiae</i>	ICMP18658	JX010265	JX010438	<i>Clidemia hirta</i>	USA
<i>C. psidii</i>	CBS14529	JX010219	JX010443	<i>Psidii</i> sp.	Itália
<i>C. kahawae</i>	ICMP18539	JX010230	JX010434	<i>Olea europaea</i>	Austrália
<i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>camelliae</i>	ICMP10643	JX010224	JX010436	<i>Camellia x williamsii</i>	Reino Unido
<i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>camelliae</i>	ICMP18542	JX010223	JX010429	<i>Camellia sasanqua</i>	USA
<i>C. horii</i>	NBRC7478	GQ329690	JX010450	<i>Diospyros kaki</i>	Japão
<i>C. horii</i>	ICMP12942	GQ329687	JX010375	<i>Diospyros kaki</i>	Nova Zelândia
<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP45094	JX010261	JX010443	<i>Xanthorrhoea preissi</i>	Austrália
<i>C. alatae</i>	CBS304.67	JX010190	JX010383	<i>Dioscorea alata</i>	Índia
<i>C. boninense</i>	C01139	GU935881	GU935901	-	-
<i>C. acutatum</i>	CBS112996	JQ005776	JQ005839	<i>Carica papaya</i>	Austrália
<i>C. paxtonii</i>	CPC18868	JQ948285	JQ959606	<i>Musa</i> sp.	Santa Lucia
<i>C. simmondsii</i>	CBS122122	JQ948276	JQ949597	<i>Carica papaya</i>	Austrália
<i>C. cosmi</i>	CBS853.73	JQ948274	JQ949595	<i>Cosmos</i> sp.	Holanda
<i>C. walleri</i>	CBS125958	JQ948245	JQ949896	-	-
<i>C. indonesiense</i>	CBS127551	JQ948288	JQ949609	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonésia
<i>C. guajavae</i>	IMI350839	JQ948270	JQ949591	<i>Psidium guajava</i>	Índia
<i>C. brisbanense</i>	CBS292.67	JQ948291	JQ949612	<i>Capsicum annum</i>	Austrália
<i>C. sloanei</i>	IMI364297	JQ948287	JQ949608	<i>Theobroma cacao</i>	Malásia
<i>C. nymphaeae</i>	CBS112202	JQ948234	JQ949555	<i>Fragaria</i> sp.	Espanha

um único isolado (AV-22) produziu colônias com reverso cinza. Não foram detectados escleródios e setas nas colônias e 29% dos isolados produziram massas conidiais, de cor laranja (Tabela 3).

O maior desenvolvimento das colônias ocorreu a 25 °C, com exceção do isolado AV-09, que teve maior crescimento a 30 °C. Em todas as temperaturas, observou-se grande variabilidade entre isolados, independente do hospedeiro ou região de origem. A 25 °C, os isolados foram classificados em 13 grupos pelo teste de Scott-Knott a 5% de

probabilidade (Tabela 3). Menor desenvolvimento das colônias ocorreu quando incubadas a 35 °C. Entre os isolados de maracujá e pêssego, houve grande variabilidade no crescimento dos isolados a 35 °C. Em média, as colônias cultivadas a 35 °C cresceram 62,4% menos que as incubadas a 25 °C para os isolados de maracujá e 45,4% menos para os isolados de pêssego. Os isolados de abacate apresentaram menor variação na taxa de crescimento da colônia a 35 °C e tiveram redução média de 52,9%, quando comparadas às colônias incubadas a 25 °C. Os

isolados de manga foram mais sensíveis ao aumento da temperatura de incubação e, em média, as colônias cultivadas a 35 °C cresceram 78,9% menos que as colônias incubadas a 25 °C. Essa característica indica que os isolados de manga são distintos dos isolados das demais frutíferas, o que pode estar relacionado à especialização dos mesmos ao hospedeiro. Alta variabilidade cultural e presença de características comuns a mais de uma espécie ou complexo de espécies de *Colletotrichum* descritas na literatura (15, 25), como coloração das colônias e massa de esporos, impossibilitou a clara identificação específica dos isolados com base exclusivamente nas características avaliadas.

Todos os isolados de abacate, manga e maracujá e 14 isolados de pêssego (PE-72, PE-78, PE-79, PE-80, PE-81, PE-84, PE-85, PE-86, PE-87, PE-89, PE-90, PE-92, PE-93, PE-94) apresentaram predominância de conídios retos, hialinos, unicelulares, oblongos e com ápices arredondados (Figura 2), formato descrito com sendo característico das espécies do complexo *C. gloeosporioides* (25). O comprimento médio de conídios variou de 11,7 a 15,7 µm entre os isolados de abacate, de 11,4 a 15,1 µm entre os isolados de manga, de 12,2 a 14,8 µm entre os isolados de maracujá e de 10,5 a 13,1 µm para os isolados de pêssego. A largura média de conídios variou de 3,3 a 4,0 µm entre os isolados de abacate, de 2,9 a 4,1 µm para os isolados de manga, de 3,7 a 4,7 µm entre os isolados de maracujá e de 2,9 a 4,1 µm para os isolados de pêssego. Quanto às relações entre o comprimento e a largura dos conídios, observaram-se valores entre 3,3 e 4,3 para isolados de abacate, 3,2 e 4,7 para os isolados de manga, de 2,9 a 3,7 para os isolados de maracujá e de 3,1 a 4,5 para os isolados de pêssego.

Os demais isolados de pêssego (PE-73, PE-74, PE-75, PE-76, PE-77, PE-82, PE-83, PE-88 e PE-91) apresentaram predominância de conídios retos, hialinos, unicelulares, fusiformes, com ápices afilados (Figura 2), formato descrito como sendo característico para espécies do complexo *C. acutatum* (25). Esses isolados produziram conídios com comprimento médio entre 10,0 e 14,6 µm, largura média entre 3,6 e 4,2 µm e relação entre o comprimento e largura de 2,8 a 3,8 (Tabela 3).

A morfometria dos conídios também não permitiu a identificação de espécies de *Colletotrichum*. Embora os formatos de conídios tenha permitido agrupar os isolados em dois grupos, sugerindo a existência de pelo menos duas espécies ou complexos de espécies, as dimensões dos conídios mostraram-se sobrepostas entre esses grupos, dificultando a interpretação dos resultados. Fato similar foi constatado por Andrade et al. (4), em estudo sobre a antracnose do mamoeiro, os quais verificaram que a maioria dos isolados apresentaram dimensões dentro da faixa em que há sobreposição entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* impossibilitando a clara identificação das espécies.

Caracterização molecular

O par de oligonucleotídeos Cc1F1 e Cc2R1, específicos para o gênero *Colletotrichum*, amplificou um fragmento de DNA de 447 pb para todos os isolados, confirmando que pertencem a esse gênero. O isolado padrão de *C. acutatum* e nove isolados de pêssego (PE-73, PE-74, PE-75, PE-76, PE-77, PE-82, PE-83, PE-88, PE-91), que apresentaram formato de conídios similar ao descrito para o complexo *C. acutatum*, tiveram fragmentos de DNA com 490 pb amplificados com o uso do par de oligonucleotídeo CaInt2 e ITS4 (Tabela 4). O isolado padrão de *C. gloeosporioides*, todos os isolados de abacate, manga e 14 isolados de pêssego (PE-72, PE-78, PE-79, PE-80, PE-81, PE-84, PE-85, PE-86, PE-87, PE-89, PE-90, PE-92, PE-93, PE-94) assim como três isolados de

maracujá (PS-62, PS-66, PS-68), que apresentaram formato de conídios similar ao descrito para o complexo *C. gloeosporioides*, foram positivos em PCR com os oligonucleotídeos CgInt e ITS4, os quais amplificaram fragmentos de DNA com 450 pb. Nenhum isolado teve fragmentos de DNA amplificados em PCR utilizando-se os oligonucleotídeos Col1/ITS4, exceto o isolado Man-76, utilizado como padrão positivo para esses oligonucleotídeos (2). Para 10 isolados, todos obtidos de maracujá (PS-59, PS-60, PS-61, PS-63, PS-64, PS-65, PS-67, PS-69, PS-70, PS-71), não houve fragmentos de DNA amplificados pelos pares de oligonucleotídeos espécie-específicos utilizados nas PCRs.

A análise filogenética das sequências nucleotídicas concatenadas das regiões ITS e β -tubulina revelou que os isolados avaliados apresentam similaridades com isolados pertencentes às espécies dos complexos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, cujas sequências foram obtidas no GenBank (Figura 3).

Todos os isolados de abacate e de manga compuseram cladogramas com os isolados das espécies do complexo *C. gloeosporioides*, corroborando as análises morfo-culturais e por PCR. Para os isolados de abacate houve agrupamento entre AV-15 e *C. siamense* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde, entre AV-05 e *C. fructicola* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde, entre AV-22, AV-23 e *C. queenslandicum* B.S. Weir & P.R. Johnst., entre AV-27 e *C. alienum* B.S. Weir & P.R. Johnst. e entre AV-03 e *C. gloeosporioides*. Por sua vez, todos os isolados de manga (MN-45, MN-48, MN-51, MN-57, MN-58) agruparam no clado de *C. asianum* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde. Dos isolados de maracujá e pêssego identificados por características morfo-culturais e por PCR como sendo pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, foram constatados agrupamentos dos isolados PS-68 e PE-93 com *C. siamense*, de PS-62 com *C. queenslandicum* e de PS-66 com *C. asianum*.

Os isolados de maracujá PS-59, PS-63 e PS-64, que não tiveram fragmentos de DNA amplificados por PCR com oligonucleotídeos específicos, agruparam no clado com *C. boninense* (C01139), com alto suporte bootstrap.

Os isolados de pêssego PE-72 e PE-92 agruparam com isolados do complexo *C. gloeosporioides* e os isolados PE-73 e PE-74 agruparam com isolados do complexo *C. acutatum*, confirmando os resultados morfo-culturais e por PCR, porém, não compuseram cladogramas com espécies específicas dentro desses complexos, indicando que esses isolados são geneticamente distintos das espécies avaliadas neste trabalho.

Analisando conjuntamente os resultados pode-se concluir que as características morfo-culturais e a identificação por PCR utilizando os oligonucleotídeos CgInt/ITS 4 e CaInt2/ITS4 são úteis como ferramentas complementares para identificação dos complexos de espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, porém não são suficientes para identificação precisa das espécies do gênero *Colletotrichum*, assim como já reportado por outros autores (7, 15). De acordo com os resultados da caracterização morfo-cultural e da identificação molecular por PCR, apenas alguns isolados de pêssego puderam ser identificados como pertencentes ao complexo de espécies *C. acutatum* e a maioria dos isolados pode ser classificado no complexo de espécies *C. gloeosporioides*, que esteve associado à antracnose das quatro espécies frutíferas avaliadas. A espécie *C. gloeosporioides* é considerada por alguns autores como sendo o único agente causal da antracnose do abacate, manga e maracujá no Brasil (11, 19, 21). Entretanto, a análise filogenética das regiões ITS-5.8S rDNA e β -tubulina indicou que, no Estado de São Paulo, outras

Tabela 3. Características culturais e morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego coletados no Estado de São Paulo.

Isolado	Taxa de crescimento da colônia(mm/dia)					Coloração da colônia (superior/inferior)	Massa conidial ²	Dimensões dos conídios			Formato dos conídios ³ (%)														
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C			Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comp./Larg.	1	2	3	4											
AV-01	6,4	a ¹	8,5	b	9,4	h	9,1	e	5,7	e	branca acinzentada / castanho	-	13,4	c	(10,3-17,2)	3,9	e	(2,9-4,8)	3,5	e	(2,3-5,0)	0	97	0	3
AV-02	4,5	f	8,1	c	12,3	b	9,8	c	5,1	f	branca acinzentada / castanho	-	11,8	e	(9,5-14,3)	3,5	g	(2,9-4,0)	3,4	e	(2,6-4,9)	0	92	4	4
AV-03	5,3	c	8,5	b	9,4	h	8,6	f	5,3	f	cinza / castanho à cinza	+	13,3	c	(11,0-15,4)	4,0	d	(3,7-4,4)	3,4	e	(2,5-4,2)	0	87	5	8
AV-04	4,7	e	6,9	f	10,2	g	7,9	h	7,8	b	branca acinzentada / castanho	-	12,3	e	(10,3-14,3)	3,7	f	(3,3-5,1)	3,3	f	(2,3-4,3)	1	89	7	3
AV-05	4,9	e	6,9	f	12,3	b	9,5	d	7,9	b	cinza claro / castanho à cinza	+	12,9	d	(9,5-15,0)	3,8	e	(2,9-4,4)	3,4	e	(2,4-5,1)	0	85	7	8
AV-06	5,3	c	8,3	c	10,8	e	8,9	e	5,3	f	branca acinzentada / castanho	-	13,1	c	(11,0-15,4)	3,9	e	(3,3-4,8)	3,4	e	(2,5-4,7)	0	96	2	2
AV-07	5,7	b	7,9	d	12,2	b	9,8	c	5,0	f	branca acinzentada / castanho	-	12,2	e	(9,5-17,2)	3,3	i	(2,9-4,0)	3,7	d	(2,4-5,3)	0	87	5	8
AV-08	5,8	b	7,8	d	10,4	f	7,8	h	3,6	h	branca acinzentada / branca a salmão	+	12,1	e	(10,3-14,3)	3,7	f	(2,6-4,4)	3,3	f	(2,5-4,6)	0	76	6	18
AV-09	6,7	a	8,7	b	9,4	h	9,8	c	6,6	c	branca acinzentada / castanho	-	12,3	e	(9,5-17,2)	3,5	h	(2,6-5,5)	3,6	d	(2,3-5,6)	0	89	7	4
AV-10	4,3	f	8,5	b	10,1	g	8,6	f	4,0	h	branca acinzentada / castanho	-	12,7	d	(9,5-18,0)	3,6	f	(2,9-5,1)	3,5	e	(2,6-4,9)	0	88	4	8
AV-11	5,8	b	8,0	c	10,8	e	8,6	f	2,6	i	branca acinzentada / castanho	-	11,7	f	(9,5-13,2)	3,6	f	(2,9-4,4)	3,3	f	(2,5-4,5)	0	98	0	2
AV-12	4,2	f	7,7	d	10,2	g	8,4	f	3,5	h	cinza claro / castanho à cinza	-	13,1	c	(8,8-15,4)	3,8	e	(2,9-5,1)	3,5	e	(2,4-4,2)	0	79	6	15
AV-13	4,5	f	8,1	c	12,6	a	9,6	c	3,2	i	cinza claro / castanho à cinza	+	15,7	a	(12,5-19,1)	3,7	f	(2,9-4,4)	4,3	b	(3,0-5,7)	0	95	1	4
AV-14	5,7	b	8,5	b	9,7	h	8,5	f	6,0	d	branca acinzentada / salmão	+	13,3	c	(11,0-15,4)	3,6	f	(2,9-4,0)	3,7	d	(3,0-5,3)	0	96	2	2
AV-15	4,9	d	7,8	d	11,5	c	10,1	a	5,0	f	branca acinzentada / castanho	-	13,3	c	(11,0-15,0)	3,7	f	(3,3-4,4)	3,6	d	(2,7-4,6)	0	88	4	8
AV-16	5,1	d	9,1	a	11,6	c	10,1	a	4,1	h	cinza claro / castanho à cinza	+	12,7	d	(9,5-16,5)	3,8	e	(2,9-4,8)	3,3	f	(2,6-4,5)	0	97	0	3
AV-17	3,5	i	6,0	h	8,2	j	6,5	k	6,9	c	cinza claro / salmão	+	11,9	e	(9,5-14,3)	3,6	g	(2,6-4,0)	3,3	f	(2,4-4,3)	0	89	5	6
AV-18	4,5	f	8,8	a	11,6	c	9,3	d	2,0	j	branca acinzentada / castanho	-	13,4	c	(9,5-15,4)	3,7	f	(3,3-4,4)	3,6	d	(2,6-4,7)	0	95	2	3
AV-19	3,7	h	4,4	k	10,4	f	9,9	b	6,2	d	branca acinzentada / castanho	-	12,3	e	(10,3-14,3)	3,6	g	(2,9-4,4)	3,5	e	(2,5-4,3)	0	96	0	4
AV-20	4,5	f	8,0	c	11,6	c	9,3	d	5,8	e	branca acinzentada / castanho	-	12,8	d	(10,3-19,8)	3,3	i	(2,6-5,5)	3,8	c	(3,1-4,9)	0	88	5	7
AV-21	5,6	b	8,2	c	12,2	b	10,2	a	7,0	c	cinza claro / castanho à cinza	+	14,2	b	(11,7-17,2)	3,5	h	(2,9-4,0)	4,1	c	(3,1-5,3)	0	96	0	4
AV-22	4,6	f	7,3	e	11,2	d	10,0	b	5,6	e	cinza / cinza	+	12,6	d	(9,5-15,0)	3,6	g	(2,9-4,0)	3,5	e	(2,6-4,6)	0	89	5	6
AV-23	5,2	c	8,5	b	12,3	b	8,3	g	5,1	f	cinza / castanho à cinza	-	12,0	e	(9,5-15,4)	3,6	g	(2,9-4,4)	3,4	e	(2,6-4,9)	0	94	0	6
AV-24	3,7	h	6,0	h	8,2	j	8,1	g	3,4	h	branca acinzentada / castanho	-	13,5	c	(11,0-16,5)	3,9	e	(3,7-5,1)	3,5	e	(2,5-4,5)	0	98	0	2
AV-25	4,2	f	7,1	e	10,2	g	9,4	d	5,3	f	branca acinzentada / castanho	-	13,1	c	(10,3-17,2)	3,7	f	(2,9-5,1)	3,6	d	(2,5-4,9)	0	77	8	15
AV-26	5,0	d	8,9	a	12,8	a	10,3	a	4,5	g	branca acinzentada / castanho	-	13,2	c	(11,0-18,0)	3,4	h	(2,6-4,4)	3,9	c	(2,5-4,9)	0	90	4	6
AV-27	5,9	b	8,5	b	11,1	d	8,6	f	6,2	d	branca acinzentada / castanho	-	14,0	b	(11,0-16,5)	3,8	e	(3,7-4,4)	3,7	d	(2,5-4,5)	0	94	2	4
AV-28	5,4	c	8,0	c	12,7	a	9,5	d	7,1	c	branca acinzentada / castanho	-	13,2	c	(10,3-17,2)	3,8	e	(2,9-4,8)	3,5	e	(2,5-5,6)	0	98	0	2
AV-29	3,7	h	6,5	g	9,3	h	7,0	i	5,6	e	branca acinzentada / salmão	+	14,5	b	(11,0-18,0)	3,7	f	(2,9-4,4)	4,0	c	(3,0-5,4)	0	90	0	10
AV-30	5,1	d	7,5	e	11,3	d	10,3	a	2,2	j	cinza / castanho à cinza	-	13,2	c	(10,3-17,2)	3,7	f	(2,9-4,0)	3,6	d	(2,8-4,7)	0	94	1	5
MN-31	4,8	e	7,8	d	9,0	i	7,1	i	1,8	j	branca acinzentada / castanho	-	14,2	b	(11,0-18,3)	3,8	e	(2,9-4,8)	3,8	c	(2,5-4,7)	3	84	6	7
MN-32	3,6	i	6,8	f	9,6	h	8,6	f	1,6	k	cinza claro / castanho à cinza	-	15,0	a	(12,5-17,6)	3,9	e	(2,9-4,4)	3,9	c	(2,8-6,0)	0	95	3	2
MN-33	3,4	i	7,2	e	11,4	d	8,0	g	1,8	j	branca acinzentada / castanho	-	13,2	c	(10,3-15,4)	4,1	d	(3,3-4,4)	3,3	f	(2,3-4,0)	3	86	5	6
MN-34	3,3	i	5,4	i	7,0	l	6,1	l	1,7	k	branca acinzentada / castanho	-	14,2	b	(11,7-16,9)	3,7	f	(3,3-4,8)	3,8	c	(2,7-4,9)	0	93	3	4
MN-35	5,1	d	8,0	c	12,4	b	8,1	g	1,6	k	branca acinzentada / castanho	-	13,3	c	(10,3-16,9)	3,7	f	(2,9-5,1)	3,7	d	(2,6-5,0)	2	89	6	3
MN-36	4,1	g	6,6	g	10,2	g	8,1	g	1,6	k	branca acinzentada / castanho	-	14,9	a	(11,0-19,8)	3,6	g	(2,9-4,8)	4,3	b	(2,8-6,4)	0	90	3	7
MN-37	2,8	j	6,4	g	10,0	g	7,1	i	1,5	k	branca acinzentada / castanho	-	12,4	d	(9,5-18,3)	3,0	l	(2,2-4,8)	4,2	b	(2,2-6,0)	0	96	3	1
MN-38	3,1	j	7,4	e	10,0	g	8,5	f	2,2	j	cinza claro / castanho à cinza	-	13,1	c	(10,3-18,7)	3,7	f	(2,9-4,4)	3,6	d	(2,7-5,7)	0	97	3	0
MN-39	4,1	g	8,0	c	9,8	h	7,0	i	1,8	j	branca acinzentada / castanho	-	12,3	e	(9,5-15,4)	3,7	f	(2,9-4,4)	3,4	e	(2,5-4,2)	0	83	11	6
MN-40	4,7	e	7,1	e	9,4	h	8,7	f	2,0	j	cinza claro / castanho à cinza	-	15,1	a	(12,5-18,3)	3,4	h	(2,9-4,4)	4,5	a	(3,4-5,8)	0	91	6	3
MN-41	3,9	g	8,4	b	12,6	a	7,9	h	1,4	k	branca acinzentada / castanho	-	14,5	b	(11,0-16,9)	3,7	f	(3,3-4,4)	3,9	c	(2,7-4,7)	0	90	6	4
MN-42	3,9	g	7,1	e	11,2	d	7,1	i	1,8	j	branca acinzentada / castanho	+	14,7	a	(11,7-19,8)	3,6	g	(2,9-4,4)	4,3	b	(2,7-6,8)	0	91	4	5
MN-43	4,1	g	6,5	g	10,0	g	6,7	k	1,7	k	branca acinzentada / castanho	-	12,8	d	(8,8-16,1)	3,3	i	(2,9-4,4)	4,0	c	(2,4-5,5)	0	93	2	5
MN-45	3,3	i	4,7	j	9,0	i	6,2	l	1,6	k	branca acinzentada / castanho	-	14,4	b	(10,3-19,8)	3,1	j	(2,6-3,7)	4,7	a	(3,4-6,8)	0	87	7	6
MN-46	2,8	j	5,9	h	8,3	j	6,4	k	1,7	k	cinza claro / castanho à cinza	+	11,4	f	(8,8-16,1)	2,9	l	(2,6-3,7)	3,9	c	(2,4-5,5)	0	93	4	3
MN-47	2,9	j	5,4	i	9,1	i	5,3	n	1,7	k	cinza claro / castanho à cinza	-	14,0	b	(11,0-18,7)	3,5	h	(2,9-4,4)	4,0	c	(2,8-6,4)	0	91	4	5
MN-48	3,7	h	6,9	f	9,4	h	6,8	j	1,4	k	branca acinzentada / castanho	-	13,5	c	(9,5-16,9)	3,2	i	(2,9-3,7)	4,2	b	(3,3-5,8)	0	92	3	5
MN-49	3,9	g	7,3	e	9,7	h	6,0	m	1,2	k	branca acinzentada / castanho	-	12,1	e	(10,3-15,8)	3,4	h	(2,6-4,4)	3,6	d	(2,5-5,4)	0	96	4	0

continua...

Tabela 3. Características culturais e morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego coletados no Estado de São Paulo.

Isolado	Taxa de crescimento da colônia(mm/dia)					Coloração da colônia (superior/inferior)	Massa conidial ²	Dimensões dos conídios				<i>continuação...</i> Formato dos conídios ³ (%)														
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C			Comprimento (µm)		Largura (µm)		Comp./Larg.		1	2	3	4									
MN-50	4,0	g	6,3	h	10,1	g	8,5	f	1,9	j	cinza claro / castanho à cinza	-	13,3	c	(11,7-14,7)	3,3	i	(2,6-4,0)	4,1	c	(2,9-5,7)	1	87	6	6	
MN-51	4,4	f	8,1	c	11,3	d	5,8	m	2,5	i	branca acinzentada / castanho	-	11,7	f	(8,8-14,7)	3,7	f	(2,9-4,4)	3,2	f	(2,4-4,5)	0	93	4	3	
MN-52	3,7	h	6,9	f	11,2	d	8,2	g	6,1	d	cinza claro / castanho à cinza	-	14,0	b	(11,7-16,1)	3,9	e	(3,3-4,8)	3,6	d	(2,8-4,4)	0	95	2	3	
MN-53	4,3	f	7,5	e	10,4	f	8,0	g	2,2	j	branca acinzentada / castanho	-	14,9	a	(11,7-19,8)	3,5	h	(2,9-4,4)	4,3	b	(2,7-5,6)	0	91	4	5	
MN-54	4,2	f	7,4	e	10,8	e	9,6	c	2,3	j	cinza claro / castanho à cinza	-	11,7	f	(8,8-14,7)	3,1	j	(2,6-4,0)	3,7	d	(2,6-4,9)	0	88	5	7	
MN-55	5,6	b	6,9	f	10,6	f	8,9	e	4,7	g	branca acinzentada / castanho	-	11,4	f	(8,8-16,1)	3,6	g	(2,6-4,0)	3,3	f	(2,4-4,6)	0	93	3	4	
MN-56	4,4	f	8,3	b	10,1	g	7,2	i	3,2	i	branca acinzentada / castanho	-	11,8	e	(9,5-15,4)	3,2	i	(2,6-4,4)	3,7	d	(2,5-6,0)	0	92	4	4	
MN-57	3,7	i	6,5	g	7,9	k	6,2	l	1,9	j	cinza / castanho à cinza	+	11,9	e	(8,8-13,6)	3,4	h	(2,9-4,4)	3,6	d	(2,4-4,6)	0	85	7	8	
MN-58	3,1	j	7,5	e	10,0	g	6,5	k	2,1	j	branca acinzentada / castanho	-	14,9	a	(11,0-19,8)	3,3	i	(2,9-4,0)	4,6	a	(3,1-6,4)	0	89	3	8	
PS-59	3,2	j	4,2	k	6,5	m	4,6	p	1,3	k	branca acinzentada / salmão	-	14,1	b	(11,7-16,9)	4,4	b	(3,7-5,1)	3,2	f	(2,7-4,2)	0	87	3	10	
PS-60	4,5	f	4,7	j	8,2	j	6,8	j	3,0	i	cinza claro / castanho à cinza	-	13,5	c	(11,7-16,1)	4,3	c	(3,7-5,1)	3,2	f	(2,3-4,0)	0	97	2	1	
PS-61	3,0	j	4,7	j	6,5	m	5,2	o	2,7	i	branca acinzentada / salmão	-	14,1	b	(11,7-16,9)	4,2	c	(3,7-4,8)	3,3	f	(2,7-4,2)	0	98	2	0	
PS-62	4,0	g	7,6	e	11,9	c	10,0	b	4,6	g	cinza claro / castanho à cinza	-	13,8	c	(12,1-16,5)	4,0	d	(3,3-4,4)	3,5	e	(2,8-4,1)	0	95	3	2	
PS-63	3,8	h	4,9	j	6,9	l	5,4	n	2,8	i	branca acinzentada / salmão	-	14,4	b	(12,5-16,9)	4,7	a	(4,0-5,1)	3,1	g	(2,6-3,8)	0	98	2	0	
PS-64	4,3	f	6,6	g	11,0	e	7,6	h	2,7	i	branca acinzentada / salmão	-	14,8	a	(12,5-18,0)	4,7	a	(4,0-5,5)	3,1	g	(2,5-3,8)	0	97	2	1	
PS-65	3,0	j	4,5	j	7,2	l	6,6	k	1,5	k	branca acinzentada / castanho	-	12,6	d	(10,3-14,3)	4,4	b	(3,7-4,8)	2,9	h	(2,2-3,6)	0	96	3	1	
PS-66	4,4	f	7,4	e	12,5	a	10,2	a	7,3	c	cinza claro / castanho à cinza	-	13,1	c	(9,9-15,8)	3,7	f	(3,3-4,0)	3,6	d	(2,7-4,8)	0	93	4	3	
PS-67	3,9	g	5,6	i	7,9	k	6,0	m	3,0	i	branca acinzentada / salmão	-	13,9	b	(11,7-18,3)	4,4	b	(4,0-5,1)	3,2	f	(2,5-4,2)	0	95	3	2	
PS-68	3,4	i	6,4	g	12,3	b	9,7	c	5,5	e	cinza claro / castanho à cinza	-	14,1	b	(12,8-15,8)	3,8	e	(3,3-4,4)	3,7	d	(2,9-4,3)	0	96	3	1	
PS-69	3,5	i	4,9	j	7,3	l	5,5	n	1,7	k	branca acinzentada / salmão	-	12,2	e	(9,9-13,6)	4,2	c	(3,7-4,8)	2,9	h	(2,5-3,5)	0	91	5	4	
PS-70	3,6	i	4,9	j	7,0	l	5,0	o	2,8	i	branca acinzentada / salmão	-	14,8	a	(13,2-16,1)	4,1	d	(3,7-5,1)	3,7	d	(2,9-4,4)	0	90	7	3	
PS-71	3,6	i	5,6	i	7,7	k	7,7	h	3,6	h	cinza claro / castanho à cinza	-	13,4	c	(12,1-16,5)	4,1	d	(3,3-4,4)	3,3	f	(2,8-4,3)	0	92	6	2	
PE-72	4,7	e	7,7	d	10,7	e	9,8	c	7,0	c	cinza / castanho à cinza	+	10,9	f	(7,0-14,3)	3,3	i	(2,2-3,3)	3,4	e	(2,1-5,6)	0	90	5	5	
PE-73	2,8	j	5,8	h	6,8	m	5,9	m	2,3	j	branca acinzentada a rosa / salmão	+	14,6	b	(12,1-16,9)	3,8	e	(3,3-4,8)	3,8	c	(3,0-5,1)	71	20	8	1	
PE-74	2,0	k	3,8	l	7,2	l	5,9	m	1,4	k	branca acinzentada / castanho	+	11,1	f	(8,8-16,9)	3,9	e	(2,9-4,8)	2,9	h	(2,2-5,1)	77	16	7	0	
PE-75	1,9	k	3,8	l	6,4	m	4,7	p	1,4	k	cinza / castanho à cinza	+	12,4	d	(10,3-15,0)	3,9	e	(3,3-4,8)	3,2	f	(2,5-4,1)	65	26	9	0	
PE-76	2,0	k	3,9	l	7,2	l	5,6	n	1,5	k	branca acinzentada / castanho	+	13,7	c	(11,4-15,8)	4,2	c	(3,3-5,1)	3,3	f	(2,2-4,3)	80	14	5	1	
PE-77	2,0	k	4,0	l	7,3	l	5,8	m	1,7	k	branca acinzentada / castanho	+	12,3	e	(9,5-15,0)	4,1	d	(3,3-5,1)	3,1	g	(2,4-4,1)	73	16	9	2	
PE-78	2,9	j	5,3	i	11,0	e	8,8	e	7,4	c	branca acinzentada / castanho	-	12,7	d	(10,3-14,3)	3,9	e	(2,9-4,8)	3,3	f	(2,2-4,8)	0	95	3	2	
PE-79	3,3	i	5,6	i	10,4	f	8,5	f	7,8	b	cinza clara / castanho à cinza	+	12,3	e	(10,3-15,0)	3,0	l	(2,2-4,0)	4,3	b	(2,8-6,2)	0	94	4	2	
PE-80	3,1	j	5,5	i	11,0	e	9,6	c	8,0	b	branca acinzentada / castanho	-	12,5	d	(10,3-15,0)	2,9	l	(2,2-4,0)	4,5	a	(2,8-6,2)	0	86	7	7	
PE-81	2,3	k	5,0	j	11,8	c	7,3	i	8,7	a	cinza / castanho à cinza	+	13,1	c	(11,0-15,8)	3,9	e	(2,9-5,1)	3,4	e	(2,4-5,4)	0	96	2	2	
PE-82	3,3	i	4,9	j	8,1	j	5,4	n	1,1	k	cinza / castanho à cinza	+	12,7	d	(11,4-15,0)	4,2	c	(3,3-5,5)	3,1	g	(2,2-3,9)	76	19	5	0	
PE-83	3,5	i	4,7	j	7,4	l	5,4	n	1,3	k	cinza clara / castanho à cinza	+	10,0	g	(8,1-13,9)	3,6	f	(2,9-4,0)	2,8	h	(2,1-3,7)	85	12	8	0	
PE-84	3,8	h	6,5	g	10,6	f	8,3	g	7,8	b	cinza / castanho à cinza	-	12,7	d	(11,0-16,5)	3,4	h	(2,9-4,0)	3,8	c	(2,7-5,0)	0	97	2	1	
PE-85	4,2	f	6,5	g	11,9	b	9,7	c	7,2	c	cinza clara / castanho à cinza	-	11,1	f	(8,4-14,3)	3,4	h	(2,2-4,4)	3,4	e	(2,1-5,8)	0	90	4	6	
PE-86	4,3	f	5,9	h	11,0	e	9,2	d	7,4	c	branca acinzentada / castanho	-	12,1	e	(8,4-16,5)	3,6	g	(2,2-4,0)	3,5	e	(2,1-7,5)	0	93	3	4	
PE-87	5,1	d	7,2	e	11,0	e	10,2	a	7,2	c	branca acinzentada / castanho	-	12,2	e	(8,8-15,0)	3,6	g	(2,6-4,8)	3,5	e	(2,2-5,9)	0	95	2	3	
PE-88	3,3	i	4,9	j	6,8	m	5,0	o	1,0	k	cinza / castanho à cinza	+	13,3	c	(11,0-15,0)	3,9	e	(3,3-4,8)	3,4	e	(2,3-4,4)	87	11	2	0	
PE-89	2,9	j	7,6	e	10,8	e	8,6	f	9,2	a	branca acinzentada / castanho	+	12,6	d	(8,8-15,0)	4,1	d	(3,7-4,8)	3,1	g	(1,8-4,1)	0	88	5	7	
PE-90	3,0	j	6,1	h	11,7	c	9,7	c	9,2	a	cinza clara / castanho à cinza	+	11,4	f	(8,4-13,6)	3,7	f	(2,6-4,8)	3,2	f	(1,9-5,3)	2	83	7	8	
PE-91	3,5	i	5,2	i	6,9	l	4,2	p	1,1	k	cinza / castanho à cinza	+	11,2	f	(9,2-14,3)	3,7	f	(2,9-4,8)	3,1	g	(2,2-4,3)	70	17	11	2	
PE-92	3,5	i	6,7	g	9,4	h	9,3	d	6,4	d	branca acinzentada / castanho	-	12,2	e	(8,4-15,0)	3,6	g	(2,2-4,4)	3,4	e	(2,2-4,9)	0	91	4	5	
PE-93	4,0	g	5,6	i	11,0	e	8,6	f	7,5	b	cinza clara / castanho à cinza	-	10,5	g	(7,7-13,6)	3,1	j	(2,2-3,7)	3,4	e	(2,3-4,7)	0	89	5	6	
PE-94	4,3	f	6,7	g	12,1	b	9,1	e	5,7	e	cinza clara / castanho à cinza	-	12,8	d	(8,8-15,0)	3,6	g	(2,6-4,0)	3,7	d	(2,2-5,9)	0	92	5	3	
cv(%) ⁴	5,6		4,0		3,9		3,5		11,1				12			11,2			16,6							

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

² (+) estrutura presente, (-) estrutura ausente.

³ Formato: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (4) reto, com constricção.

⁴ Coeficiente de variação.

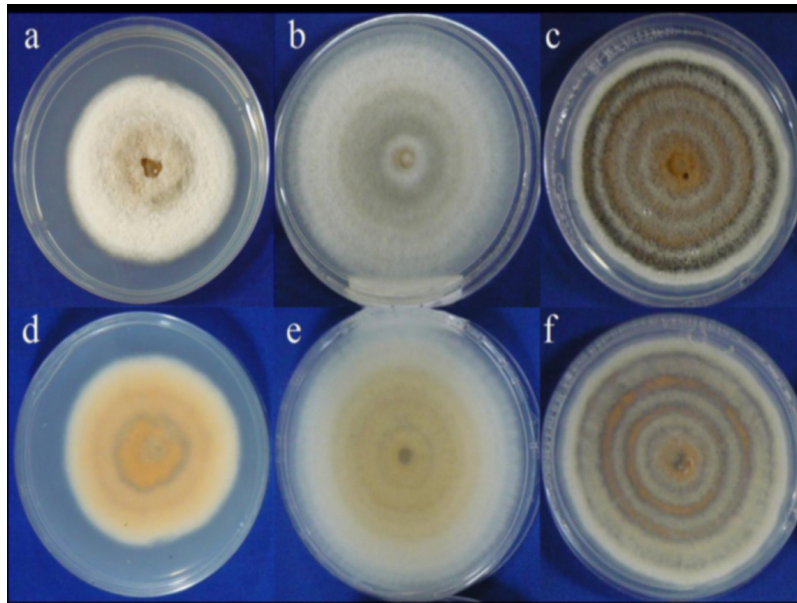


Figura 1. Aspectos de colônias de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp., cultivadas a 25°C em meio BDA: Colônia branca acinzentada no centro com reverso salmão e com massa conidial laranja no centro (a,d), colônia cinza clara com reverso castanho (b,e), colônia cinza com reverso cinza e massas conidiais laranja em anéis concêntricos (c,f).

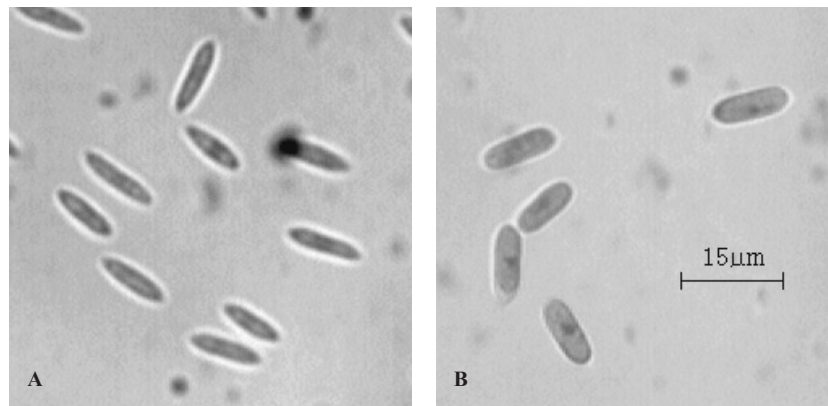


Figura 2. Conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum*: (a) retos, hialinos, unicelulares, fusiformes, com ápices afilados (PE-88); (b) retos, hialinos, unicelulares, oblongos e com ápices arredondados (AV-30).

espécies do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* também podem causar antracnose nessas frutíferas. A análise filogenética revelou, ainda, que três isolados de maracujá (PS-59, PS-63 e PS-64), escolhidos entre 10 isolados que não foram amplificados por PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos, pertencem a espécie *C. boninense*, já constatada causando antracnose em maracujá no Brasil (27). Adicionalmente, a análise filogenética demonstrou a presença de isolados de pêssego que não agruparam com os isolados das espécies dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, indicando a necessidade de realização de trabalhos

complementares para a identificação específica dos isolados causadores da antracnose do pêssego.

Os resultados deste trabalho demonstram a existência de variabilidade fenotípica e genética entre isolados causadores de antracnose em frutíferas no Estado de São Paulo, permitindo melhor compreensão sobre a etiologia da antracnose do abacate, manga, maracujá e pêssego regionalmente. Essa constatação é útil para subsidiar o desenvolvimento e adoção de medidas de controle específicas para as espécies causadoras de antracnose no Estado, sejam essas medidas de natureza genética, química ou cultural.

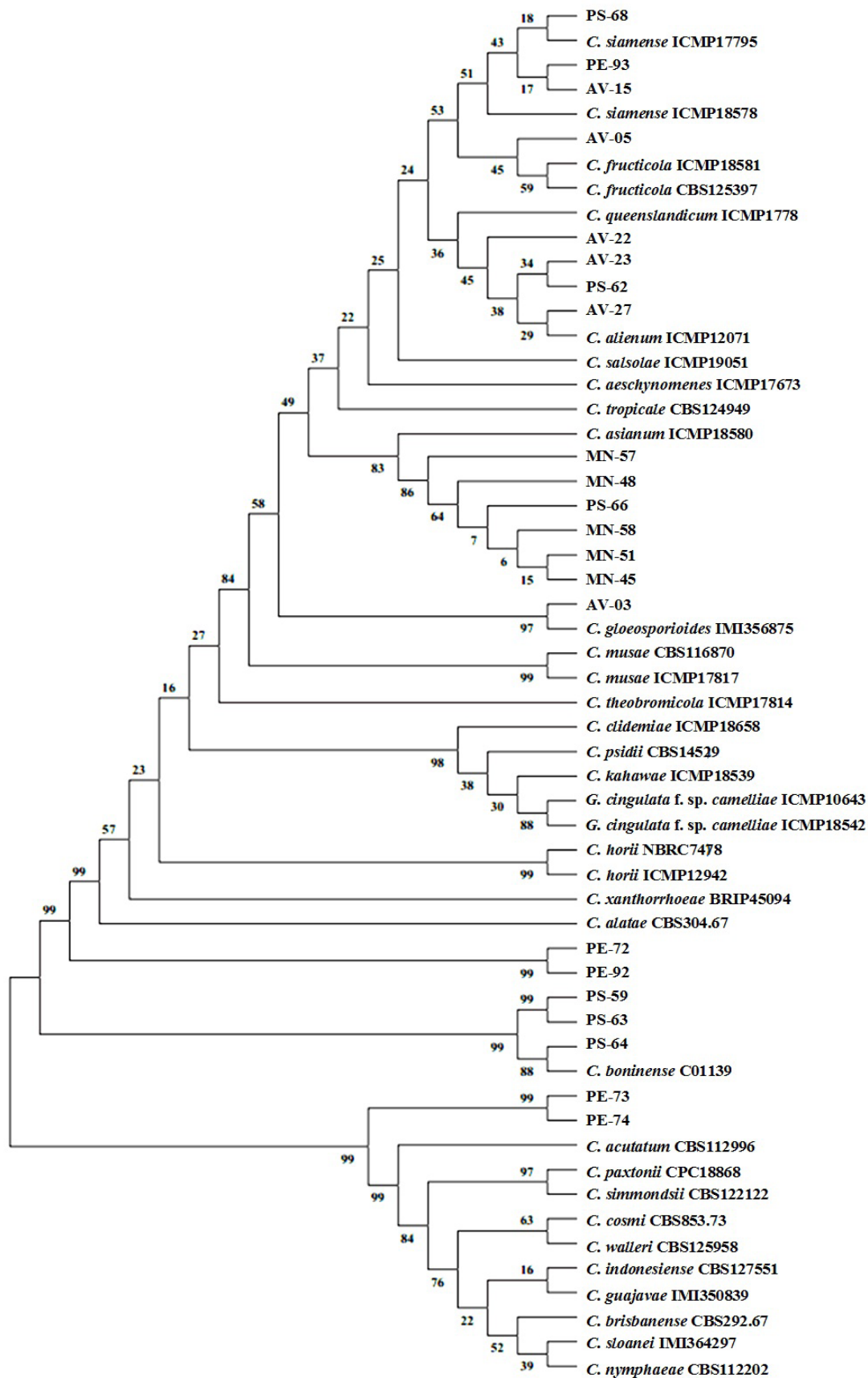


Figura 3. Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor-Joining* com seqüências concatenadas de genes das regiões ITS-5.8S rDNA e β -tubulina de isolados de *Colletotrichum* spp (bootstrap com 10.000 replicações).

Tabela 4. Identificação de isolados de *Colletotrichum* obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssego em reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos.

Isolado	Oligonucleotídeos*			Isolado	Oligonucleotídeos*		
	CgInt	CaInt2	Col1		CgInt	CaInt2	Col1
	ITS4	ITS4	ITS4		ITS4	ITS4	ITS4
AVO-33-4B	+	-	-	MN-47	+	-	-
TUT-137	-	+	-	MN-48	+	-	-
Man-16	-	-	+	MN-49	+	-	-
AV-01	+	-	-	MN-50	+	-	-
AV-02	+	-	-	MN-51	+	-	-
AV-03	+	-	-	MN-52	+	-	-
AV-04	+	-	-	MN-53	+	-	-
AV-05	+	-	-	MN-54	+	-	-
AV-06	+	-	-	MN-55	+	-	-
AV-07	+	-	-	MN-56	+	-	-
AV-08	+	-	-	MN-57	+	-	-
AV-09	+	-	-	MN-58	+	-	-
AV-10	+	-	-	PS-59	-	-	-
AV-11	+	-	-	PS-60	-	-	-
AV-12	+	-	-	PS-61	-	-	-
AV-13	+	-	-	PS-62	+	-	-
AV-14	+	-	-	PS-63	-	-	-
AV-15	+	-	-	PS-64	-	-	-
AV-16	+	-	-	PS-65	-	-	-
AV-17	+	-	-	PS-66	+	-	-
AV-18	+	-	-	PS-67	-	-	-
AV-19	+	-	-	PS-68	+	-	-
AV-20	+	-	-	PS-69	-	-	-
AV-21	+	-	-	PS-70	-	-	-
AV-22	+	-	-	PS-71	-	-	-
AV-23	+	-	-	PE-72	+	-	-
AV-24	+	-	-	PE-73	-	+	-
AV-25	+	-	-	PE-74	-	+	-
AV-26	+	-	-	PE-75	-	+	-
AV-27	+	-	-	PE-76	-	+	-
AV-28	+	-	-	PE-77	-	+	-
AV-29	+	-	-	PE-78	+	-	-
AV-30	+	-	-	PE-79	+	-	-
MN-31	+	-	-	PE-80	+	-	-
MN-32	+	-	-	PE-81	+	-	-
MN-33	+	-	-	PE-82	-	+	-
MN-34	+	-	-	PE-83	-	+	-
MN-35	+	-	-	PE-84	+	-	-
MN-36	+	-	-	PE-85	+	-	-
MN-37	+	-	-	PE-86	+	-	-
MN-38	+	-	-	PE-87	+	-	-
MN-39	+	-	-	PE-88	-	+	-
MN-40	+	-	-	PE-89	+	-	-
MN-41	+	-	-	PE-90	+	-	-
MN-42	+	-	-	PE-91	-	+	-
MN-43	+	-	-	PE-92	+	-	-
MN-45	+	-	-	PE-93	+	-	-
MN-46	+	-	-	PE-94	+	-	-

*Presença (+) e ausência (-) de fragmento específico de DNA amplificado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaskaveg, J.E.; Hartin, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, n.9, p.979-987, 1997.
- Afanador-Kafuri, L.; Minz, D.; Maymon, M.; Freeman, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.93, n.5, p.579-587, 2003.
- Almeida, L.C.C.; Coêlho, R.S.B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.4, p.318-328, 2007.
- Andrade, E.M.; Uesugi, C.H.; Ueno, B.; Ferreira, M.A.S. V. Caracterização morfofocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.1, p.21-31, 2007.
- Avila-Quezada, G.; Silva-Rojas, H.V.; Teliz-Ortiz, D. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v.91, p.1200-1200, 2007.
- Bernstein, B.; Zehr, E.I.; Dean, R.A.; Shabi, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, n.5, p.478-482, 1995.
- Cai, L.; Hyde, K.D.; Taylor, P.W.J.; Weir, B.S.; Waller, J.; Abang, M.M.; Zhang, J.Z.; Yang, Y.L.; Phoulivong, S.; Liu, Z.Y.; Prihastuti, H.; Shivas, R.G.; Mckenzie, E.H.C.; Johnston, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v.39, p.183-204, 2009.
- Cannon, P.F.; Damm, U.; Johnston, P.R.; Weir, B.S. *Colletotrichum* status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, p.181-213, 2012.
- Cullen, D.W.; Lees, A.K.; Toth, I.K.; Duncan, J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.3, p.281-292, 2002.
- Dean, R.; Van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v.13, p.414-430, 2012.
- Fischer, I.H.; Kimati, H.; Resende, J.A.M. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: Kimati, H., Amorim, L., Resende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.) **Manual de fitopatologia vol. 2: Doenças de plantas cultivadas**. 4º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.467-474.
- Fitzell, R.D. *Colletotrichum acutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.63, p.1067-1070, 1979.
- Glass, N.L.; Donaldson, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.6, p.1323-1330, 1995.
- Guerber, J.C.; Liu, B.; Correll, J.C.; Johnston, P.R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, Lancaster, v.95, n.5, p.872-895, 2003.
- Menezes, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v.3, p.170-179, 2006.
- Mills, P.R.; Sreenivasaprasad, S.; Brown, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.98, n.1/3, p.137-144, 1992.
- Murray, M.G.; Thompson, W.S. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.
- Nei, M.; Kumar, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333p.
- Piccinin, E.; Pascholati, S.F.; Di Piero, R.M. Doenças Do Abacateiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, cap.1, p.1-7.

20. Pileggi, S. A. V.; Oliveira, S. F. V.; Andrade, C. W. ; Vicente, V.A. ; Dalzoto, P.R. ; Cruz, G. K. ; Gabardo, J. ; Massola Júnior, N.S. ; Tozze Júnior, H.J.; Kava-Cordeiro, V.; Galli-Terasawa, L. V.; Pimentel, I. C. ; Glienke, C. Molecular and morphological markers for rapid distinction between two *Colletotrichum* species. **Canadian Journal of Microbiology (Print)**, Ottawa, v.55, p.1076-1088, 2009.
21. Pimenta, A.A. **Caracterização morfológica, patogênica e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em manga (*Mangifera indica* L.)**. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.
22. Ploetz, R.C. Mango diseases caused by fungi: anthracnose. In: Ploetz, R.C.; Zentmeyer, G.A.; Nishijima, N.T.; Rohrbach, K.G.; Ohr, H.D. (Ed.). **Compendium of Tropical Fruit Diseases**. Saint Paul: APS Press, 1994. p.35-36.
23. Silva-Rojas, H.V.; Avila-Quezada, G. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. **Plant Pathology**, Saint Paul, v.60, n.5, p.899–908, 2011.
24. Sreenivasaprasad, S.; Sharada, K.; Brown, A.E.; Mills, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v.45, n.4, p.650-655, 1996.
25. Sutton, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, 1992. p.1-26.
26. Tozze Júnior, H.J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annum*) no Brasil**. 2007. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
27. Tozze Júnior, H.J.; Fischer, I.H.; Câmara, M.P.S.; Massola Júnior, N.S. First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Orange, v.5, p.70-72, 2010.
28. 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.
29. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Ed.) **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.