

LUÍS GUSTAVO CHAVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*
ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO CAJUEIRO**

**RECIFE - PE
Fevereiro – 2011**

LUÍS GUSTAVO CHAVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*
ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO CAJUEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia, da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia

RECIFE - PE
Fevereiro – 2011

Ficha Catalográfica

S586c Silva, Luís Gustavo Chaves da
Caracterização de isolados de *Colletotrichum*
gloeosporioides associados à antracnose do cajueiro /
Luís Gustavo Chaves da Silva. -- 2011.
85 f.: il.

Orientador: Marcos Paz Saraiva Câmara.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2011.

Inclui apêndice e referências.

1. Antracnose 2. *Colletotrichum* 3. Caju 4. Caracterização
5. Marcadores moleculares 6. Patogenicidade
7. *Gloeosporioides* 8. Fitomicologia 9. Fungos I. Câmara,
Marcos Paz Saraiva, Orientador II. Título

CDD 632.4

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*
ASSOCIADO À ANTRACNOSE DO CAJUEIRO**

LUÍS GUSTAVO CHAVES DA SILVA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Marcos Paz Saraiva Câmara - **Orientador**
Francisco Marto Pinto Viana - **Co-orientador**

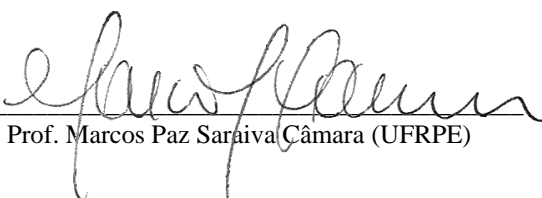
RECIFE - PE
Fevereiro – 2011

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*
ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO CAJUEIRO**


LUÍS GUSTAVO CHAVES DA SILVA

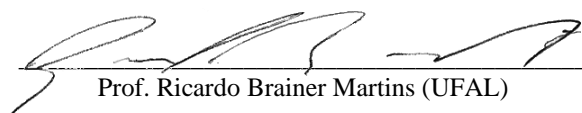
Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 28/02/2011

ORIENTADOR:

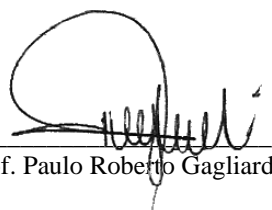

Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

EXAMINADORES:


Dr. José Emilson Cardoso (EMBRAPA-CNPAT)


Prof. Ricardo Brainer Martins (UFAL)


Prof. Cristiano Souza Lima (UFRPE)


Prof. Paulo Roberto Gagliardi (UFS)

**RECIFE - PE
Fevereiro – 2011**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que me concedeu diversos milagres a cada etapa de minha jornada até este momento.

Aos meus pais, Luiz Carlos da Silva e Isabel Lúcia Chaves da Silva, por me trazerem ao mundo, me orientarem exemplarmente e me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus Irmãos, João Paulo e Huiltton Carlos, simplesmente por serem meus irmão, meu sangue e pelo esforço em prestigiar a defesa.

A minha tia querida do coração, Maria José da Silva, pelo coração sempre aberto a mim.

Ao extraordinário Dr. Francisco Marto Pinto Viana, pela amizade, orientação profissional e espiritual, apoio, conselhos e confiança.

Ao Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, pela orientação e apoio.

Ao Dr. José Emilson Cardoso, pela amizade, orientação religiosa, apoio e disponibilidade em ajudar.

Ao Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Dr. Marlon Vagner Valentim Martins , pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Prof. Ricardo Brainer Martins, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Prof. Paulo Roberto Gagliardi, pela amizade, apoio e incentivo.

A Prof.(a) Maria Nenmaura Gomes Pessoa, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Dr. Jaime Vasconcelos, pelos conselhos e apoio.

A Dr.(a) Patrícia Bordalo, pelo apoio.

A amiga do coração Prof.(a) Caroline Miranda Biondi, por tantos anos de convívio, amizade, apoio e incentivo.

Ao prof. Sami Jorge Michereff, pela oportunidade de retornar a Recife.

A todos professores e funcionários do departamento de Fitopatologia da UFV.

Aos amigos da Embrapa CNPAT: Ancelita, Aldiel, Bruna, Edson, Edite, Frederico, Glauber, Jaqueline, Joilson, Kairo, Raiza, Raul, Renato, Samara.

Aos amigos da UFRPE: Adriana, Alessandra, Alba, Barbara, Clarice, Cíntia, Francisco Franck, Hailson, Marcos, Patrícia, Robson, Maria, Genira, Shara, Tiago, Jean e claro aos irmãos baianos Tiago e Saulo.

Aos amigos da Graduação da turma de formandos 2003-2 em especial, a Jaqueline, Silvana, Edson.

Aos alunos da disciplina de Fitopatologia do curso de Graduação em agronomia da UFC, dos semestres de 2009-1 e 2, 2010-1 e 2, pela paciência e atenção exemplar nas aulas ministradas.

Ao amigo Ednaldo Jr. e esposa pela presença na defesa.

Ao amigo Flávio de Azevedo (JUCA), pelos anos de convívio.

A EMBRAPA Agroindústria Tropical, pelo apoio e todo aporte logístico.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Ao grupo Cione pelo apoio de campo.

Ao grupo Soever pelo apoio de campo.

E a pessoa que acompanhou esta jornada desde o início, de perto, que apoiou de forma incondicional, valorizou o esforço e sofreu as conseqüências de 3 anos de trabalho, empenho, frustrações e sucessos. À pessoa que devo agradecer do fundo do coração, que incentivou muito este momento de conclusão. Ao amor mais puro e verdadeiro que já vivi, Jacilane Fernandes do Nascimento (Lane).

Deixo minha homenagem póstuma para:

O amigo Túlio (UFRPE)

A amiga Ingrid (UFRPE)

Ao Prof. Reginaldo Romeiro (UFV)

**“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará
fazendo o impossível.”**

São Francisco de Assis.

“Um homem não está acabado quando ele é derrotado, mas quando desiste.”

Richard Nixon.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| CAPÍTULO I | 3 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 3 |
| Cajueiro | 4 |
| Antracnose do cajueiro | 5 |
| Identificação de espécies de <i>Colletotrichum</i> | 8 |
| Ferramentas moleculares para identificação de espécies de <i>Colletotrichum</i> | 9 |
| Referências | 10 |
| CAPÍTULO II | 13 |
| AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA ISOLADOS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> PROVENIENTES DE CAJUEIRO | 13 |
| Introdução | 15 |
| Material e Métodos | 17 |
| Resultados e Discussão | 18 |
| Conclusões | 20 |
| Agradecimentos | 21 |
| Referências | 21 |
| CAPÍTULO III | 27 |
| VARIABILIDADE PATOGENICA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> sp. À CLONES DE CAJUEIRO | 27 |
| Introdução | 29 |
| Material e Métodos | 30 |
| Resultados e Discussão | 31 |
| Conclusões | 33 |
| Agradecimentos | 34 |
| Referências | 34 |
| CAPÍTULO IV | 38 |
| CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO CAJUEIRO | 38 |
| Introdução | 40 |
| Material e métodos | 41 |
| Resultados e discussão | 44 |
| Conclusões | 48 |
| Agradecimentos | 48 |
| Referências | 48 |
| CAPÍTULO V | 56 |
| CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASSOCIADOS A ANTRACNOSE DO CAJUEIRO | 56 |
| Introdução | 57 |
| Material e métodos | 59 |
| Resultados e discussão | 61 |
| Conclusões | 63 |
| Referências | 64 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 72 |
| NORMAS DAS REVISTAS | 75 |
| ANEXOS | 79 |

RESUMO

A Antracnose, doença fúngica ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides*, destaca-se como doença importante do cajueiro (*Anacardium occidentale*), podendo levar a perdas de mais 40% na produção. A castanha de caju é o produto agrícola mais importante do estado do Ceará, com cerca de 350 mil hectares plantados, geração de mais de 100 mil empregos diretos e indiretos e exportações acima de 150 milhões de dólares em amêndoas. Também é importante para os estados do Piauí e Rio Grande do Norte. Há poucas e desatualizadas pesquisas sobre a doença, havendo a necessidade de informações básicas para os programas de melhoramento e manejo integrado da fitomoléstia. Por apresentar grande variabilidade morfológica e genética, torna-se difícil a generalização de aspectos básicos da espécie. O objetivo deste trabalho foi caracterizar populações de *C. gloeosporioides* que ocorrem em cajueiros de diversas regiões do Brasil. Foram usados 220 isolados, obtidos de lesões de folhas de cajueiro, provenientes de plantios de 22 áreas distintas dos estados do Amazonas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e São Paulo. Procedeu-se com testes de patogenicidade e marcadores moleculares espécie específicos para todos isolados. Em seguida, um representante de cada área de coleta foi selecionado para realização das demais avaliações, sendo elas: morfológicas, moleculares, epidemiológicas e fisiológicas. Os marcadores espécie específicos ITS e β -Tubulina, constataram a existência de apenas um grupo de 10 isolados de uma mesma área, não sendo confirmados para *C. gloeosporioides* ou *C. acutatum*, porém com características morfológicas de *C. gloeosporioides*. Usando 7 primers ISSR e 100 marcadores nos representantes das 22 áreas, foi possível identificar a formação de 4 grupos genéticos distintos de *C. gloeosporioides*, onde o isolado não marcado por ITS ou β -Tubulina, não ficou contido em nem um dos grupos. Com o teste de patogenicidade utilizando 5 clones, foi possível diferenciar 3 grupos e mais outros 3 isolados distintos dos demais. Conclui-se que a espécie *C. gloeosporioides* é prevalente em plantios de cajueiro nas áreas estudadas.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, cajueiro, ITS, ISSR, antracnose, patogenicidade

ABSTRACT

The anthracnose, fungal disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, stands out as an important disease of cashew (*Anacardium occidentale*), which may lead to losses of over 40% in production. The cashew nut is the most important agricultural product of the state of Ceará, about 350 thousand hectares, generating more than 100 thousand direct/indirect jobs and exports over 150 million dollars in almonds. It is also important for the states of Piauí and Rio Grande do Norte. There are few and outdated research about disease and the needs basic information for programs improvement and integrated management of diseases. By presenting large morphological and genetic variability, it is difficult to generalize basic aspects of the species. The aim of this study was to characterize populations of *C. gloeosporioides* occurring on cashew trees in various regions of Brazil. Used 220 isolates obtained from cashew leaves, from 22 different areas of the states: Amazonas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do North and São Paulo. Proceeded with pathogenic tests and molecular markers species-specific to all isolates. Then a representative from each collection area was selected to perform the other ratings, which are: morphological, molecular, epidemiological and physiological. The species-specific markers β -tubulin and ITS, noted the existence of only one group of 10 isolates of the same area, not being confirmed for *C. gloeosporioides* or *C. acutatum*, but morphological characteristics of *C. gloeosporioides*. Using seven primers ISSR markers and 100 representatives in 22 areas, it was possible identify the formation of four distinct genetic groups of *C. gloeosporioides*, where the unmarked isolated by ITS or β -Tubulin, not was contained in one or in groups. With the pathogenic test using 5 clones, it was possible to distinguish three groups and another 3 isolates distinct from other. Conclude that the species *C. gloeosporioides* is prevalent in cashew plantations in the areas studied.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, cashew, ITS, ISSR, Anthracnose Pathogenicity

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO CAJUEIRO

Cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale.*) é originário da América do Sul, tendo o centro de diversidade localizado no litoral da região Nordeste do Brasil. Trata-se de uma fruteira tropical perene, pertencente à família das anacardiáceas, que apresenta um rápido desenvolvimento. O caju pode ser consumido como fruta fresca (pseudofruto, pendúculo), no entanto, o seu principal produto é a castanha ou amêndoa (verdadeiro fruto), que é processada e exportada para diversos países, sendo a nós mais cultivada no mundo. Outro produto importante é o LCC (líquido da castanha do caju), que é utilizado na indústria de tintas, resinas e outros. Bem como o uso do pseudofruto na indústria de sucos, doces, bebidas (ARAÚJO & SILVA, 1995; BARROS, 1984; CARDOSO, 2002; LIMA, 1988; PIMENTEL, 1993).

No Brasil, o cajueiro vem sendo explorado desde o descobrimento, contudo, foi a partir de 1860 que esta cultura se expandiu, sendo desde então registrado plantios comerciais nos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia. Atualmente, o Brasil conta com uma área plantada de aproximadamente 800.000 ha e a produção em 2010 alcançou cerca de 220.000 ton de amêndoas, estando na quinta colocação, atrás do Vietnã, Índia, Nigéria e Costa do Marfim (CAJUCULTURA, 2011; FAOSTAT, 2011). Esta cultura movimenta anualmente mais de 150 milhões de dólares e gera 100 mil empregos diretos e indiretos só no estado do Ceará. A região Nordeste concentra quase 100% dos plantios, tendo o estado do Ceará como o maior produtor nacional, seguido pelos estados do Rio Grande do Norte e Piauí.

Estudos dos aspectos ecológicos, genéticos e evolutivos são de utilidade prática, pois possibilitam uma melhor compreensão da taxonomia, sistemática e genética das populações. Desta forma, torna-se possível o monitoramento do potencial adaptativo dos fitopatógenos em função da variabilidade genética e epidemiológica. Para a realização destes estudos, é necessário um levantamento de dados morfológicos, culturais, moleculares, fisiológicos e epidemiológicos. Estas informações são de grande relevância para o desenvolvimento de estratégias de manejo de

fitomoléstias, tanto para uso variedades tolerantes, como para o manejo da resistência a fungicidas e ainda no manejo integrado das culturas.

A diversidade genética é resultante de interações dinâmicas estabelecidas entre patógeno, hospedeiro e ambiente. Tais interações são influenciadas pelos mecanismos evolutivos, que compreendem a seleção, mutação, fluxo gênico, deriva genética e recombinação, os quais são responsáveis por mudanças nas populações. O estudo destes mecanismos evolutivos tem sido facilitado pela disponibilidade de ferramentas moleculares. Dentre estas ferramentas destaca-se a o uso de marcadores moleculares e o seqüenciamento genético que possibilitam a realização de estudos filogenéticos de alta precisão.

Antracnose do cajueiro

Antracnose é o nome vulgar dado a doenças infectadas por várias espécies do fungo filamentoso do gênero *Colletotrichum*, que é a forma imperfeita do gênero *Glomerella*. É um fungo de extrema importância por causar muitas perdas em culturas das regiões tropicais do mundo, afetando muitas espécies de plantas, como: cereais, herbáceas, leguminosas, ornamentais e fruteiras; provocando sintomas em toda a parte aérea das plantas, bem como nos frutos, constituindo-se em um dos maiores problemas fitossanitários em nível mundial (FREEMAN et al., 1998). É uma das principais doenças do cajueiro tendo como agente etiológico o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e pode ocasionar mais de 40% de perdas nas fases pré e pós-colheita. É uma enfermidade importante em todas as fases fenológicas do cajueiro, por atacar folhas, ramos, inflorescências, frutos e pseudofrutos, nas várias regiões produtoras do mundo e do Brasil, afetando também a redução da qualidade dos produtos comercializáveis (PITEIRA, 1996; FREIRE et al., 2003).

No cajueiro, a doença tem maior incidência nos períodos que coincidem com a emissão de novas folhas, agravando-se em anos de maior pluviosidade, pelo surgimento da floração que também é sensível a ataques (BARROS, 2002; CARDOSO, 2002). Temperatura e umidade

6.

elevadas são favoráveis à propagação e desenvolvimento do patógeno, pois, para germinação dos conídios é necessária a presença de água livre e de elevada umidade relativa (acima de 90%) (CARDOSO, 2002). Os sintomas típicos são de lesões irregulares nas folhas, com coloração pardo-púrpura, dispostas em qualquer parte do limbo, de tamanho variável, isoladas ou confluentes, afetando as folhas jovens. À medida que as folhas envelhecem as manchas escurecem em tons avermelhados, secam e se rasgam com facilidade. Quando os sintomas são severos, a folhagem apresenta-se retorcida e deformada, assemelhando-se a uma queima. Na superfície das lesões aparecem as frutificações do fungo, os acérvulos. Após duas semanas, a maturação e o número de lesões estabilizam-se. Nos ramos surgem depressões alongadas e escuras. Nas inflorescências, causa abortamento e exsudações de gotículas de goma. Já no fruto surgem áreas necróticas de tamanho variável, podendo levar a completa mumificação (CARDOSO, 2002).

O agente etiológico da antracnose do cajueiro é descrito na literatura como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., pertencente aos fungos imperfeitos da classe *Celomycetes*, à ordem *Melanconiales* e à família *Melanconiaceae* (BARROS et al., 1984; SUTTON, 1992; FREIRE et al., 2002; MENEZES, 2002). Taxonomicamente, o gênero *Colletotrichum* apresenta como característica típica uma estrutura denominada conidiomata acervular, onde se encontra os conidióforos. A presença de apressório também é considerada uma característica marcante deste gênero (SUTTON, 1992). O gênero *Colletotrichum* é formado por 39 espécies e que constituem um dos mais importantes grupos de patógenos de planta cultivadas. A ocorrência destas espécies tem sido registrada em vários habitats como saprófitas, patógenos de plantas e de animais com o sistema imunológico comprometido (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998).

A espécie *C. gloeosporioides* [teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & von Schrenk] se configura como a espécie mais conhecida do gênero, possuindo uma ampla gama de hospedeiros, formada por plantas de mais de 400 gêneros (KIRK et al., 2001).

Tradicionalmente esta espécie apresenta como características geralmente citadas na literatura como relevantes, apressórios com formato clavado ou ovalados, com comprimento de 6-20 µm e largura de 4-12 µm; conídios hialinos com formato reto ou cilíndrico, com ápice arredondado e base truncada, com comprimento variando entre 12-17 µm por 3,5-6 µm de largura. Outra espécie muito freqüente e que suspeita-se ter como hospedeiro o cajueiro é *C. acutatum* Simmonds, [*Glomerella acutata* Guerber & Correll], cujos esporos se destacam como critério para indicar a espécie, sendo verificado conídios com formato reto, fusiforme e abruptamente afilados na extremidade, com comprimento na ordem de 8,5-16,5 µm e largura de 2,5-4,0 µm. Os conídios de todas as espécies de *Colletotrichum* são envolvidos por uma matriz gelatinosa, constituída de polissacarídeos e proteínas (SUTTON, 1992).

Os conídios de *Colletotrichum* são liberados pela ação de respingos de chuva ou irrigação, que promovem a diluição da matriz mucilaginosa, sendo facilmente dispersos pela ação do vento (SANTOS FILHO et al., 2003). Em estudos realizados na Costa Rica, foi constatado que em períodos chuvosos a produção de conídios era 6,6 vezes maior que em períodos secos, enquanto a dispersão era 16 vezes maior que no período seco (DURÁN et al., 2000). Para que ocorra a germinação dos esporos é necessária a presença de água livre e/ou umidade relativa do ar próxima a 100%. O processo de germinação tem duração média de 6-8 horas, seguido pelo desenvolvimento do apressório, que tem duração de 10-12 horas, e penetração do hospedeiro. Segundo Cardoso (2002) o patógeno tem capacidade de penetrar o tecido em qualquer fase de desenvolvimento, de forma direta ou indireta.

Restos culturais constituídos de folhas, frutos senescentes infectados e pecíolo, tanto na planta como os que se encontram no solo, representam a principal fonte de inóculo de *Colletotrichum*, além da gama de hospedeiros secundários (CARDOSO, 2002). Os conídios não constituem uma forma de sobrevivência porque sua viabilidade diminui rapidamente, embora sejam envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas. Essa

matriz mucilagínosa, provavelmente, tem a função de proteção contra a dessecação, além de aumentar a eficiência de germinação dos esporos (MENEZES, 2002).

O gênero *Colletotrichum* apresenta uma variabilidade genética e morfológica, sendo algumas espécies como, *C. gloeosporioides*, constituída de sub-populações intraespecíficas, com formas intermediárias morfológicamente semelhantes. Assim, a diferenciação destas espécies, bem como a precisa caracterização da variabilidade, tem sido tarefa difícil, em razão da grande plasticidade fenotípica encontrada neste grupo (MENEZES, 2002). Tradicionalmente, a delimitação de espécies tem se baseado em características morfológicas (tamanho e forma dos conídios), gama de hospedeiros e produção de metabólicos secundários (COLE & KENDRICK, 1981; SUTTON, 1992). Porém a regulação da expressão destas características pode ser influenciada pela variação das condições ambientais (BARRETT, 1989), o que compromete a repetibilidade dos critérios taxonômicos estabelecidos para as populações em nível de espécie. Assim, quando se compara resultados da caracterização fenotípica, percebe-se que os diversos isolados de uma população nem sempre mantêm o mesmo comportamento, sendo comum a existência de formas intermediárias semelhantes (SUTTON, 1992). Desta forma, as caracterizações baseadas unicamente em dados fenotípicos podem não ser suficientes para a diferenciação de espécies deste gênero. Como exemplo, a espécie *C. gloeosporioides* apresenta uma taxonomia complexa, sendo esta a principal razão de algumas confusões, bem como com a espécie *C. acutatum* (GUERBER & CORRELL, 2001; YANG & SWEETINGHAM, 2004).

Identificação de espécies de *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* apresenta alta variabilidade morfológica e genética (HODSON et al. 1993, CANNON et al., 2000). Segundo Sutton (1992), algumas espécies, como *C. gloeosporioides* são formadas por subpopulações intraespecíficas, que constituem um complexo de espécies. Esta hipótese tem sido demonstrada em estudos recentes, sendo confirmada existência de variabilidade em nível intraespecífico. Na análise de populações de *Colletotrichum*

patogênicas à macieira, isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* formaram dois grupos distintos, sendo as espécies *C. gloeosporioides* constituída de sete subgrupos, enquanto de *C. acutatum* formou apenas um grupo (GONZÁLES & SUTTON; CORRELL, 2006). Em outro estudo, foi verificado que a população de *C. acutatum* procedente de tomate era clonal, enquanto os isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de manga, e *Colletotrichum* sp. provenientes de maracujá, constituíam um grupo heterogêneo (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). No México, foi constatado que isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de mamão apresentavam alta variabilidade molecular, em nível intraespecífico (CASARRUBIAS-CARRILLO et al., 2003). No Brasil também foi verificada a formação de grupos distintos de similaridade entre isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de mamão (PERES et al., 2003).

A delimitação das espécies de *Colletotrichum* que ocasionam doenças em cajueiro, bem como a variabilidade genética dentro das espécies, são aspectos importantes para o desenvolvimento e adoção de estratégias de manejo das doenças (FREEMAN et al., 1998; PERES et al., 2003). Nesse contexto, a biologia de populações compreende a área destinada ao estudo dos aspectos ecológicos, genéticos e evolutivos das populações, os quais podem ser entendidos como a síntese da epidemiologia e a genética de populações, e possibilitam uma melhor compreensão da taxonomia, sistemática e genética das populações de fitopatógenos (MILGROOM, 2001). Desta forma, torna-se possível o monitoramento do potencial adaptativo destes agentes, em função de variabilidade genética, bem como da variabilidade epidemiológica, que tem sua implicação direta no controle de doenças (MCDONALD & LINDE, 2002). O conhecimento da estrutura de populações tem possibilitado avanços no desenvolvimento de estratégias de manejo de doenças de planta, tanto no uso de variedades resistentes, como no manejo da resistência de fitopatógenos a fungicidas (MILGROOM, 2001; MCDONALD & LINDE, 2002).

Ferramentas moleculares para identificação de espécies de *Colletotrichum*

Os estudos filogenéticos, com base em análises moleculares, têm possibilitado resultados precisos na definição de espécies de *Colletotrichum*. Dentre estas ferramentas disponíveis atualmente, os marcadores moleculares destacam-se por possibilitarem uma análise da variabilidade de todo o seu conjunto gênico (MCDONALD, 1997; CAIXETA et al., 2006). Dentre as principais técnicas, podemos destacar os testes com *primers* taxon-específico, marcadores moleculares tipo *fingerprint* e sequenciamento de DNA. As informações geradas a partir de fragmentos de DNA sequenciados, permitem inferir sobre as relações filogenéticas entre as espécies-grupo de *Colletotrichum* spp. Para tanto, faz-se necessário a seleção de regiões gênicas de cópia única e que apresentem sinal filogenético, como por exemplo, a região ITS (*Internal Transcribed Spacers*). Estudos baseados em dados moleculares indicam que as espécies complexas do gênero *Colletotrichum* são formadas por subpopulações, com morfologia similar, porém, geneticamente distintas. Tal fato sugere a necessidade de reorganização da sistemática do gênero, com possibilidades para descrição de novas espécies ou táxons intraespecíficos (JOHNSTON & JONES, 1997). Em alguns casos, espécies já descritas poderiam ser reavaliadas e agrupadas de acordo com a proximidade genética e, a especificidade hospedeira seria empregada para a designação do taxon intra-específico (SHERRIFF et al., 1994).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar e identificar espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do cajueiro provenientes do Nordeste do Brasil e avaliar suas relações filogenéticas.

Referências

AFANADOR-KAFURI, L. et al. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarilho, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus.

Phytopathology, v. 93, n.5, p.579-587, 2003.

ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. **Cajucultura. Modernas técnicas de produção**. Fortaleza:

EMBRAPA/CNPAT, 1995. 292 p.

- BARRET, J. **Molecular variation and evolution**. In: RAYNER, C. M. et al. (Eds.). *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge: University Press, 1989. p. 83-95.
- BARROS, L.M. **Caju produção**. Brasília: Embrapa, 2002. 148 p. (Frutas do Brasil).
- CAIXETA, E.T. et al. **Tipos de marcadores moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: Os Editores, 2006. p. 9-78.
- CAJUCULTURA. **Previsão de safra 2010**. Disponível em: http://www.cajucultura.com/p_brasil.html. Acesso em 11 fev. 2011.
- CANNON, P.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present, future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. ***Colletotrichum: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction***. St. Paul: APS Press, 2000. p.1-20.
- CARDOSO, J.E.; FREIRE, F.C.O. Identificação e manejo das principais doenças. In: MELO, Q. M. S. (Org). **Caju fitossanidade**. Brasília: Embrapa, 2002. p. 41-51 (Frutas do Brasil).
- CASARRUBIAS-CARRILLO, U. et al. Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. Aislado de fruto de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v.21, n.3, p.338-345, 2003.
- COLE, G.T.; KENDRICK, B. **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press. 1981. 590p.
- DURÁN, A., MORA, D.; RAMÍREZ, L. Los pecíolos de la papaya como fuente de inóculo de la antracnosis y su eliminación como práctica de control. **Agronomía Mesoamericana**, v.11. n.1, p.7-14, 2000.
- GONZÁLES, E.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. Classification of the ecology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity test. **Phytopathology**, v.96, n.9, p.983-992, 2006.

GUERBER, J.C.; CORREL, J.C. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. **Mycologia**, v.93, n.1, p.216-229, 2001.

LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB, 1988. 453 p.

FAOSTAT. **Food and Agricultural commodities production - Cashew nuts with shell** - 2008.

Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 2 fev. 2011.

FREIRE, F.C.O. Doenças do cajueiro. In: SANTOS FILHO, H.P. et al. **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: EMBRAPA/CNPAT, 2003. p.391-334.

HODSON, A.; MILLS, P.R.; BROWN, A.E. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 3, p. 329-335, 1993.

MCDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.349-379, 2002.

MILGROOM, M.C. The synthesis of genetics and epidemiology contributions of population biology in plant pathology. **Journal of Plant Pathology**, v.83, Suplemento, p.57-62, 2001.

SANTOS FILHO, H.P.; BARBOSA C.J.; NICKEL, O. **Doenças do cajueiro**. In: FREIRE, F. C. O. CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Eds.). Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Brasília: Embrapa, 2003. p.391-334.

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

YANG, H. A.; SWEETINGHAM, M. W. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.49, n.8, p.1213-1223, 1998.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* PROVENIENTES DE CAJUEIRO

Avaliação de meios de cultura para *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de cajueiro

Luís Gustavo Chaves da Silva^{1*}, Francisco Marto Pinto Viana², Marcos Paz Saraiva Câmara¹, José Emilson Cardoso², Alex Queiroz Cysne³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - CEP 52171-900, Recife/PE, chaveslg@gmail.com, mcamara@depa.ufrpe.br

²Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra Sara Mesquita, 2270 - Planalto do Pici, CEP 60511-110 - Fortaleza – CE, fmpviana@cpat.embrapa.br, emilson@cpat.embrapa.br

³Embrapa Amazônia Ocidental Rodovia AM-10, Km 29, Caixa Postal 319 - Manaus/AM- Brasil - 69010-970, alexcysne@gmail.com

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, Bolsista do CNPq - Brasil.

Resumo - Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* obtidos de folhas de cajueiro foram avaliados quanto ao crescimento, morfologia e esporulação em seis meios de cultura: BDA, CA, BCA, AA, V8 e CAJU. O resultado do crescimento total foi comparado pelo teste de Kruskal-Wallis ($P=0,05$), com crescimentos médios de 59, 54, 48, 42, 41 e 25 mm de diâmetro respectivamente para BDA, V8, CAJU, AVEIA, CA e BCA. A esporulação obteve 4,18a, 3,74a, 3,65a, 2,78ab, 1,87bc, 0,84c x 10⁷ esporos/ml, respectivamente para CAJU, BDA, AVEIA, V8, BCA e CA comparadas pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Com relação a morfologia das colônias, é possível concluir que os meios de cultura testados tiveram efeito heterogêneo, tanto para isolados de origens geográficas diferentes, como também para os de mesma região. O trabalho demonstrou a potencialidade de um meio de cultura até então não descrito na literatura científica (FARELO DE CAJU – ÁGAR) para estudos da antracnose do cajueiro.

Termos para indexação: antracnose, ecologia, variabilidade, morfologia, esporulação, crescimento

Evaluation of culture media for *Colletotrichum gloeosporioides* from cashew

Abstract – *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* from leaves of cashew were evaluated for their growth, morphology and sporulation in six culture media: BDA, CA, BCA, AA, V8 and CASHEW. The total growth was compared by Kruskal-Wallis test ($P=0.05$), with average growth rates of 59, 54, 48, 42, 41 and 25 mm diameter respectively for BDA, V8, CASHEW, AA, CA and BCA. Sporulation got the 4.18a, 3.74 a, 3.65 a, 2.78 ab, 1.87 bc, 0.84 c $\times 10^7$ spore/ml, respectively CASHEW, BDA, OATS, V8, BCA and CA were compared by Tukey test ($P=0.05$). The colony morphology, we conclude that the media tested were heterogeneous effect, both for isolates from different geographical origins, but also for the same region. The study shows the potential of a new medium, until not described in scientific literature (BRAN CASHEW - AGAR) for studies of anthracnose of cashew.

Index terms: anthracnose, ecology, variability, morphology, sporulation, growth

Introdução

Fungos do gênero *Colletotrichum* são importantes agentes fitopatogênicos que causam doenças em diversas culturas, como é o caso de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., agente etiológico da antracnose do cajueiro (SUTTON, 1992). Desta forma, estudos relacionados com a fisiologia, morfologia e patogenicidade destes fungos se tornam relevantes, visando o combate à doença ou a obtenção de clones tolerantes. O cultivo *in vitro* destes fungos é de grande importância para a sua utilização em trabalhos que exijam inóculo puro e em quantidades consideráveis. Para isto é necessário estabelecer condições de cultivo que permitam o bom desenvolvimento destes microorganismos. A seleção de meios de cultura é uma etapa importante em trabalhos de pesquisa com fungos (CROUS et al., 2009). A literatura mostra a

tentativa de pesquisadores para melhorar a eficiência de produção de inóculo usando meios de cultura naturais ou semi-sintéticos (MONTARROYOS, 2007; MELO, 2004; HANADA, 2002), pois acredita-se que sucos oriundos de folhas ou de outras partes vegetais, podem exercer efeitos estimulantes no crescimento micelial e na esporulação de vários fungos (CROUS et al., 2009; DHINGRA & SINCLAIR, 1985). Porém não há relatos na literatura do comportamento de *C. gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do cajueiro, no meio de cultura Farelo de Castanha de Caju - Ágar (CAJU).

Segundo Zauza et al. (2007), a maioria dos organismos cultiváveis cresce em meios contendo uma fonte de carbono e nitrogênio, além de outros elementos em menor quantidade, como potássio, fósforo, ferro, zinco, vitaminas, onde uma variação mínima da composição pode estimular ou inibir fases importantes da vida do indivíduo em teste.

Exemplos de que o meio de cultura influencia diretamente na morfologia, crescimento e esporulação dos fungos podem ser encontrados na literatura. Assis et al. (2002), utilizando meio BDA com diferentes fontes de carbono (glucose, maltose e amido), alterando o potencial hídrico do meio de cultura, fizeram uma caracterização fisiológica de isolados de *C. gloeosporioides*, analisando o crescimento micelial e esporulação do fungo. O meio de cultura adicionado com amido obteve o maior crescimento micelial para a maioria dos isolados estudados. Em estudos realizados por Carvalho et al. (2001) verificou-se que em BDA adicionado de PEG (Polietilenoglicol) 6000, a medida que a quantidade de soluto aumentava no meio de cultura, o diâmetro das colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* tinha seu crescimento micelial reduzido, demonstrando a sensibilidade desta espécie a variações da composição do meio de cultura. Por outro lado, com adição de manitol em BDA o fungo teve seu crescimento favorecido até o nível de - 0,61MPa. Machado et al. (2004) usando manitol como restritor hídrico verificaram que o crescimento micelial de *Botryodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gossypii* em meio BDA, não foi prejudicado pelos potenciais hídricos - 0,4; - 0,6; - 0,8 e 1,0 MPa, e o

crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *C. gossypii* tiveram seu crescimento estimulado nos menores potenciais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar seis meios de cultura com relação ao crescimento vegetativo total, esporulação e características morfológicas de isolados do gênero *Colletotrichum*.

Material e Métodos

Os meios de cultura (MC) utilizados foram batata-dextrose-ágar sintético Difco® (BDA); cenoura-ágar (CA); batata-cenoura-ágar (BCA); aveia-ágar (AA); suco V8-ágar (V8) e farelo de castanha de caju-ágar (CAJU). As formulações seguiram protocolos encontrados em Zazua et al. (2007) exceto MC CAJU que foi elaborado usando-se a composição de 20g de farelo de castanha de caju natural para 1 L de água destilada esterilizada, cozido por 10 min. em forno de microondas em potência média e acrescido de 17 de ágar, com posterior fusão do meio completo em forno de microondas por mais 5-7 minutos em potência média e em seguida esterilização em autoclave, proposta pela primeira vez neste trabalho. Os isolados monospóricos CCJ21, CCJ71 e CCJ101, ambos provenientes de cajueiro, um de espinheira santa (CMM1012) e dois de pimentão (CMM788 e CMM789) foram testados. Discos de 6 mm diâmetro de meio de cultura contendo estruturas do fungo, foram depositados em placas de Petri com 90 mm diâmetro contendo os meios descritos; incubados a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h, com cinco repetições por meio com seis isolados de diferentes regiões no Nordeste brasileiro. As avaliações iniciaram em 48 h e seguidas a cada 24 h, medindo-se o crescimento micelial em dois sentidos perpendiculares até o primeiro isolado atingir a borda do meio de cultura, que se deu no sétimo dia de acompanhamento. Avaliou-se a esporulação total em suspensões de esporos provenientes da raspagem de todas as placas das repetições, com posterior leitura em câmara de Neubauer em triplicata e usando-se a média por tratamento. Os resultados de crescimento total foram

analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (pois, não atendeu a pressuposição da ANOVA de homogeneidade da variância). As variações morfológicas foram avaliadas no sétimo dia de crescimento das colônias. As características estudadas foram C (coloração predominante da colônia: branco, cinza claro, cinza escuro, negro); ME (presença de massa de esporos); TC (textura da colônia: cotonosa, felpuda, farináceo, lacunosa; TOP (topografia da colônia: sem micélio aéreo, pouco e muito); SC (nº de setores da colônia). Todos dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($P=0,05$), considerando o meio por cada isolado testado. Por fim cada item morfológico analisado por Kruskal-Wallis que apresentou significância recebeu valor um (1) e os que não apresentaram significância valor zero (0) para montagem de uma matriz que foi analisada pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com uso do coeficiente de Jacard, para observação de formação de grupos.

Resultados e Discussão

Os resultados de crescimentos médios totais foram de 59, 54, 48, 42, 41 e 25 mm diâmetro respectivamente para BDA, V8, CAJU, AVEIA, CA e BCA testados pelo método de Kruskal-Wallis ($P=0,05$). Não houve diferenças significativas entre os isolados para cada meio testado, sendo semelhante aos dados encontrados por Serra (2008). Os maiores valores de crescimento médio para isolados de *Colletotrichum* obtidos por Tozze (2006) são semelhantes aos valores obtidos para BDA, V8 e CAJU variando de 0,89 a 0,45 cm/dia. Lopez (2010) também obteve resultados médios de crescimento micelial variando de 13,23 a 0,8 mm/dia onde os maiores valores obtidos pelo autor foram em meio Czarpec-V8. Em outro trabalho realizado por López & Pereira (2010) com os meios de cultura BDA, AVEIA e Manthur e isolados de *C. gloeosporioides* de pinha, foi observado menor crescimento micelial total em AVEIA (60,17 mm) e maior em BDA, atingindo médias de 90 mm, sendo ambos os valores superiores aos obtidos neste trabalho.

A esporulação foi significativa pelo teste de Tukey ($P=0,05$) e obteve melhores resultado seguindo a ordem CAJU, BDA, AVEIA, V8, BCA e CA. O meio CAJU obteve o maior número de esporos/ml, mas não diferenciou estatisticamente dos MC BDA, AVEIA e V8, porem foi superior a BCA e CA (Tabela 2). Houve variação entre os isolados que pode ser observado na Figura 1. O padrão para esporulação por meio de cultura foi mantido, porém para o isolado CCJ 71 proveniente de Campina Grande – PB houve melhor adaptação para o V8 que para BDA, contudo manteve esporulação semelhante para o MC CAJU. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Martins (2007) que testando meios de cultura líquidos observou variação de esporulação entre os isolados testados, bem como a variação quanto ao meio utilizado, obtendo melhor esporulação em meio batata-dextrose e suco V8. Pereira et al. (1998) comentam que o substrato pode influenciar a produção de propágulos de *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav. Estes autores observaram variação na produção de conídios por ocasião do cultivo do fungo em diferentes meios de cultura. Resultados semelhantes foram reportados por Neto et al. (1994) e Pria et al. (1997). López & Pereira (2010) testando três meios de cultura para *C. gloeosporioides* provenientes de pinha, detectou a variação de esporulação entre eles, tendo melhor resultado no meio Mathur, que chegou a produzir $2,23 \times 10^6$ esporos/ml, resultado este inferior aos obtido com os meios testados, exceto para CA no isolado CCJ101.

Para morfologia das colônias os parâmetros C e ME apresentaram diferenças significativas em todos os isolados, exceto para o isolado CCJ 71 (Tabela 3). Já TOP não apresentou diferenças significativas para o isolado CMM 788. TC foi capaz de diferenciar os isolados CCJ 101, CCJ 71 e CMM 1012 (Tabela 3). E por fim, SC só apresentou variações significativas para os isolados CCJ 101 e CMM 789 (Tabela 3). A variação morfológica já era esperada devido a grande variabilidade conhecida do gênero *Colletotrichum*. Menezes (2002) sugere que isolados pertencentes à mesma espécie de *C. gloeosporioides* apresentaram entre si grande variabilidade no mesmo substrato, podendo haver relação com a presença de raças fisiológicas. Analisando as variações morfológicas por UPGMA (Unweighted Pair Group

Method with Arithmetic Mean), baseado nos resultados do teste Kruskal-Wallis (Tabela 3), para existência ou não de variação do caráter morfológico considerando todos os meios testados juntos, foi possível observar a formação de três grupos distintos de similaridade pelo coeficiente de Jaccard (Figura 2), onde o grupo A compreende apenas o isolado CCJ 71, o grupo B apenas o isolado CMM 788 e o demais no grupo C, que apresenta isolados tanto de *C. gloeosporioides* como de *C. acutatum*. Nenhum padrão morfológico foi repetido por qualquer isolado, desta forma observa-se que a variação dos isolados quanto a morfologia, em seleção de meios de culturas é uma variável inadequada. Crous et al.(2009) comenta que a escolha de um meio de cultura é baseada na finalidade da atividade científica, acredita-se que o meio de cultura FARELO DE CAJU – ÁGAR, possa ser usado como mais um artifício na rotina de laboratórios de fitopatologia, por se tratar de um meio que é de baixo custo, fácil elaboração e com resultados eficientes para produção de inóculo. Para os três isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cajueiro, a esporulação em MC CAJU foi elevada e estável (Figura 1), mesmo com a variabilidade observada nas características morfológicas (Figura 2, Tabela 3), que reforçam o potencial deste meio de cultura, pois os MC BDA e V8 apresentaram redução significativa no número de esporos respectivamente para os isolado CCJ 71 e CCJ 101. Mais estudos devem ser realizados com mais isolados e outras espécies de fungos, bem como uma investigação da composição bioquímica do meio de cultura.

Conclusões

1 – O meio de cultura a base de castanha de caju prove condições nutricionais para crescimento e esporulação de *C. gloeosporioides*. 2 – O trabalho demonstrou a potencialidade de um meio de cultura (FARELO DE CAJU – ÁGAR) nunca antes testado para estudos da antracnose do cajueiro. 3 - Os meios testados tiveram efeito heterogêneo para morfologia, esporulação e crescimento dos isolados testados.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

A Embrapa Agroindústria Tropical, por fornecer as instalações de pesquisa.

Referências

ASSIS, T.C.; MENEZES, M.; ANDRADE, D.E. Estudo comparativo de isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* a respeito do efeito da nutrição do nitrato de carbono com crescimento, esporulação e na patogenicidade em três variedades de morango. **Summa Phytopatologica**, v.27, n.2, p. 202-212, 2002.

CARVALHO, J.C.B; MACHADO, J.C.; VIEIRA, G.M. Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação à restrição hídrica do substrato agarizado. **Ciência Agrotécnica**, v.25, n.4, p. 999-1005, 2001.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. CBS Laboratory Manual Series 1:Fungal Biodiversity. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS),2009. 270p.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Florida: CRC Press, 1985. 434p.

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.170-173, 2002.

LÓPEZ, A.M.Q.; PEREIRA, D. dos S.T. Interação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e ecótipos de pinha.

Bragantia: Revista de Ciências Agronômicas, v.69, n.1, p.105-114, 2010.

MACHADO, J. da C.; OLIVEIRA, J. A. de; VIEIRA, M. das G. G.C.; ALVES, M. de C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*).

Revista Brasileira de Sementes, v.26, n.1, p. 62-67, 2004.

MARTINS, I.; PEIXOTO, J.R.; ÁVILA, Z.R. de; MELLO, S.C.M. de; PÁDUA R.R. de. Esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* em meios líquidos. **Summa phytopathol.** v.33, n.2, p.203-203, 2007.

MELLO, A.F.S.; MACHADO, A.C.Z; BEDENDO, I.P. DEVELOPMENT OF *Colletotrichum gloeosporioides* Isolated from green pepper in different culture media, temperatures, and light regimes. **Sciencia Agrícola**, v.61, n.5, p.542-544, 2004.

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

MONTARROYOS, A.V.; COELHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.; SANTOS, R. dos; SANTOS, V.F. dos ; ANDRADE, P.P. de; . Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.86-89, 2007.

NETO, E.F., NAKAMURA, K. & OLIVEIRA, J.C. Influência de alguns fatores na germinação de conídios, no crescimento micelial e na esporulação de alguns isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de *Passiflora*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.96-100, 1994.

PEREIRA, J.C.R., BATISTA, U.G., GUIMARÃES, F.B. & MISUBUTI, E.S.G. Efeito de diferentes meios de cultura sobre a esporulação e o potencial de inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.186-189, 1998.

PRIA, M.D., FILHO, A.B. & AMORIM, L. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola* e *Alternaria* sp. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.181-183, 1997.

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

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

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

ZAUZA, E.A.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.).

Métodos em fitopatologia. Viçosa: Editora UFV. 2007, p.23-50.

Tabela 1. Quadro de análise de variância da esporulação nos meios de cultura testados.

| Fonte de variação | GL | SQ | QM | Fcal |
|-------------------|----|--------|--------|----------|
| Meio | 5 | 751,30 | 150,26 | 15,423** |
| Erro | 12 | 107,16 | 9,74 | |
| Total | 16 | 858,47 | | |

CV = 28,84% ** significância a $P=0,01$

Tabela 2. Resultado geral do teste de separação de médias de esporulação nos meios de cultura

| Meio | Esporulação x 10^7 esporos/ml |
|-------|---------------------------------|
| CAJU | 4,18 a |
| BDA | 3,70 a |
| AVEIA | 3,65 a |
| V8 | 2,78 ab |
| BCA | 1,87 cb |
| CA | 0,84 c |
| Média | 2,83 |

Para cada meio de cultura utilizado, médias de esporulação seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Tabela 3. Variação observada pelo teste de Kruskal-Wallis ($P=0,05$), para todas as variáveis morfológicas analisadas.

| Variáveis | CCJ21 | CCJ71 | CCJ101 | CMM2012 | CMM788 | CMM789 |
|------------|-------|-------|--------|---------|--------|--------|
| C | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| ME | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| TOP | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| TC | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SC | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Coloração predominante da colônia (C); presença de massa de esporos (ME); textura da colônia (TC); topografia da colônia (TOP); nº de setores da colônia (SC). 0 – não houve significância 1 – houve significância.

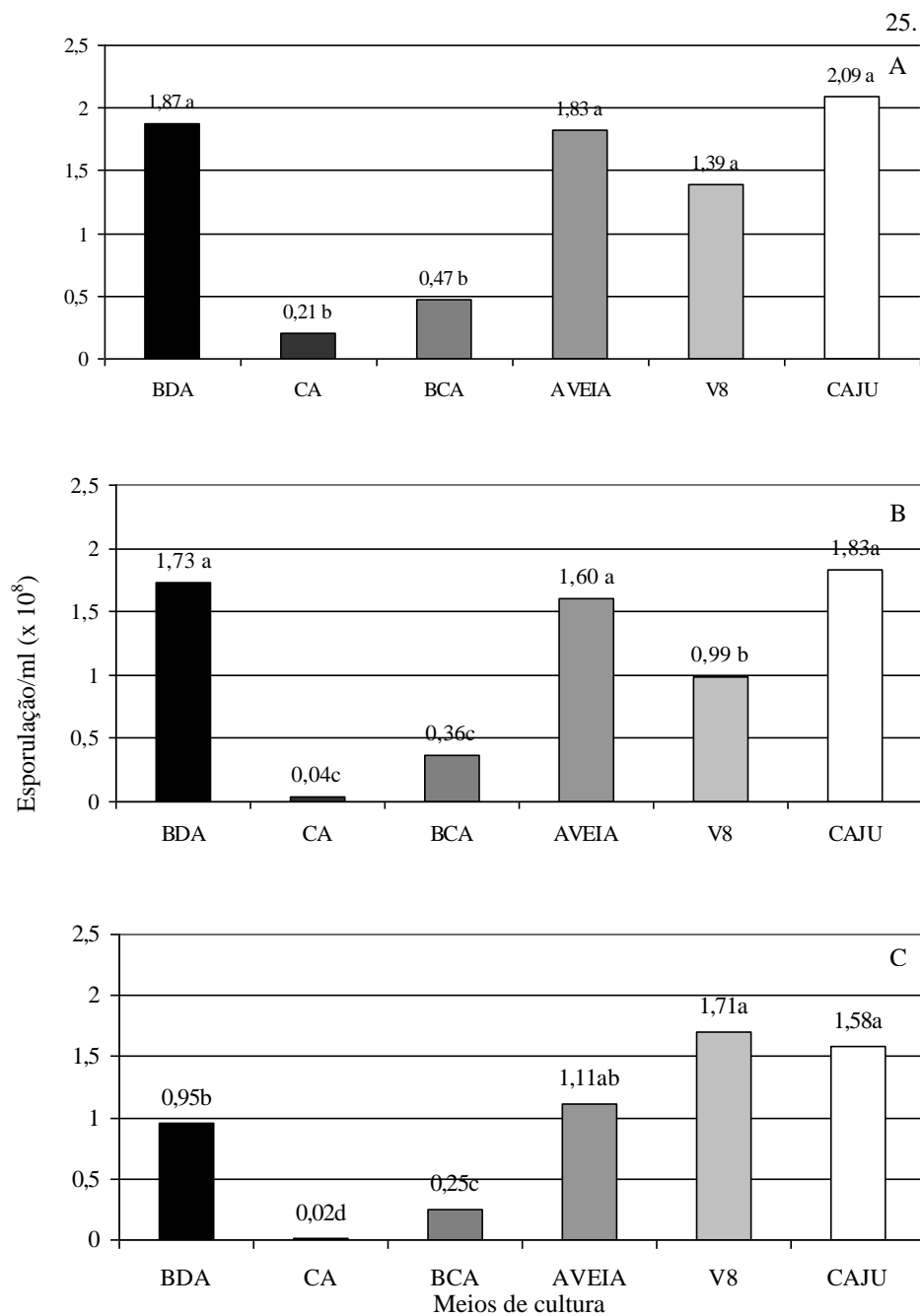


Figura 1. Esporulação total dos isolados CCJ 21 (A), CCJ 101(B) e CCJ 71 (C) em todos os meios de cultura testados. Para cada meio de cultura utilizado, médias de esporulação seguidas de mesma letra minúscula iguais, indicam que as médias não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

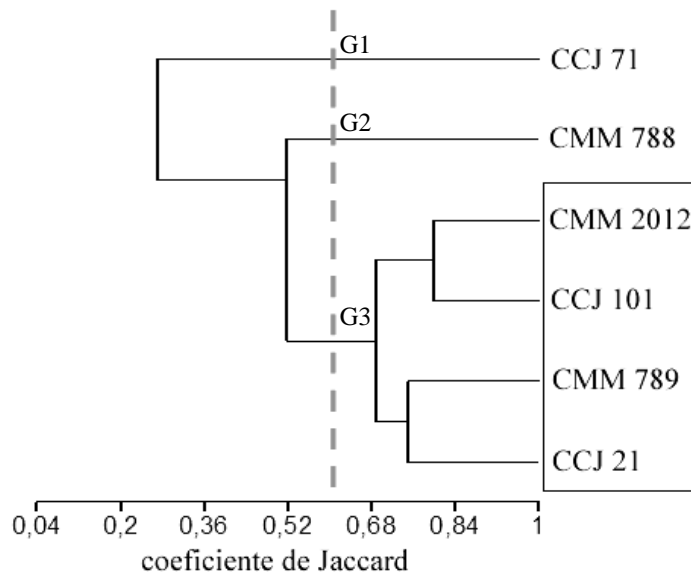


Figura 2. Análise da variação morfológica de isolados de *Colletotrichum* por UPGMA.

CAPÍTULO III

**VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* sp. À
CLONES DE CAJUEIRO**

Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum* sp. à clones de cajueiro

Luís Gustavo Chaves da Silva^{1*}, Francisco Marto Pinto Viana², Marcos Paz Saraiva Câmara¹, José Emilson Cardoso² e José G. M. Melo³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - CEP 52171-900, Recife/PE, chaveslg@gmail.com, mcamara@depa.ufrpe.br

²Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra Sara Mesquita, 2270 - Planalto do Pici, CEP 60511-110 - Fortaleza – CE, fmpviana@cnpat.embrapa.br, emilson@cnpat.embrapa.br

³Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, 2977 - CEP 60021-970 - Fortaleza – CE, Caixa Postal: 12.168, joseglauber@yahoo.com.br

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, Bolsista do CNPq - Brasil.

Resumo - Uma importante doença do cajueiro, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporieoides*, ainda possui poucos estudos quanto à sua variabilidade patogênica. O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento de clones comerciais de cajueiro, frente a isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes regiões ecoclimáticas do Nordeste brasileiro. Os isolados provenientes dos municípios do Trairi-CE, Goiana-PE, Taquaritinga-SP, São Luís-MA, Serra do Mel-RN, Campina Grande-PB e um isolado de *Colletotrichum acutatum* proveniente de pimentão da coleção de fungos fitopatogênicos `Professora Maria Menezes` – UFRPE, foram inoculados em folhas dos clones BRS-226, CCP-76, CCP-09 e LINDOLFO. Foi observada a existência de variabilidade patogênica na combinação dos isolados e clones testados.

Termos para indexação: patogenicidade, controle, resistência, tolerância, epidemiologia

Abstract – Anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporieoides*, is an important disease of cashew plants, yet few studies dealing with pathogenic variability are available. Therefore, the

objective of this study was to evaluate the reaction of cloned cashew trees to *C. gloeosporioides* under environmentally different regions. Isolates from the municipalities of Trairi-CE, Goiana-PE, Taquaritinga-SP, São Luís-MA, Serra do Mel-RN, Campina Grande-PB and an isolated *Colletotrichum acutatum* of capsicum from the Professor Maria Menezes collection of plant pathogenic fungi - UFRPE, inoculated on the leaves clones BRS-226, CCP-76, CCP-09 and Lindolfo. Pathogenic variability was observed among isolates and clones combined.

Index terms: pathogenicity, control, resistance, tolerance, epidemiology

Introdução

A castanha de caju é o produto agrícola mais importante do Estado do Ceará, com geração de mais de 100 mil empregos diretos e indiretos; sendo também muito relevante para os estados do Piauí e Rio Grande do Norte (FREIRE et al., 2002). As epidemias ocasionadas por *Colletotrichum gloeosporioides* em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) destacam-se, como uma das principais doenças desta cultura e pode levar a perdas de mais 40% da produção (CARDOSO et al., 1999). Há poucas e desatualizadas pesquisas sobre a doença, havendo grande demanda de informações básicas para os programas de melhoramento e manejo integrado da doença (FREIRE et al., 2002; CARDOSO et al., 1999; BARROS, 2002). O agente etiológico da antracnose do cajueiro é descrito como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc (SUTTON, 1992). O gênero *Colletotrichum* apresenta uma grande variabilidade genética e a literatura especializada vem, seguidamente, mostrando relatos de variação na patogenicidade dos fungos deste grupo, dificultando a adoção de procedimentos adequados de manejo, principalmente nos programas de melhoramento (GIBLING et al., 2010; COSTA et al. 2009; DAVID & SOUZA, 2009; MEDEIROS et al. 2008; ANSARI et al., 2004).

Mafaciale et al. (2008) observaram diferenças significativas de agressividade dos isolados de *C. gloeosporioides* em folhas maduras e intermediárias de pupunheira, porém, nas

folhas jovens, as diferenças de agressividade entre os isolados não foram significativas. Já Giblin et al. (2010) relatam a variação de patogenicidade de acordo com a origem dos isolados de *C. gloeosporioides*, de abacateiro e mangueira, tanto em ensaios em casa de vegetação como no campo. Serra et al. (2008) descreve uma interessante relação de patogenicidade, demonstrando que isolados monospóricos de *Colletotrichum* obtidos de cajueiro foram mais agressivos que os multiespóricos, enquanto que isolados de mangueira multiespóricos foram mais agressivos que os monospóricos. Isso leva a crer que as relações de parasitismo podem variar para cada patossistema, mesmo em se tratando de patógenos pertencentes a um mesmo gênero. Desta forma, torna-se necessária uma investigação mais aprofunda da relação existente entre patógeno e hospedeiro, que leve a um maior entendimento da doença, no caso, a antracnose do cajueiro. O objetivo do trabalho foi avaliar a reação de clones de cajueiro a isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes de ecorregiões distintas, de modo a definir os melhores clones para cada uma dessas áreas.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de fitopatologia da Embrapa Agroindústria tropical em 2010. Folhas jovens totalmente expandidas, até a terceira folha de um ramo, recém destacadas, de 4 clones de cajueiro (BRS-226, CCP-76, CCP-09 e LINDOLFO) foram inoculadas com os isolados CCJ01, CCJ08, CCJ10, CCJ14, CCJ20, CCJ21, CMM788, provenientes dos municípios Trairi-CE, Goiana-PE, Taquaritinga-SP, São Luís-MA, Serra do Mel-RN, Campina Grande-PB e isolado de *Colletotrichum acutatum* proveniente de Pimentão da coleção de fungos fitopatogênicos Maria Menezes UFRPE. Como inóculo foram utilizados discos de 6mm de diâmetro, de meio de cultura contendo estruturas do fungo, obtidos de culturas puras, monospóricas, com 10 dias de crescimento. O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, em arranjo fatorial, onde cada

repetição foi constituída de uma folha inoculada com três discos equidistantes entre si, sem e com ferimento, na face adaxial do limbo foliar e os fatores foram clone x isolado. Os ferimentos foram feitos apenas na porção direita do limbo com o auxílio de uma almofada de alfinetes entomológicos previamente flambados. O pecíolo de cada folha foi envolto em algodão umedecido com solução nutritiva de macronutrientes e depositadas em bandejas plástica contendo folhas de papéis-toalha umedecidos com água destilada e esterilizada, e cobertas com filme plástico transparente, servindo como câmaras úmidas, onde as folhas permaneceram por 3 dias. Essas foram mantidas em sala de crescimento a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas para estimar o período de incubação (PI), bem como raspagens na face abaxial, logo abaixo da região onde os discos foram depositados, com o auxílio de estiletos flambados para detecção do período latente (PL). O material obtido pela raspagem foi avaliado em preparações microscópicas com o uso de microscópio de luz, para observação de esporos. Também, foi observado o surgimento de massas de esporos na face abaxial das folhas com o auxílio de lupas. No último dia de avaliação, todas as folhas foram digitalizadas com uso de scanner de mesa para avaliação da severidade total (com e sem ferimento), tendo sido empregado o programa computacional ASSESS 2.0 (APS) para obtenção do percentual de área foliar lesionada. Os dados de severidade obtidos foram avaliados segundo análise da variância (ANOVA) em arranjo fatorial por meio do programa estatístico SISVAR 5.1 Build 72 (UFLA).

Resultados e Discussão

Houve variação entre os isolados e entre clones com relação ao PI e PL (Tabela 1). Apenas os isolados CCJ08, CCJ14 E CCJ21 conseguiram completar o PI em 24h nos clones BRS226 e CCP76. Todos os isolados, em 72h, completaram o PI nas inoculações com ferimento, exceto o isolado CMM788 inoculado no clone CCP76. O gênero *Colletotrichum* é conhecido por

apresentar capacidade de infectar o tecido íntegro do hospedeiro, porém observou-se que, em algumas combinações entre os isolados e os clones de cajueiro estudados neste trabalho essa regra tida como geral não se aplicou, pois em algumas situações os isolados não foram capazes de penetrar os tecidos de alguns clones, levando a suspeita de especializações fisiológicas. À exemplo do clone CCP76 que foi susceptível, mesmo sem ferimento, aos isolados CCJ01, CCJ10 e CCJ14 provenientes de regiões com temperaturas médias acima de 28 °C. Já o BRS226 foi infectado sem ferimento apenas pelos isolados CCJ08, CCJ14, CCJ21 e CMM788, mesmo este último não sendo patógeno de cajueiro e sim de pimentão. Com relação ao clone Lindolfo, tido como muito susceptível a antracnose, foi infectado apenas pelos isolados CCP08 e CCP14 na ausência de ferimentos. O clone CCP09 foi o único susceptível a todos os isolados de cajueiro nas inoculações sem ferimento. O PL foi variável também para todos os clones, sendo observados apenas 72h após a inoculação (Tabela 1). Os clones BRS226 e Lindolfo não apresentaram PL em até 72h para o isolado CCJ10. Para CCP76 os isolados CCJ08 e CCJ20 não completaram PL no tempo de avaliação do experimento. Já o CCP09 os isolados CCJ01 e CCJ21 também não completaram o PL durante a avaliação. Em nenhum dos clones foi detectado PL para o isolado CMM788, demonstrando-se menos compatível com o hospedeiro testado mesmo que tenha conseguido infectá-lo. A formação de massa de esporos só foi observada no clone CCP09 para o isolado CCJ10 e no clone BRS226 para os isolados CCJ14 e CCJ20, detectados no último dia da avaliação. Analisando os valores de severidade total por meio da ANOVA, em arranjo fatorial, foi possível detectar significância ($P=0,01$) na interação entre isolados e clones (Tabela 2). A severidade variou de 99% para o isolado CCJ14 a 0% para o isolado CMM788 ambos no clone CCP76. Na Tabela 3 observa-se que o clone mais resistente foi o BRS226, seguido do Lindolfo, contrariando as expectativas, o Lindolfo é tido como muito susceptível em condições de umidade elevada, como as que ocorrem no litoral nordestino, suplantou os clones CCP76 e CCP09, que obtiveram os maiores valores de severidade e não diferenciando entre si. Sharma et al. (2005) e Xiao et al. (2004) conseguiram detectar a formação de grupos específicos com

relação a patogenicidade à morangueiro, que exemplificam a plasticidade genética do gênero *Colletotrichum*. Variabilidade patogênica também foi encontrada por Souza & Sobrinho (2000), que detectou grande variabilidade de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de frutos de mangueiras, reforçando os resultados obtidos neste trabalho. Muniz et al. (1998) observa que isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de diversas fruteiras, foram patogênicos a folhas de cajueiro e considera que a diferença de severidade pode estar relacionada a interação com o ambiente, produção de enzimas pelos fungos e a variação de genótipo da planta. Tal informação leva a crer que é possível a ocorrência de alguns destes eventos também para este ensaio.

Os resultados não mostram evidências de resistência horizontal, semelhante às respostas obtidas por Davide & Souza (2009), que trabalhando com uma raça de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. And Magn.), constaram ineficiência nas cultivares diferenciadoras de feijoeiro utilizadas, bem como uma variação significativa na virulência dos isolados testados.

Cardoso (1999) comenta a necessidade dos programas de melhoramento em considerar a variabilidade de isolados de *C. gloeosporioides*, por encontrar diferenças da severidade de antracnose em uma competição de clones com cajueiros anões, também apoiado por Freire (2002). Estas informações demonstram a necessidade de estudos com maior número de isolados de regiões distintas, bem como uso de mais clones, para informações mais substâncias quanto a variabilidade patogênica neste patossistema.

Conclusões

1 - Nas condições empregadas neste estudo há variabilidade patogênica entre os isolados testados. 2 - O clone CCP09 foi o mais susceptível. 3 - O clone CCP76 apresentou um padrão de resistência vertical. 4 - Há especificidade patogênica de isolados por alguns clones 5 - O clone mais resistente é o BRS226.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

A Embrapa Agroindústria Tropical, por fornecer as instalações de pesquisa.

Referências

- ANSARI, K.I.; PALACIOS, N.; ARAYA, C.; LANGIN, T.; DOOHAN, F. M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. **Plant Pathology**. v.53, n.5, p.635-642, 2004.
- CARDOSO, J. E.; CAVALCANTI, J. J. V.; CAVALCANTI, M. I. R.; ARAGÃO, M. L.; FELIPE, E. M. Genetic resistance of dwarf cashew (*Anacardium occidentale* L.) to anthracnose, black mold and angular leaf spot. **Plant Pathology**, v.18, p. 23-27. 1999
- COSTA, I.F.D.; BALARDIN, R.S.; MEDEIROS, L.A.M.; LENZ, G.; GULART, C.A.; ZEMOLIN, C.R.; SILVA, T.M.B. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*. **Tropical Plant Pathology**. v.34, n.1, p.47-50, 2009.
- BARROS, L. M. **Caju produção. Brasília: Embrapa**, (Frutas do Brasil). 2002. 148p.
- DAVIDE, L.M.C.; SOUZA, E.A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p. 23-30, 2009.
- FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. P. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**. v.21, p.489 - 494. 2002.

- GIBLIN, F.R.; COATES, L.M.; IRWIN, A.G. Pathogenic diversity of avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose and pepper spot in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.39, p. 50-62, 2010.
- MAFACIOLI, R.; Tessmann, D.J.; Santos, A.F.; Vida, J.B. Variabilidade patogênica e efeito de carboidratos no crescimento micelial, esporulação e agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.18-21, 2008.
- MEDEIROS, L.A.M.; BALARDIM, R. S.; COSTA, I.F.D.; GULART, C.A.; LENZ, G. Reação de germoplasma crioulo de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) a *Colletotrichum lindemuthianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.4, p.273-280, 2008.
- MUNIZ, M. de F.S.; SANTOS, R. de C.R.; BARBOSA, G.V. de S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.177-179, 1998.
- SERRA, I.M.R.S.; COELHO, R.S.B.; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathol.** v.34, n.2, p.113-120, 2008.
- SOUZA, C.L.C.; SOBRINHO, C.A. Avaliação da variabilidade morfológica e patogênica do agente causal da antracnose da mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, v.33, p.426, 2000.
- SHARMA, P. N.; KAUR, M.; SHARMA, O. P.; SHARMA, P.; PATHANIA, A. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici*, the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of north-western India. **Journal of Phytopathology**, v.153, n.4, p.232–237, 2005.
- SUTTON, B. L. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

XIAO, C.L.; MACKENZIE, S.J.; LEGARD, D.E. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* from strawberry and noncultivated hosts. **Phytopathology**, v.94, n.5, p.446-453, 2004.

Tabela 1. Período de incubação e período latente em folhas destacada dos clones de cajueiro com e sem ferimento.

| Clone | Isolado | 24h | | 48h | | 72h | |
|----------|------------|-----|---|-----|---|------|------|
| | | S | F | S | F | S | F |
| BRS226 | CCJ01 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 pl |
| | CCJ08 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 pl | 2 pl |
| | CCJ10 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 |
| | CCJ14 | 1 | 1 | 3 | 2 | 3 pl | 3 pl |
| | CCJ20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 pl |
| | CCJ21 | 1 | 0 | 2 | 4 | 3pl | 4 pl |
| | CMM788 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 |
| | Testemunha | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lindolfo | CCJ1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 pl |
| | CCJ8 | 0 | 3 | 1 | 3 | 4 pl | 4 pl |
| | CCJ10 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 |
| | CCJ14 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 pl | 1 pl |
| | CCJ20 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 4 pl |
| | CCJ21 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 | 4 pl |
| | CMM788 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | Testemunha | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CCP76 | CCJ1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 pl | 1pl |
| | CCJ8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | CCJ10 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 pl | 3 pl |
| | CCJ14 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 pl | 4 pl |
| | CCJ20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| | CCJ21 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 pl |
| | CMM788 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Testemunha | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CCP09 | CCJ1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | CCJ8 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 pl | 3 pl |
| | CCJ10 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 pl | 4 pl |
| | CCJ14 | 0 | 2 | 3 | 2 | 4 pl | 4 pl |
| | CCJ20 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 pl | 3 pl |
| | CCJ21 | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| | CMM788 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | Testemunha | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

S - sem ferimento; F - com ferimento; 0 a 4 – número de repetições que completaram período de incubação; pl – completou período latente.

Tabela 2. Quadro de análise de variância em esquema fatorial clone X isolado para as médias de severidade

| Fonte de variação | GL | SQ | QM | Fcal |
|-------------------|-----|---------|---------|----------|
| Clone | 3 | 7523,8 | 2507,92 | 125,44** |
| Isolado | 6 | 11646,3 | 1941,05 | 97,09** |
| Interação | 18 | 35764,5 | 1986,92 | 99,38** |
| erro | 84 | 1679,4 | 19,99 | |
| total | 111 | 56614,0 | | |

CV = 21,92% ** significância a $P=0,01$

Tabela 3. Resultado geral do teste de separação de médias de severidade

| Isolado / Clone | CCP09 | CCP76 | Lindolfo | BRS226 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CCJ 01 | 14,7 bB | 64,5 bD | 15,0 bC | 9,0 aAB |
| CCJ 08 | 27,8 bC | 10,7 aBC | 12,3 aBC | 17,8 aB |
| CCJ 10 | 52,8 cD | 13,3 bC | 8,3 abABC | 4,8 aA |
| CCJ 14 | 21,5 abBC | 95,0 cE + | 14,3 aC | 27,5 bC + |
| CCJ 20 | 55,8 bD + | 2,8 aAB | 2,8 aA | 3,0 aA |
| CCJ 21 | 22,0 bBC | 11,3 aBC | 43,8 cD + | 6,0 aA |
| CMM 788 | 5,3 aA - | 0,0 aA - | 4,3 aAB - | 2,0 aA - |
| Total | 147,1 | 198,6 | 114,2 | 70,1 |
| Média | 21,01 c | 28,37 c | 16,31 b | 10,0 a |

Para cada clone utilizado, médias severidades seguidas de mesma letra minúscula indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Para cada isolado, médias de severidade seguidas de mesma letra maiúscula, indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$). + maior média, - menor média.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO CAJUEIRO

Caracterização cultural, morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, associados à antracnose do cajueiro

Luís Gustavo Chaves da Silva¹, Francisco Marto P. Viana², Marcos P. S. Câmara¹, José E. Cardoso²,
Joilson Silva Lima³, Raul Monte dos Anjos³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos -
CEP 52171-900, Recife/PE, chaveslg@gmail.com; mcamara@depa.ufrpe.br

²Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra Sara Mesquita, 2270 - Planalto do Pici, CEP 60511-
110 - Fortaleza – CE, fmpviana@cnpat.embrapa.br, emilson@cnpat.embrapa.br

³Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, 2977 - CEP 60021-970 - Fortaleza – CE,
Caixa Postal: 12.168, raulmontedosanhos@yahoo.com.br; joilson_quixbim@yahoo.com.br

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, Bolsista do CNPq - Brasil.

Resumo - A antracnose em frutíferas, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* é considerada uma doença economicamente importante no Nordeste do Brasil, incidindo sobre ramos novos, folhas, inflorescências e frutos. Espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas quase exclusivamente através da caracterização morfológica, cultural e fisiológica. Características como morfologia de conídios, coloração da colônia, crescimento micelial e formação de massa de esporos são muito utilizadas, porém *C. gloeosporioides* apresenta grande variação morfológica e fisiológica. O presente trabalho caracterizou isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), provenientes de diferentes regiões do Brasil, quanto aos aspectos culturais das colônias, morfologia de conídios e características fisiológicas.

Termos para indexação: antracnose, variabilidade, morfologia, esporulação, crescimento, temperatura

Abstract – Anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides* is an economically important disease in northeastern Brazil, on young branches, leaves, flowers and fruits. *Colletotrichum* species have been identified almost exclusively by morphological, physiological and cultural. Features such as conidial morphology, colony color, mycelial growth and spore mass formation are widely used, but *C. gloeosporioides* presents great morphological and physiological variation. The present study characterized isolates of *C. gloeosporioides* obtained from cashew (*Anacardium occidentale* L.) from different regions of Brazil concerning the cultural aspects of colony morphology and physiological characteristics of conidia.

Index terms: anthracnose, variability, morphology, sporulation, growth, temperature

Introdução

O gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes entre os fungos fitopatogênicos em nível mundial, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, envolvendo espécies que causam doenças de expressão econômica em leguminosas, cereais, hortaliças e culturas perenes, incluindo diversas freuteiras (FREEMAN, 2000). A antracnose em frutíferas, causada na maioria dos casos por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., é considerada uma doença economicamente importante no Nordeste do Brasil (SERRA, 2004), incidindo sobre ramos novos, folhas, inflorescências e frutos. Nas folhas, há o aparecimento de manchas escuras e de contornos irregulares, que resultam em lesões ou perfurações quando os tecidos necrosados se destacam. As inflorescências afetadas apresentam flores escuras, tomando o aspecto de queimadas pelo fogo, morrendo a seguir. Lesões podem levar à queda dos frutos, antes da maturação fisiológica, ou mumificação quando ainda novos (MENEZES, 2005). A doença pode ocasionar prejuízos que variam em função do grau de suscetibilidade da planta hospedeira e das condições ambientais. Espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas quase exclusivamente através da caracterização morfológica, cultural e fisiológica. Características como morfologia de

conídios, coloração da colônia, crescimento micelial e formação de massa de esporos são muito utilizadas. Alguns autores afirmam que *C. gloeosporioides* apresenta grande variação morfológica e fisiológica. Até mesmo isolados monoconidiais têm mostrado elevada variabilidade quando expostos a diferentes condições culturais (FERRAZ, 1997; KEUFMANN, 1996; MENEZES, 2002).

O presente trabalho objetivou caracterizar isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), provenientes de diferentes regiões do Brasil, quanto aos aspectos culturais das colônias, morfologia de conídios e características fisiológicas dos isolados testados.

Material e métodos

Obtenção dos isolados

Os isolados multispóricos foram obtidos de cajueiro dos estados do Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Amazonas, São Paulo, Maranhão e Pernambuco. CCJ01 – CCJ22, mais um isolado de *C. acutatum* proveniente da coleção de culturas de fungos fitopatogênicos ‘Professora Maria Menezes’ (CMM788), para efeitos de comparação. O fungo foi isolado a partir de folhas com sintomas de antracnose. Fragmentos de tecidos foram retirados das margens das lesões, desinfestados superficialmente em uma solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, durante 1 minuto e, em seguida, lavados, em água destilada e esterilizada, por duas vezes e retirado o excesso de água em papel de filtro estéril. Logo após, os fragmentos foram dispostos em substrato Ágar-Água (AA) e, incubados à 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. A partir das culturas puras de *C. gloeosporioides* foram preparadas as monospóricas, por técnica de diluição em gota, onde uma suspensão de esporos era diluída para uma concentração de 1 a 3 esporos por 10 µl e uma gota com este volume transferida para placas de Petri com substrato AA, previamente marcada com nove círculos. Com 12 h de incubação foi verificada a

germinação em cada marcação para observação de um único crescimento micelial por marcação utilizando-se microscopia de luz e, em seguida, quando confirmado, transferido para meio de cultura BDA e posterior preservação em água destilada esterilizada.

Aspectos culturais das colônias e crescimento em BDA de *Colletotrichum gloeosporioides*

As 22 culturas monospóricas, referentes à cada área de coleta, com quatro repetições cada, em delineamento estatístico inteiramente ao acaso - DIC, foram cultivadas em meio BDA. Discos de 6 mm diâmetro de meio de cultura contendo estruturas do fungo, foram depositados em placas de Petri com 90 mm diâmetro; incubados a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h. As avaliações iniciaram em 48 h e seguidas a cada 24 h, medindo-se o crescimento micelial em 2 sentidos perpendiculares até o primeiro isolado atingir a borda da placa, que se deu no sétimo dia de acompanhamento.

As variações morfológicas foram avaliadas no sétimo dia de crescimento das colônias. As características estudadas foram C (coloração predominante da colônia: branco, cinza claro, cinza escuro, negro); ME (presença de massa de esporos); TC (textura da colônia: cotonosa, felpuda, farináceo, lacunosa; TOP (topografia da colônia: sem micélio aéreo, pouco e muito); SC (nº de setores da colônia).

Caracterização morfológica de conídios e apressórios

Conídios e apressórios foram caracterizados em relação ao tamanho e forma, determinados para 50 conídios/apressórios de cada isolado. Quanto ao formato, os conídios foram classificados em quatro grupos: 1) cilíndrico: com ambas as extremidades arredondadas; 2) elipsóide: com extremidades estreitas; 3) obclavóide: com uma das extremidades arredondadas e a outra estreita (forma de clava); 4) fusiforme: com ambas as extremidades agudas (SUTTON, 1992). Para a caracterização dos conídios e apressórios, preparou-se suspensões a partir de culturas com 10 dias em meio BDA. As suspensões foram transferidas em gotas de 10 μl para lâminas e observadas em microscópio de luz para medição dos conídios e 24

h depois os apressórios. Quanto à morfologia, os apressórios foram classificados em: 1) irregular e lobado: com as margens onduladas; 2) irregular e fracamente lobado: com as margens pouco onduladas; 3) circular e liso: com as margens sem ondulação (SUTTON, 1992). As dimensões dos conídios de largura e comprimento foram avaliadas usando o programa computador para análise de imagens (Motic Image Plus 2.0).

Caracterização do efeito da temperatura

Avaliou-se o efeito das temperaturas de 18, 22, 26 e 30 °C no crescimento de isolados provenientes dos municípios de Pio IX - PI (CCJ17), Viçosa do Ceará - CE (CCJ18), Taquaritinga - SP (CCJ20), Rio Preto da Eva - AM (CCJ19), Ipu - CE (CCJ16) e Mossoró - RN (CCJ09). Foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente ao acaso (DIC) com 6 repetições, constituindo cada placa de Petri uma parcela. Discos de BDA com seis mm diâmetro contendo estruturas do fungo, provenientes de colônias com sete dias de crescimento, foram depositados no centro de placas de 90 mm diâmetro e mantidas sob fotoperíodo de 12 hs. O crescimento micelial diário foi obtido da média da medição da colônia em duas posições perpendiculares, iniciada 48 h após a deposição dos discos, a cada 24h, por um período de cinco dias. As variações morfológicas foram avaliadas no sétimo dia de crescimento das colônias. As características estudadas foram C (coloração predominante da colônia: branco, cinza claro, cinza escuro, negro); ME (presença de massa de esporos); TC (textura da colônia: cotonosa, felpuda, farináceo, lacunosa); TOP (topografia da colônia: sem micélio aéreo, pouco e muito); SC (nº de setores da colônia), analisados por teste KRUSKAL-WALLIS ($P=0,05$).

Caracterização do efeito da relação carbono / nitrogênio

Avaliou-se o efeito da relação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no crescimento, e esporulação de isolados provenientes dos municípios de Rio Preto da Eva (CCJ19), Ipu (CCJ16), Viçosa do Ceará (CCJ18), Taquaritinga (CCJ20), e CMM 788. As fontes

utilizadas carbono foram maltose, frutose e xilose e de nitrogênio asparagina, peptona e nitrato de potássio, proporção 10/1. O meio basal utilizado foi 0,5g MgSO₄.7H₂O; 1,0g KH₂PO₄; 20g ágar, q.s.p. 1.000 ml de água destilada, com pH 6 a 5,5 após autoclavagem, distribuído em placas de Petri com 90 mm diâmetro e incubadas a 27 °C, sob fotoperíodo de 12 h. A testemunha foi o meio BDA. Foram utilizados disco de 6mm diâmetro de meio BDA com estruturas do patógeno, provenientes da borda de culturas com nove dias de crescimento. As avaliações foram tomadas diariamente após 48 h, por cinco dias em duas diagonais transversais ao centro da placa.

Resultados e discussão

Aspectos culturais das colônias e crescimento em BDA de *Colletotrichum gloeosporioides*

As colônias apresentaram grande variação com relação à cor e demais aspectos aspecto, de acordo com os diferentes isolados. As cores predominantes foram os tons de cinza, seguido de branco e negro. Com relação à produção de massa de esporos não foi observada em 10 isolados e variou quando a quantidade observada, onde nove isolados apresentaram essa característica com muitas pontuações e sempre com coloração alaranjada. Apenas quatro isolados apresentaram micélio rente ao meio de cultura, bem como os isolados de *C. acutatum*. A textura de colônia mais observada foi a cotonosa com 10 isolados, seguida de feltrosa com sete isolados mais os indivíduos CMM 788 e CMM 789. Apenas os isolados CCJ01 e CCJ05 apresentaram textura farinácea. Já os isolados CCJ10 e CCJ11 foram classificados como os que se mostraram com lacunas na colônia. A maioria dos isolados não apresentou formação de setores nas colônias, bem como os isolados de *C. acutatum*, porém os isolados CCJ19 e CCJ20 foram os mais setorizados, com mais de cinco setores, sendo interessante salientar que estes são os isolados mais extremos das áreas de coletas. Os resultados obtidos mostram correlação com aqueles apresentados por alguns pesquisadores que avaliaram o comportamento de *Colletotrichum* spp. com base nas características culturais, como aspectos de colônias (AFANADO-KAFURI, 2003,

DENOYES, 1995, JHONSTON, 1997; LATINOVIÉ, 2002). Ferraz (1977) classificou isolados de espécies de *Colletotrichum* em grupos e subgrupos, em função da variação observada em cultura. O padrão observado para os isolados de *C. acutatum* utilizados no experimento não foi repetido por nem um isolado de *C. gloeosporioides* reforçando a idéia de possível utilização de caracteres culturais na separação de espécies.

As colônias variaram quanto à formação de micélio aéreo flocoso sem conídios aparentes, a micélio escasso e submerso, porém bem esporulado. Segundo Menezes (2002), isolados pertencentes à mesma espécie de *C. gloeosporioides* apresentaram entre si grande variabilidade no mesmo substrato, admitindo estar este fato relacionado com a presença de raças fisiológicas.

Quanto ao crescimento total e médio das colônias, houve significância estatística ($P=0,05$), onde os maiores valores de crescimento total médio foram obtido para o isolado CCJ19 proveniente da região amazônica e CCJ16 (Ipú – CE) com 9 cm diâmetro de colônia para ambos, seguidos do isolado CCJ21 oriundo do Maranhão e CCJ08 (Campina Grande – PB) com 8,8 e 8,6 cm diâmetro de colônia, respectivamente (Tabela 2). A menor média total de crescimento foi obtida para o isolado CCJ13 junto com outro isolado bem como CMM788. Já para o crescimento médio, os isolados CCJ16, CCJ19, CCJ21, CCJ08 obtiveram as maiores médias não diferindo estatisticamente ($P=0,05$), porém dos demais isolados, com os valores de 6,85, 6,82, 6,66 e 6,37 cm diâmetro de colônia respectivamente (Tabela 3). Pode-se observar dois grupos para ambas as medias estudadas.

Para *C. graminicola* (Ces.) G.W., Wilson, Lima (2000) relatam que variações em crescimento entre 66,1 e 77,8 mm foram significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, mas não foi possível no presente trabalho obter valores que diferencie o isolado CMM 788 da maioria dos isolados de *C. gloeosporioides*, impossibilitando a distinção entre espécies por esse caráter. Adaskaveg & Foster (2000), sugerem o enquadramento de isolados na espécie *C. acutatum* em função de crescimento reduzido. Entretanto, Freeman et al. (1998) relatam que isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de amendoeira, não apresentaram

crescimento diferenciado de *C. acutatum*, proveniente de morangueiro. Serra (2006), também não recomenda a utilização do crescimento micelial como uma característica segura para diferenciação de espécies de *Colletotrichum*, mas pode revelar a ocorrência de variabilidade intraespecífica, pois a condição heterozigótica ou reprodução sexuada tem possibilidade de gerar novos biótipos na população com comportamento variável.

Caracterização morfológica de conídios e apressórios

Houve diferença estatística tanto para largura como para comprimento dos conídios, com formação de oito grupos para comprimento de e seis para largura (Tabelas 4 e 5). O isolado CCJ05 se destacou como o mais comprido enquanto que o isolado CCJ18 foi o mais largo. Em ambas dimensões o isolado CMM 788, de *C. acutatum*, foi o menor e diferente estatisticamente pelo teste de separação de médias Scott-Knott ($P=0,05$). Não houve diferenças visíveis de formato dos conídios dos isolados testados, sempre em formato de bastonetes e extremidades arredondadas, exceto para CMM 788, que apresentou leve afilamento em ambas extremidades (Figura 2). Couto (2004) obteve resultados semelhantes, com amplitudes variando de 10,6-18,2 μm para comprimento e 3,8-6,8 μm para largura. Lopez (2010) encontrou valores de 12,42-17,67 e 7,79-5,99 μm para comprimento e largura, respectivamente. Apenas com estes dois caracteres foi possível diferenciar os isolados de *C. gloeosporioides* de *C. acutatum* com certa facilidade, o que não foi possível utilizando-se valores de crescimento micelial.

O formato de apressórios foi avaliado apenas para os isolados de *C. gloeosporioides*, que apresentaram formatos semelhantes (lobado) e portanto não permitiram a separação de grupos distintos. Couto (2004) também não conseguiu separar isolados de *C. musae* por formato de apressório, pois foi muito variável. Lopez (2010) conseguiu verificar diferenças nos formatos de apressórios, porém as maiores diferenças estavam relacionadas com hospedeiros que não o cajueiro ou proveniente de pseudo-fruto. Em um único caso foi possível observar diferenciação

de um isolado de folhas de cajueiro. Os apressórios formados sempre apresentaram coloração castanho escura à preta, indicando forte melanização.

Tozze (2006) conseguiu separar isolados de *C.gloeosporioides* de *C. acutatum* utilizando formato e tamanho de conídio, bem como formato de apressórios, sendo mais um trabalho a reforçar as informações obtidas.

Efeito da Temperatura

O isolado CCJ17 apresentou diferença estatística ($P=0,05$) para C e AC, com aumento da temperatura houve escurecendo das hifas e maior AC em 30 °C. CCJ18 apresentou diferenças apenas para ME ($P=0,10$), com menor frequência para 22 ° e 30 °C. Houve diferenças em TC e TOP ($P=0,10$) CCJ20 e com aumento da temperatura a textura feltrosa alterou para farinácea, bem como redução de micélio aéreo. O CCJ19 não apresentou diferenças. Houve significância ($P=0,05$) para ME, TC e AC no isolado CCJ09, com menor frequência observada de ME a 22°C, mudança de textura aveludada para feltrosa com a elevação da temperatura e aumento do número de AC em temperaturas mais altas.

Para todos os isolados houve correlação positiva, acima de 90%, entre temperatura e crescimento. A análise de regressão foi significativa a 5 % de probabilidade, com R^2 variando de 72 a 99%. Com relação ao crescimento total, houve diferença significativa entre as médias de crescimento sob todas as temperaturas testadas, segundo Tukey a 5 % de probabilidade, com amplitude de 50,01 a 90,0 mm diâmetro, respectivamente para o isolado de Mossoró a 18 °C e Taquaritinga a 30 °C. O isolado proveniente de Taquaritinga apresentou a maior taxa de crescimento em todas as temperaturas testadas, demonstrado ser um representante com plasticidade adaptativa a variações de temperaturas. Já o isolado proveniente de Viçosa do Ceará apresentou taxa maior de crescimento à temperaturas mais baixas, refletindo, possivelmente, sua adaptação a condições frias de regiões de elevadas altitudes.

Efeito da relação carbono / nitrogênio

Houve variação significativa analisando, o crescimento médio e final usando ANOVA em arranjo fatorial, em todos os desdobramentos. Demonstrou-se que há variação na capacidade de assimilação de fontes de carbono e que o maior crescimento médio foi atingido com maltose/peptona. Em um trabalho envolvendo fontes de carbono Tozze (2006) conseguiu medir bons crescimentos com a fonte de C sendo maltose.

Conclusões

1 – Foi possível diferenciar grupos pelas características culturais em meio de cultura BDA. 2 - Formato e tamanho de conídios podem separar espécies de *C. gloeosporioides* de *C. acutatum* 3 - A temperatura tem efeito heterogêneo nos isolados de acordo com a origem geográfica, podendo denotar a adaptabilidade dos isolados às condições climáticas. 4 – O uso de diferentes fontes de carbono podem ser usadas para diferenciar espécies de *Colletotrichum*.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

A Embrapa Agroindústria Tropical, por fornecer as instalações de pesquisa.

Referências

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**, v.93, p.579-587, 2003.

DENOYES, B.; BAUDRY, A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics.

Phytopathology, v.85, p.53-157, 1995.

DENOYES, B.; GUERIN, G.; DELYE, C.; SMITH, B.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* from strawberry. **Phytopathology**, v.93, p.219-228, 2003

FERRAZ, J.F.P. Morfologia, comportamento cultural e patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. **Agronomia Lusitana**, v.38, p.163-179, 1977.

FRANCISCO NETO, E.; NAKAMURA, K.; OLIVEIRA, J. C. Influência de alguns fatores na germinação de conídios, no crescimento micelial e na esporulação de alguns isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de Passiflora. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.96-100, 1994.

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

FREEMAN, S. **Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits**. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds.) *Colletotrichum: Host specificity, Pathology and Host-pathogen interaction*. APS Press, St. Paul, p.131-143, 2000.

FREEMAN, S.; SHALEV, Z.; KATAN, T. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease**, v.66, p.965-970, 2002.

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

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.

Manual De Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas, 4ª Ed. São Paulo, Editora Ceres, v.2, p.607-626, 2005.

KATAN, T. **Vegetative compatibility in *Colletotrichum***. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*, APS Press, St. Paul, p.145-179, 2000.

LATINOVIĆ, J.; VUEINIĆ, Z. Cultural characteristics, pathogenicity, and host range de *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from olive plants in Montenegro. **Acta Hortciense**, v.586, p.753-755, 2002.

LIMA, M. L. F. **Caracterização patogênica, fisiológica e enzimática de isolados de *Colletotrichum graminicola*, (Ces.) G.W. Wilson agente causal da antracnose em milho**, Zea mays L 2000. 70f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

LOPEZ, A.M.Q.; LUCAS, J.A. *Colletotrichum* isolates related to Anthracnose of cashew trees in Brazil: morphological and molecular description using LSU rDNA sequences. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.4, p. 741-752, 2010.

Formatado: Inglês (EUA)

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

Formatado: Inglês (EUA)

MENEZES, M. **Doenças do cajueiro**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas, 4ª ed. São Paulo, Editora Ceres, v.2, p.181-184, 2005.

OLIVEIRA, E.A.; ANTUNES, I.F.; COSTA, J.G. C. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* identificadas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina de 1968 a 1972. **IPEAS**, 1973. 5 p. (Comunicado Técnico).

RIBEIRO, I.J.A. **Doenças da mangueira**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas, 4ª ed. São Paulo, Editora Ceres, v.2, p.457-465, 2005.

SCREENNIVASAPRASAD, S.; TALHINHAS, P. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. **Molecular Plant Pathology**, v.6, p.361-378, 2005.

SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S. Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agentes de antracnose em frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, v.30, p. 475-480. 2004.

SOUZA, C. L. C.; SOBRINHO, C. A. Avaliação da variabilidade morfológica e patogênica do agente causal da antracnose na mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, v.33, suplemento, p.426, 2000.

TALHINHAS, P.; SCREENNIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.2987-2998, 2005.

TANDON, R.N.; CHANDRA, S. The nutrition of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v.18, p.213-224, 1962.

Tabela 1. Aspecto das colônias de *Colletotricum* em meio BDA

| Isolado | Coloração predominante das colônias | Formação de massa de esporos | Top. da colônia (micélio aéreo) | Textura da colônia | Nº de setores |
|---------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------|
| CCJ01 | Cinza claro | pouco | abundante | farinácea | 0 |
| CCJ02 | Cinza escuro | ausente | abundante | cotonosa | 1 |
| CCJ03 | Cinza claro | pouco | abundante | cotonosa | 0 |
| CCJ04 | Cinza claro | ausente | abundante | cotonosa | 0 |
| CCJ05 | Cinza escuro | muito | abundante | farinácea | 1 |
| CCJ06 | Cinza escuro | muito | abundante | cotonosa | 0 |
| CCJ07 | Cinza claro | ausente | abundante | cotonosa | 0 |
| CCJ08 | Branco | ausente | abundante | feltrosa | 0 |
| CCJ09 | Branco | ausente | abundante | cotonosa | 0 |
| CCJ10 | Branco | muito | escasso | lacunosa | 0 |
| CCJ11 | Cinza escuro | pouco | abundante | lacunosa | 0 |
| CCJ12 | Cinza claro | ausente | abundante | cotonosa | 0 |
| CCJ13 | Cinza escuro | ausente | abundante | cotonosa | 0 |
| CCJ14 | Cinza escuro | ausente | abundante | feltrosa | 0 |
| CCJ15 | Negro | ausente | escasso | feltrosa | 0 |
| CCJ16 | Cinza escuro | muito | presente | cotonosa | 1 |
| CCJ17 | Cinza escuro | ausente | escasso | feltrosa | 0 |
| CCJ18 | Cinza escuro | pouco | presente | cotonosa | 0 |
| CCJ19 | Negro | muito | presente | feltrosa | 5 |
| CCJ20 | Cinza escuro | muito | presente | feltrosa | 5 |
| CCJ21 | Cinza escuro | muito | presente | feltrosa | 1 |
| CCJ22 | Cinza claro | pouco | escasso | cotonosa | 0 |
| CMM788 | Branco | muito | escasso | feltrosa | 0 |
| CMM798 | Branco | muito | escasso | feltrosa | 0 |

Tabela 2. Média total do crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* analisados pelo teste de Tukey ($P=0,05$), por área de coleta.

| Tratamento | Médias |
|-------------|----------|
| CCJ 13 | 6,22 a |
| CCJ 11 | 6,37 a |
| CCJ 17 | 6,40 a |
| CCJ 9 | 6,45 a |
| CCJ 3 | 6,45 a |
| CCJ 10 | 6,50 a |
| CCJ 22 | 6,50 a |
| CCJ 2 | 6,50 a |
| CMM 788 | 6,50 a |
| CCJ 14 | 6,50 a |
| CCJ 1 | 6,52 a |
| CCJ 20 | 6,90 ab |
| CCJ 18 | 7,12 abc |
| CCJ 6 | 7,15 abc |
| CMM 2013 | 7,16 abc |
| CCJ 12 | 7,22 abc |
| CCJ 4 | 7,70 abc |
| CCJ 7 | 7,77 abc |
| CCJ 5 | 7,77 abc |
| CCJ 15 | 7,82 abc |
| CCJ 8 | 8,62 c |
| CCJ 21 | 8,86c |
| CCJ 16 | 9,00c |
| CCJ 19 | 9,00c |
| CV = 21,92% | |

Tabela 3. Média de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* analisados pelo teste de Tukey ($P=0,05$), por área de coleta.

| Tratamento | Médias |
|--------------|-------------|
| CMM 2012 | 4,03 ab |
| CCJ 11 | 4,12 ab |
| CCJ 2 | 4,17 ab |
| CCJ 13 | 4,20 ab |
| CCJ 22 | 4,35 abc |
| CCJ 14 | 4,40 abc |
| CCJ 10 | 4,45 abc |
| CCJ 1 | 4,47 abc |
| CCJ 17 | 4,50 abc |
| CCJ 20 | 4,72 abcd |
| CCJ 18 | 4,78 abcd |
| CCJ 3 | 4,80 abcd |
| CCJ 9 | 4,92 abcd |
| CCJ 12 | 4,78 abcde |
| CMM 788 | 5,20 abcde |
| CCJ 7 | 5,25 abcde |
| CCJ 6 | 5,40 abcdef |
| CCJ 5 | 5,47 bcdefg |
| CCJ 15 | 5,70 cdefg |
| CCJ 4 | 6,10 defg |
| CCJ 8 | 6,37 efg |
| CCJ 21 | 6,66 fg |
| CCJ 19 | 6,82 g |
| CCJ 16 | 6,85 g |
| CV = 10,34 % | |

Tabela 4. Média de comprimento dos conídios de isolados de *Colletotrichum* analisados pelo teste de Scott-Knott (P=0,05), por área de coleta

| Tratamento | Médias |
|-------------|---------|
| CMM 788 | 11,14 a |
| CMM 2012 | 11,88 b |
| CCJ 6 | 12,58 c |
| CCJ 13 | 12,62 c |
| CCJ 11 | 12,62 c |
| CCJ 2 | 12,82 c |
| CCJ 22 | 12,84 c |
| CCJ 21 | 13,18 d |
| CCJ 20 | 13,18 d |
| CCJ 17 | 13,22 d |
| CCJ 7 | 13,44 d |
| CCJ 16 | 13,64 e |
| CCJ 3 | 13,74 e |
| CCJ 9 | 13,76 e |
| CCJ 8 | 14,04 f |
| CCJ 10 | 14,06 f |
| CCJ 14 | 14,10 f |
| CCJ 4 | 14,14 f |
| CCJ 1 | 14,26 f |
| CCJ 12 | 14,60 g |
| CCJ 15 | 14,90 g |
| CCJ 19 | 14,96 g |
| CCJ 18 | 14,98 g |
| CCJ 5 | 16,02 h |
| CV = 7,82 % | |

Tabela 5. Média da largura dos conídios de isolados de *Colletotrichum* analisados pelo teste de Scott-Knott (P=0,05), por área de coleta

| Tratamento | Médias |
|--------------|--------|
| CMM 788 | 3,00 a |
| CCJ 10 | 3,60 b |
| CCJ 21 | 3,70 b |
| CMM 2012 | 3,76 b |
| CCJ 22 | 3,84 c |
| CCJ 4 | 3,84 c |
| CCJ 16 | 3,86c |
| CCJ 7 | 3,88 c |
| CCJ 5 | 3,90 c |
| CCJ 15 | 3,92 c |
| CCJ 13 | 3,96 d |
| CCJ 14 | 3,96 d |
| CCJ 20 | 3,98 d |
| CCJ 1 | 4,00 d |
| CCJ 12 | 4,00 d |
| CCJ 11 | 4,02 d |
| CCJ 2 | 4,04 d |
| CCJ 3 | 4,06 d |
| CCJ 19 | 4,10 d |
| CCJ 9 | 4,14 d |
| CCJ 6 | 4,28 e |
| CCJ 8 | 4,32 e |
| CCJ 17 | 4,48 f |
| CCJ 18 | 4,58 f |
| CV = 10,27 % | |

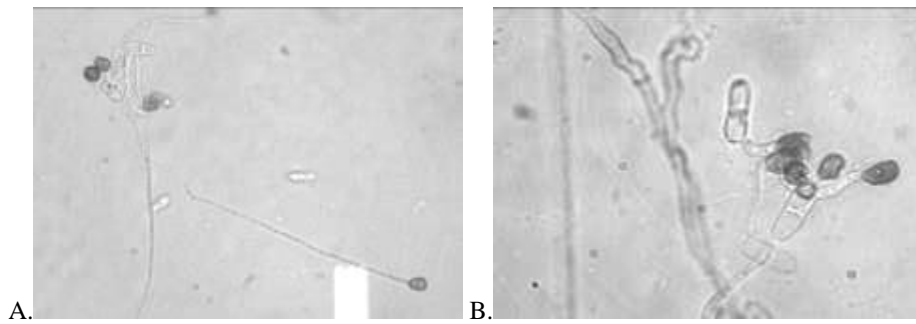


Figura 1. Formato dos apressórios levemente lobulado, encontrados nos experimentosm (A) *C. acutatum*; (B) *C. gloeosporioides*.

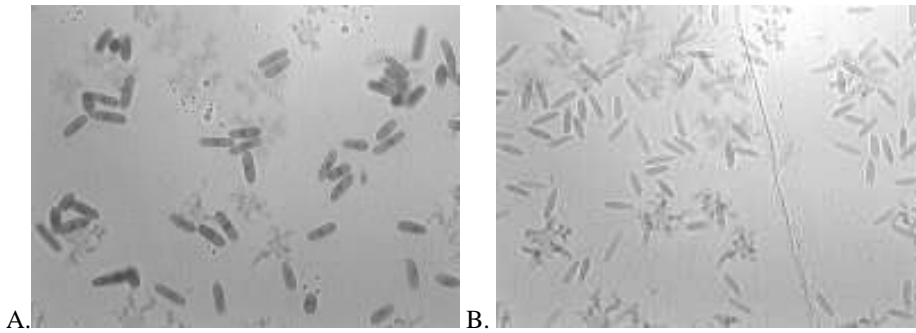


Figura 2. Formato dos conídios de CCJ01 (A) e CMM788 (B), representando as diferenças encontradas no formato e dimensão de conídios.

CAPÍTULO V

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*
gloeosporioides ASSOCIADOS A ANTRACNOSE DO CAJUEIRO**

**Caracterização molecular de isolados de *colletotrichum gloeosporioides* associados
antracnose do cajueiro**

Luís Gustavo Chaves da Silva¹, Francisco Marto P. Viana², Marcos P. S. Câmara¹, José E. Cardoso², José G. M. Melo³, Frederico Inácio Costa Oliveira³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos - CEP 52171-900, Recife/PE, chaveslg@gmail.com, mcamara@depa.ufrpe.br

²Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra Sara Mesquita, 2270 - Planalto do Pici, CEP 60511-110 - Fortaleza – CE, fmpviana@cpat.embrapa.br, emilson@cpat.embrapa.br

³Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, 2977 - CEP 60021-970 - Fortaleza – CE, Caixa Postal: 12.168, joseglauber@yahoo.com.br; fred.inacio@hotmail.com

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, Bolsista do CNPq - Brasil.

Introdução

Originário da América Tropical, o cajueiro, *Anacardium occidentale* L. pertence à família Anacardiaceae e encontra-se disperso numa extensa faixa compreendida entre os paralelos 27 °N, no Sudeste da Flórida, e 28 °S, na África do Sul (FROTA; PARENTE, 1995). A maior diversidade de cajueiro encontra-se no Nordeste brasileiro, sendo essa a única espécie cultivada e a de maior dispersão do gênero *Anacardium* em diversos ecossistemas, especialmente nas zonas costeiras, compondo a vegetação de praias, dunas e restingas. Estas razões indicam que o seu cultivo tenha origem no Nordeste, onde toda uma tradição de exploração pelas tribos indígenas da região é descrita pelos primeiros colonizadores (LIMA, 1988; BARROS; CRISÓSTOMO 1995). Ao longo das últimas décadas, a agroindústria do caju vivenciou um rápido crescimento nos seus indicadores quantitativos: a área ocupada com a cultura no país alcançou os 650 mil hectares e a capacidade instalada da indústria processadora de castanha atingiu cerca de 280 mil toneladas/ano (OLIVEIRA, 2002). Ainda segundo o mesmo autor, a

importância dessa agroindústria para os Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, onde são colhidos cerca de 95% da produção e onde é feito todo o processamento da castanha, é representada pela movimentação de 157 milhões de dólares em exportações de amêndoas, como também, aproximadamente 100 mil empregos diretos e indiretos são gerados.

No entanto, a cajucultura convive com vários problemas fitossanitários, onde se destaca a antracnose, causada por *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrenk (anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc). A antracnose é considerada uma doença economicamente importante no Nordeste do Brasil, incidindo sobre ramos novos, folhas, inflorescências e frutos, ocasionando lesões necróticas e de tamanho variado (SERRA, 2004).

Espécies de fungos são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais, porém, no caso do *Colletotrichum* esta identificação encontra dificuldades em função da grande diversidade fenotípica e instabilidade destes caracteres em função do ambiente (ANDRADE et al., 2007). Desta forma o uso de marcadores moleculares em estudos relacionados à identificação de espécies de isolados de *Colletotrichum* associados aos sintomas de antracnose em cajueiro torna-se uma ferramenta poderosa, por não ser sujeita a essas variações ambientais (LOPEZ & LUCAS, 2010).

No Brasil, estudos envolvendo caracterização morfológica e patogênica sugerem o *C. gloeosporioides* como o único agente causal responsável pela antracnose do cajueiro (FREIRE et al., 2003). No entanto, em outros patossistemas que envolvem o gênero *Colletotrichum* análises mais apuradas demonstram a existência de um complexo de espécies ao invés de apenas uma (LOPEZ & LUCAS, 2010; NASCIMENTO, 2010; TOZZE JUNIOR, 2006; TALINHA, 2002, MILLS, 1992).

Este trabalho teve como objetivo, caracterizar espécies do gênero *Colletotrichum* associadas às lesões de antracnose em cajueiros provenientes de várias regiões do Brasil utilizando-se marcadores moleculares táxon específico, ITS e ISSR.

Material e métodos

A partir de 22 áreas de coletas, com 10 isolados por área perfazendo um total de 220 isolados monospóricos de *Colletotrichum* oriundos de folhas de cajueiro foram utilizados neste estudo. Para fins comparativos, foram incluídos dois isolados de *C. acutatum* provenientes de pimentão (Anexo. Tabela. 1). Em todos os ensaios, os isolados foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. As culturas foram mantidas por repicagens periódicas em meio BDA e em água estéril.

Para extração do DNA genômico dos isolados, a massa micelial foi produzida em erlenmeyers contendo 200 mL de meio líquido de batata dextrose (BD). Repicaram-se cinco discos de micélio de cada isolado do fungo crescido em BDA e incubados por 15 dias, a 26 °C, com fotoperíodo de 12 h. A biomassa micelial do fungo foi seca em papel de filtro dentro da câmara de fluxo laminar por 24 h, tendo o cuidado de deixar o fluxo de ar ligado, evitando assim a contaminação da manta, e em seguida, procedeu-se a extração de DNA. Seguiu-se o método descrito por Cavalcanti (2004), com modificações. O DNA dos isolados foi extraído a partir de 220 mg de micélio. O micélio, previamente seco, foi triturado em almofariz em nitrogênio líquido. Posteriormente, adicionaram-se 700 µL de tampão CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) + PVP (polyvinylpyrrolidone) a 2 % cada, previamente aquecido a 65°C, em cada microtubo, os quais foram homogeneizados no vortex. Os microtubos foram levados ao banho-maria a 65 °C por 5 min seguindo-se a homogeneização manual e adição de 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sob capela de exaustão. Procedeu-se a agitação dos tubos, de forma cuidadosa para não quebrar o DNA, e centrifugação das amostras a 13.000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, adicionando 450 µL de isopropanol a -20 °C para precipitar o DNA. As amostras foram agitadas por suaves inversões e novamente centrifugadas na mesma condição anteriormente descrita. Os sobrenadantes foram descartados, e o precipitado, lavado com etanol 70 %, a -20 °C, invertendo os tubos cuidadosamente, e sendo

mais uma vez levados para a centrífuga. Terminada esta fase, o etanol foi descartado, e o precipitado de DNA foi deixado para secar à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso com 5 µL de tampão de extração (10 mL de Tris- HCl 1 M pH 8,0, 0,2 g de EDTA 0,5 M, pH 8,0, completando o volume para 1000 mL com água deionizada), e em cada microtubo adicionou-se 1 µL de RNase (1 µg/1 µL). Os microtubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 1 hora para digestão dos ácidos ribonucleicos (RNA). A quantificação do DNA foi feita com uso do aparelho NANODROP 2000. Todas as amostras foram diluídas em água ultrapura para 10-20 ng/µL e armazenadas a -20° C.

Para a amplificação por PCR da região ITS (espaçador transcrito interno) do DNA ribossômico (rDNA), utilizou-se os *primers* taxons específicos CgInt e CaInt com ITS 4, bem como os para expressão da β-tubulina TBCa e TBCg mais TUB (TALINHAS, 2005), sintetizados pela Invitrogen, Inc. (EUA). A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 µL, contendo 2 µL de DNA genômico, 1,0 µL de cada primer, 0,4 µL de dNTPs, 0,6 µL MgCl₂, 2,0 µL de Tampão 10x “buffer”, 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase e 12,8 µL de água ultra pura para completar o volume final. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo a 94 °C por 1 min., 35 ciclos, sendo cada um a 94 °C por 30 seg., 52 °C por 30 seg. e 72 °C por 2 min., e um ciclo final de extensão de 72 °C por 7 min. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose a 2,0 %, onde alíquotas de 5 µL de cada amostra era adicionada a 1 µL da solução de carregamento, homogeneizadas e distribuídas no gel de agarose, sendo submetidas a eletroforese em cuba de acrílico, a 90 volts durante 40 min, TBE (1X) e 3 µL de brometo de etídio e visualizado sob luz UV e fotodocumentados. PCR com *primers* taxon-específicos foi realizada de acordo com Freeman et al. (2001) e Talinhas et al. (2006).

Um isolado proveniente de cada área de coleta mais um isolado de *C. acutatum* foram utilizados para caracterização da diversidade genética usando marcadores ISSR. Os 13 *primers* utilizados foram 1- CAC ACA CAC ACA CAC, 2- CAC ACA CAC ACA CAC, 3- ACA CAC

ACA CAC ACA, 4- ACA CAC ACA CAC ACA, 5- AGA GAG AGA GAG AGA, 6- CAC ACA CAC ACA CAC, 7- TGT GTG TGT GTG TGT, 8- AGA GAG AGA GAG AGA, 9- CAC ACA CAC ACA CAC, 10- ACA CAC ACA CAC ACA, 11- TGT GTG TGT GTG TGT, 12 - TGT GTG TGT GTG TGT, 13- GTG TGT GTG TGT GTG, seguindo uma seleção dos melhores marcadores para criação da matriz pela qualidade do gel revelado e taxa de polimorfismo.

Resultados e discussão

Todos os isolados supostamente de *C. gloeosporioides* marcaram positivamente para CgInt, evidenciando a prevalência absoluta da espécie para os diversos locais estudados. A exceção foi para os dez isolados da área de coleta nº 13, provenientes de Paraipaba-CE, que não foram marcados com nem um dos dois conjuntos de *primers* táxon-específico (Figuras 1 e 2). Para o marcador β -tubulina nem todos os isolados marcaram para TBCg, sendo o mesmo resultado negativo pra TBCg para todos os isolados das áreas de coleta 6, 7, 8, 9, 10, 13 e 14 (Figura 3). Porém não houve conflito de informações com TBCa dos resultados obtidos com os *primers* da região ITS que pode ser observado na Figura 4. As demais bandas são decorrentes de reação inespecífica por baixa temperatura de anelamento, devendo ser corrigida com otimização do protocolo. Com os marcadores específicos foi possível confirmar que todos os isolados testados, exceto os provenientes da área de coleta 13, são *C. gloeosporioides*. Os isolados da área 13 não puderam ser confirmados como *C. acutatum* e merecem uma investigação mais apurada com outros conjuntos de *primers* para outras espécies.

Com os testes para ISSR foi possível detectar a variabilidade genética por área de coleta, onde dos 13 *primers* testados, foram selecionados sete mais eficientes para detectar polimorfismo nas amostras, gerando 88 marcadores (Figura 6). O *primers* que apresentaram maior número de bandas polimórficas foram o 14 e 5 com 22 e 20 respectivamente, onde a

média de marcadores para os sete *primers* foi 17. Os resultados das bandas polimórficas foram analisado por UPGMA, sendo obtidos 7 agrupamentos pelo corte a 60% de similaridade pelo coeficiente de Nei& Li. Os isolados CCJ13 e CCJ14 não agruparam, bem como o isolado CMM 788. O que já se esperava para o CCJ13 e CMM788, pois o primeiro não dá indícios genéticos de pertencer a espécie *C. gloeosporioides* ou *C. acutatum*, pois não foi positivo para nem um dos marcadores táxon específicos testados. Já o CMM788 é um padrão *C. acutatum* e se já tinha sido confirmado geneticamente como tal, não era esperado agrupar com nem um dos isolados testados. O agrupamentos G1 foi formado por isolados de regiões litorâneas, porém, CCJ21 proveniente do Maranhão, é muito distante geograficamente dos isolados CCJ01 e CCJ7 ambos do estado de Pernambuco. G2 foi o maior grupo formado com isolados predominantemente de regiões quentes. G3 Apresentou uma formação muito heterogênea, pois reuniu isolados do litoral, semi-árido e de clima de altitude. G4 contemplou o isolado de região mais alta de coleta (Viçosa- CE) e junto isolado da região amazônica. Pode se observar que não houve qualquer correspondência climática ou geográfica detectável com os marcadores ISSR utilizados. Ficou clara também a diversidade elevada de *C. gloeosporioides* associado ao cajueiro no Nordeste do Brasil, demonstrando que há um risco grande de grandes epidemias de antracnose caso haja uniformidade genética nos pomares de caju, por quebra de resistência genética de alguns clones, que se embasam em poucos genes de resistência. Por não haver relação entre as distâncias genéticas e geográficas há um indicativo de haver fluxo gênico entre as populações estudadas principalmente pelo fato da cultura ser perene e estar se difundindo por todo país, onde as mudas para implantação de novas áreas normalmente são produzidas em empresas de pesquisa como a Embrapa ou viveiros assistidos por clones desenvolvidos pela mesma.

Pode-se ainda ressaltar que o Nordeste é centro de diversidade do cajueiro onde o patogeno co-evolui ha milhares de anos com o hospedeiro e dessa forma a grande variabilidade sempre vai ser detectada, impedindo ou dificultando encontrar relações de distinção ou agregação de isolados em nível intra-específico. Os *primers* específicos para *C. gloeosporioides*

e *C. acutatum* têm sido bastante usados em vários estudos para identificação de populações de *Colletotrichum* que causam antracnose em vários hospedeiros. Por exemplo, Forster & Adaskaveg (1999) usando os mesmos *primers*, confirmaram que *C. acutatum* é a espécie causal de antracnose em amendoeira na Califórnia. Brown et al. (1996) relataram que *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* são responsáveis por antracnose em citros na Florida. Estudos realizados por Afanador-Kafuri et al. (2003) demonstraram que os *primers* CaInt2 e CgInt foram eficientes para diferenciar isolados de *Colletotrichum* obtidos de tamarineira e mangueira em nível de espécie. Baseado na análise da região ITS- rDNA, com os *primers* específicos, os autores identificaram que todos os isolados de tamarineira, como *C. acutatum* e os obtidos de mangueira, como *C. gloeosporioides*. Lopez (2010) em estudos com marcadores moleculares e seqüenciamento de genes, com 35 isolados de *Colletotrichum* obtidos de diversas partes de cajueiro, também se encontrou relacionamento positivo com a espécie *C. gloeosporioides* e um caso para *Glomerella cingulata*, reafirmando os resultados obtidos neste trabalho.

Estudos com antracnose em mangueira demonstraram que o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes e rentáveis tem sido facilitado devido a uma determinação precisa da etiologia de doenças causadas por *Colletotrichum* e um melhor conhecimento da interação patógeno-hospedeiro, que determina o sucesso na patogênese (FITZELL & PEAK, 1984; SWART, 1999; AFANADOR-KAFURI ET AL., 2003). Nesse sentido, os resultados obtidos no presente trabalho forneceram subsídios para o conhecimento da etiologia da antracnose em cajueiro no Brasil.

Conclusões

1- Os marcadores utilizados foram eficientes. 2 - Os isolados obtidos de Paraipaba-CE não são detectados pelos marcados utilizados. 3 – O marcador ITS foi o melhor marcador. 4 – Detectou-se variabilidade genética utilizando os marcadores ISSR.

Referências

- AFANADOR-KAFURI, L. et al. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarilho, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003.
- ARIE, T. et al. Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved MAT HNG box. **Fungal Genetics Biology**, Orlando, v. 21, n. 1, p. 118-130, 1997.
- BARROS, L. M. **Caju produção**. Brasília: Embrapa (Frutas do Brasil), 148p, 2002
- BARRET, J. Molecular variation and evolution. In: RAYNER, C. M. et al. (Eds.). **Evolutionary biology of the fungi**. Cambridge: University Press, 1989. p. 83-95.
- BRIOSO, P. S. T. et al. Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia. Parte I - Aplicações em fitopatologia e vetores. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 9, p. 79-119, 2001.
- BROWN, J. K. M. Surveys of variation in virulence and fungicide resistance and their application to disease control. In: COOKE, B. M.; JONES, D. G; KAYE, B. (Eds.). **The epidemiology of plant diseases**. Dordrecht: Springer, 2006. p.81-115.
- BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 6, p. 665-669, 1977.
- CAIXETA, E.T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Os Editores, 2006. p. 9-78.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.

CANNON, P.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present, future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. *Colletotrichum: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. St. Paul: APS Press, 2000. p.1-20.

CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. Identificação e manejo das principais doenças. In: MELO, Q. M. S. (Org). *Caju fitossanidade*. Brasília: Embrapa, 2002. p. 41-51 (Frutas do Brasil).

CASARRUBIAS-CARRILLO, U. et al. Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. Aislado de fruto de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Sonora, v. 21, n. 3, p. 338-345, 2003.

COLE, G. T.; KENDRICK, B. *Biology of conidial fungi*. New York: Academic Press. 1981. 590 p.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. *Basic plant pathology methods*. 2. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 442 p.

DICKMAN; M. B.; ALVAREZ, A. M. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease*, St. Paul, v. 67, n. 7, p. 748-750, 1983.

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

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

GARDES, M.; BRUNS, D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GONZÁLES, E.; SUTTON, T. B.; CORRELL, J. C. Classification of the ecology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity test. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 9, p. 983-992, 2006.

GUERBER, J. C.; CORRELL, J. C. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. **Mycologia**, New Orleans, v. 93, n. 1, p. 216-229, 2001.

GUTIÉRREZ-ALONSO, O. et al. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. **Revista Mexicana de Fitopatología**. Sonora, v. 21, n. 3, p. 260-266, 2003.

HODSON, A.; MILLS, P. R.; BROWN, A. E. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 3, p. 329-335, 1993.

JAMES, C. M. et al. Modified AFLP analyses method for species with small genomes. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 21, n. 3, p. 302-307, 2003.

JEFFRIES, P. et al. *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v. 30, n. 3, p. 343-366, 1990.

KOSMAN, E.; LEONARD, K. J. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 415-424, 2005.

LOPEZ, A.M.Q, LUCAS, J.A. *Colletotrichum* isolates related to Anthracnose of cashew trees in Brazil: morphological and molecular description using LSU rDNA sequences. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.4, p. 741-752, 2010.

MAYMON, M. et al. Identification and characterization of benomyl-resistant and sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). **Phytopathology**. St. Paul, v. 96, n. 5, p. 542-548, 2006.

MCDONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4. p. 448-453, 1997.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

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

MILGROOM, M. C. The synthesis of genetics and epidemiology contributions of population biology in plant pathology. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 83, Suplemento Especial, p. 57-62, 2001.

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, p. 137-144, 1992.

O'NEILL, N. R. et al. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 7, p. 745-750, 1997.

PRIOR, C. et al. Chemical control of *Colletotrichum* infection in mangoes. BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 326-337.

SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA C. J.; NICKEL, O. Doenças do cajueiro. In: FREIRE, F. C. O. CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Eds.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa, 2003. p. 391-334.

SOWFORD, D. L. 2003. PAUP. Phylogenetic analysis using parsymoni and other methods.V.4. Sunderland: Sinauer Associates, 2003.

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

SUTTON, B. L. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD S.; NEVES-MARTINS J., OLIVEIRA H. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied And Environmental Microbiology**, v.71 n.6 p.2987-2998 ,2005.

TALHINHAS, P., SREENIVASAPRASAD, J.N.M.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, v.92, n.9, 2003.

VINNERE, O. et al. The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in sweden and latvia. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 1, p. 60-69, 2002.

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, 72p., 2004. Disponível em: <http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn_se_uu_diva-3902.pdf>. Acesso em: 21 out. 2004.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. (Eds.). **PCR protocol: a methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

YANG, H. A.; SWEETINGHAM, M. W. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 49, n. 8, p. 1213-1223, 1998.

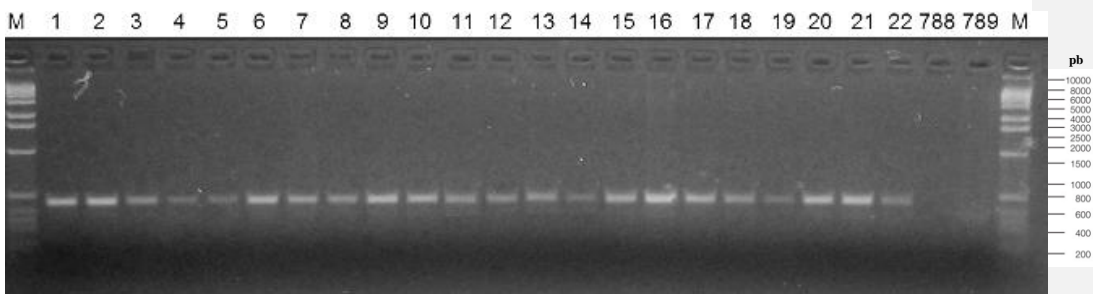


Figura 1. Marcador ITSCg para os isolados representantes de cada área de coleta mais os isolados de *C. acutatum* (CMM 788 e 798).

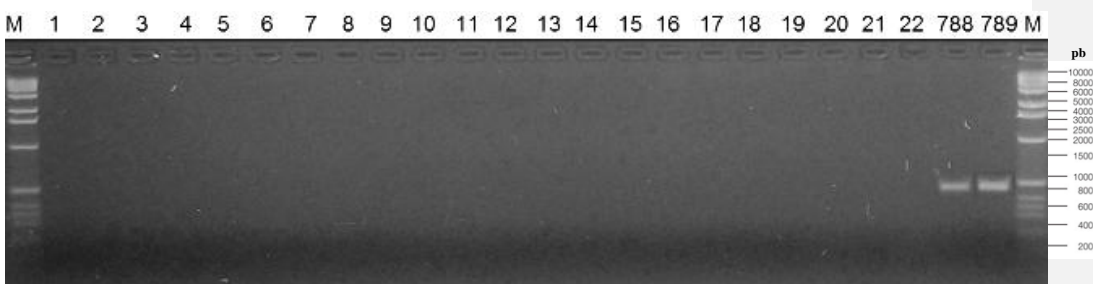


Figura 2. Marcador ITSCa para os isolados representantes de cada área de coleta mais os isolados de *C. acutatum* (CMM 788 e 798).

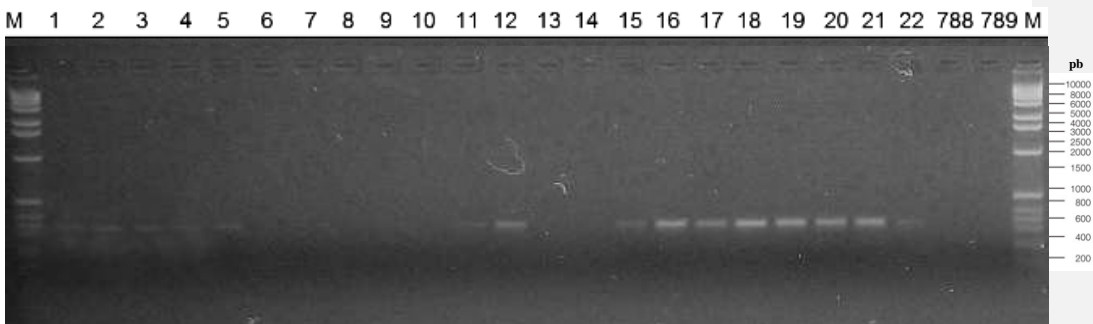


Figura 3. Marcador TUBCg para os isolados representantes de cada área de coleta mais os isolados de *C. acutatum* (CMM 788 e 798).



Figura 4. Marcador TUBCg para os isolados representantes de cada área de coleta mais os isolados de *C. acutatum* (CMM 788 e 798). A seta mostra a banda para o isolado CMM788 (padrão de *C. acutatum*) e a linha horizontal mostra que não houve bandas na mesma altura.

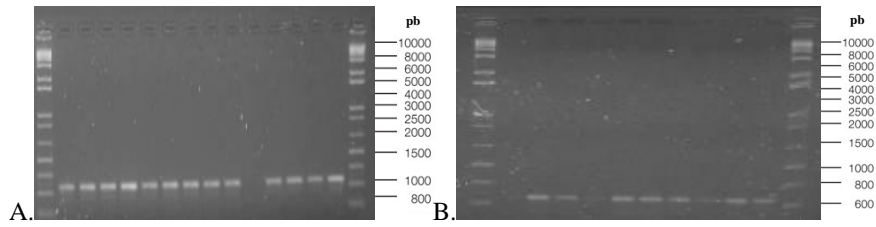


Figura 5. Exemplo de bandas para todos os isolados de uma só área de coleta. (A) CgInt para isolados área 20; (B) TBCg para isolados da área 19.

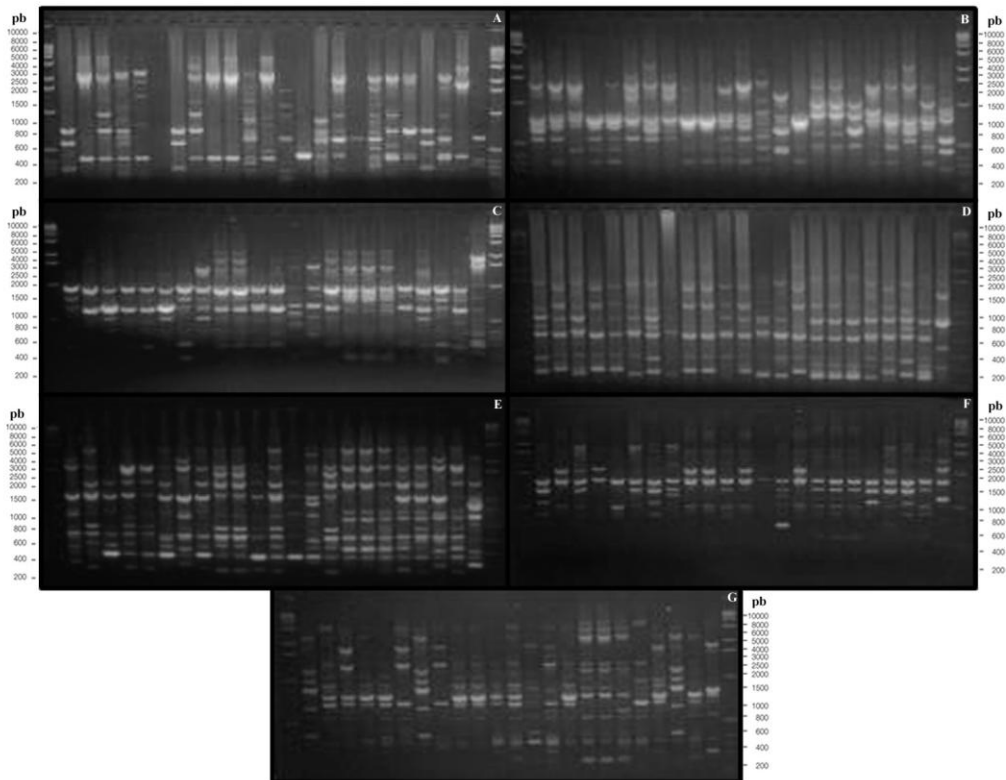


Figura 6. Marcadores ISSR mais eficientes: 1 (A), 5 (B), 6 (C), 7 (D), 8 (E), 13 (F), 14 (G).

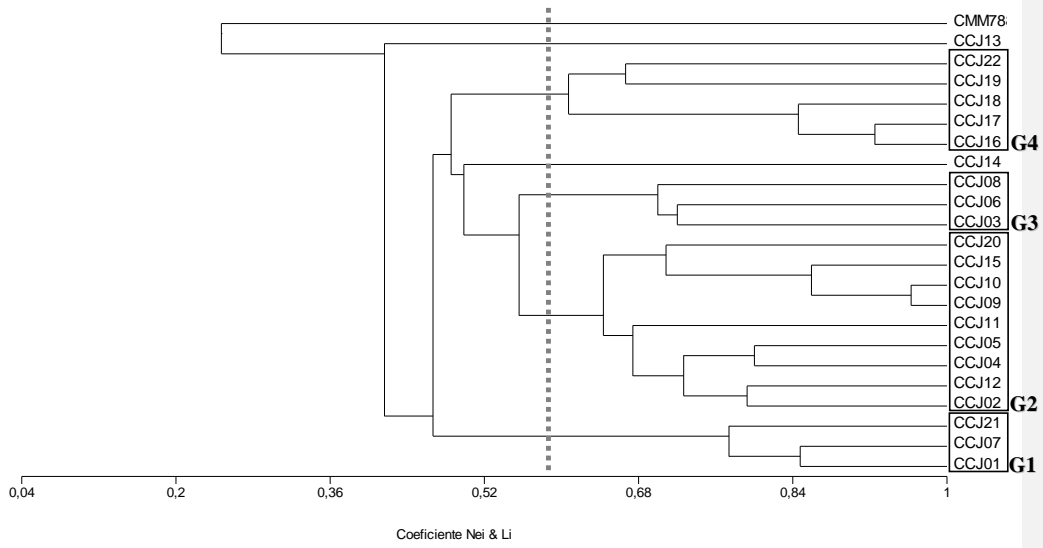
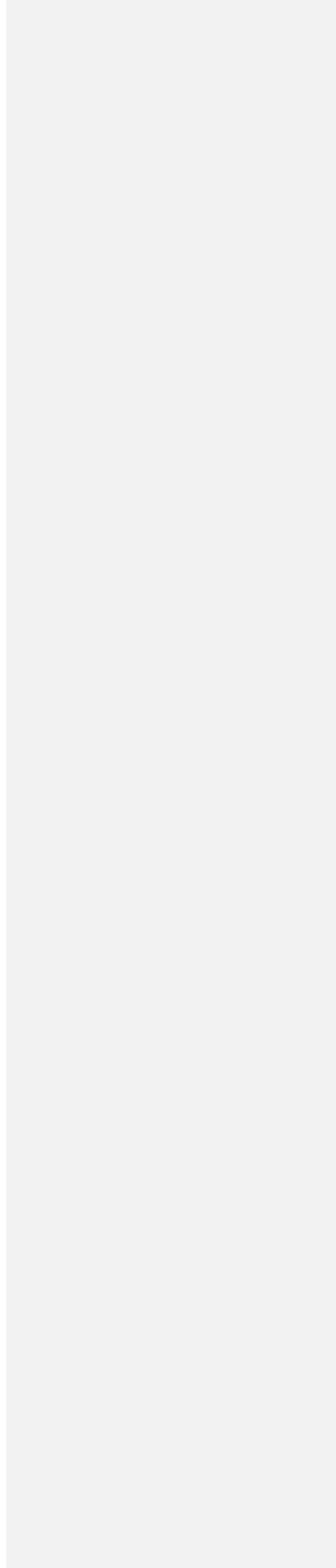


Figura 7. Dendrograma dos isolados de *Colletotrichum* testados por ISSR.

CONCLUSÕES GERAIS



Conclusões Gerais

Há variabilidade, morfológica, patogênica, fisiológica e molecular para os isolados obtidos em pomares de cajueiros provenientes de vários estados brasileiros.

Não foi detectada variabilidade patogênica e molecular em isolados provenientes de mesmos pomares.

Não há dependência espacial da variabilidade patogênica e molecular.

Não há correlação de características climáticas com os resultados de variabilidade patogênica e molecular.

Há especialização fisiologia dos isolados quanto aos clones de cajueiro utilizados.

O clone BRS-226 foi o mais tolerante aos isolados testados.

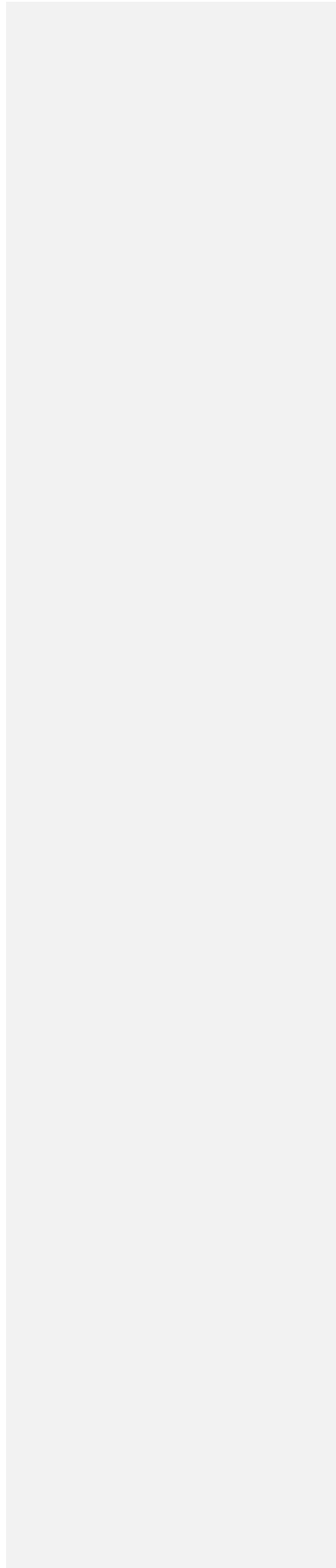
O clone CCP-09 foi o mais susceptível aos isolados testados.

Os marcadores moleculares utilizado não foram eficientes para os isolados provenientes do município de Paraipaba – CE.

É possível diferenciar espécies de *C. gloeosporioides* de *C. acutatum* usando marcadores moleculares ITS e morfologia de conídios.

O meio de cultura farelo de castanha de caju – ágar foi o mais eficiente para multiplicação de inóculo.

74.



75.

NORMAS DAS REVISTAS

Pesquisa Agropecuária Brasileira

Diretrizes para Autores

Escopo e política editorial - A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos - A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos - Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. - Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos - No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho. No passo 2 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar a formação e o grau acadêmico. Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria. Ainda no passo 2, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema. Depois, ir à parte superior da tela, no campo “Idioma do formulário”, e selecionar “English”. Descer a tela (clique na barra de rolagem) e copiar e colar o “title”, “abstract” e os “index terms” nos campos correspondentes. (Para dar continuidade ao processo de submissão, é necessário que tanto o título, o resumo e os termos para indexação quanto o title, o abstract e os index terms do manuscrito tenham sido fornecidos.) No passo 3 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word 1997 a 2003. No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo: “Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “.....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer: Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico - A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma: - Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras. - Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures. - Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras. - O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês. - O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que compoñam o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referência* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
 - Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
 - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
 - Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
 - Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
 - Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
 - Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
 - Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
 - Devem ser trinta, no máximo.
- Exemplos:
- Artigos de Anais de Eventos (aceite apenas trabalhos completos)
AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.
 - Artigos de periódicos
SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.
 - Capítulos de livros
AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.
 - Livros
OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).
 - Teses
HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
 - Fontes eletrônicas
EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades dentro de parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
 - Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
 - O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
 - São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
 - Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.
- Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios:
Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB
Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

Itens de Verificação para Submissão

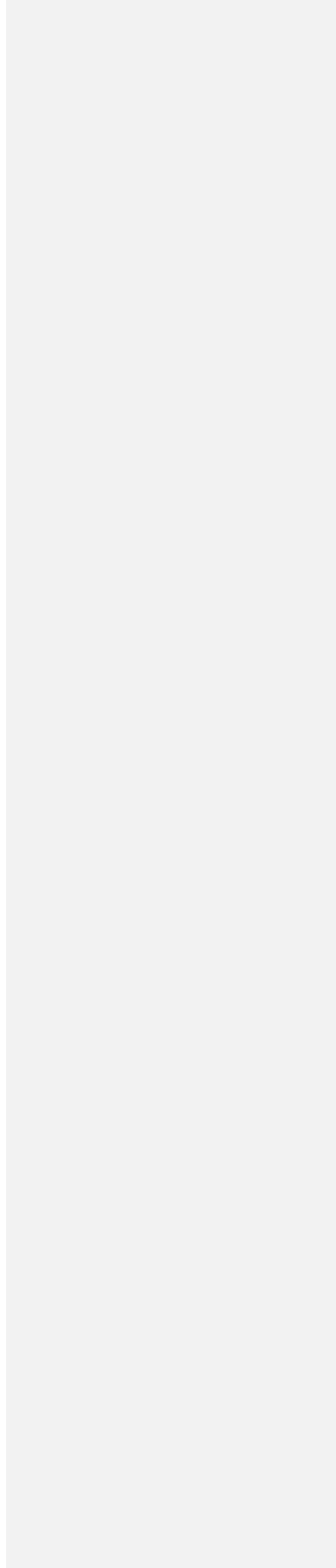
- Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.
- A contribuição é inédita e não está sendo avaliada para publicação por outro periódico científico nem teve seus dados (tabelas ou figuras) publicados integral ou parcialmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc).
- O arquivo de submissão do trabalho está digitado no formato Microsoft Word 1997 a 2003, espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com páginas e linhas numeradas, e não ultrapassa 20MB.
- O trabalho tem no máximo 20 páginas e está apresentado na seguinte seqüência: título, nome completo dos autores, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, Título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, Tabelas e Figuras.
- O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em diretrizes aos autores, na seção Sobre a Revista.
- As mensagens de concordância dos co-autores com o conteúdo do trabalho e com a submissão à revista estão compiladas em um arquivo do Microsoft Word 1997 a 2003 pelo autor-correspondente e serão carregadas no sistema no quarto passo da submissão, como documento suplementar.

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (final) Caixa Postal 040315 - Brasília, DF - Brasil - 70770-901
Fone: +55 (61) 3448-4231 / 3448-4162 - Fax: (61) 3272-4168

79.

ANEXOS



Anexo 1. Lista dos isolados

| Isolad | Região | UF | Coleta | Cajueiro | Região | Elev | Class. Köppen* |
|--------|------------|----|------------|----------|----------------|------|----------------|
| CCJ1 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ2 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ3 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ4 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ5 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ6 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ7 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ8 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ9 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ10 | Goiana | PE | 09/04/2008 | Comum | Litoral | 90 | Am |
| CCJ11 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ12 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ13 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ14 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ15 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ16 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ17 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ18 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ19 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ20 | Camaragibe | PE | 21/04/2008 | Comum | Mata | 122 | Am |
| CCJ21 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ22 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ23 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ24 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ25 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ26 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ27 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ28 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ29 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ30 | Petrolina | PE | 16/06/2008 | anão | Semi-árido | 386 | BSh |
| CCJ31 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ32 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ33 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ34 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ35 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ36 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ37 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ38 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ39 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ40 | Camocim | PE | 08/05/2008 | Comum | Brejo altitude | 675 | As |
| CCJ41 | Barreiros | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ42 | Barreiros | PE | 25/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ43 | Barreiros | PE | 26/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ44 | Barreiros | PE | 27/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ45 | Barreiros | PE | 28/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ46 | Barreiros | PE | 29/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ47 | Barreiros | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ48 | Barreiros | PE | 31/07/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ49 | Barreiros | PE | 01/08/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |

| | | | | | | | |
|--------|----------------|----|------------|-------|------------|-----|----|
| CCJ50 | Barreiros | PE | 02/08/2008 | Comum | Litoral | 20 | Am |
| CCJ51 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ52 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ53 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ54 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ55 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ56 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ57 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ58 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ59 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ60 | Ipojuca | PE | 24/07/2008 | Comum | Litoral | 49 | Am |
| CCJ61 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ62 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ63 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ64 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ65 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ66 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ67 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ68 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ69 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ70 | Paulista | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 72 | Am |
| CCJ71 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ72 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ73 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ74 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ75 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ76 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ77 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ78 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ79 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ80 | Campina Grande | PB | 17/11/2009 | Comum | Agreste | 539 | As |
| CCJ81 | Mossoró | RN | 20/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ82 | Mossoró | RN | 21/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ83 | Mossoró | RN | 22/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ84 | Mossoró | RN | 23/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ85 | Mossoró | RN | 24/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ86 | Mossoró | RN | 25/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ87 | Mossoró | RN | 26/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ88 | Mossoró | RN | 27/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ89 | Mossoró | RN | 28/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ90 | Mossoró | RN | 29/10/2009 | Comum | Semi-árido | 43 | As |
| CCJ91 | Serra do Mel | RN | 30/10/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ92 | Serra do Mel | RN | 31/10/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ93 | Serra do Mel | RN | 01/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ94 | Serra do Mel | RN | 02/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ95 | Serra do Mel | RN | 03/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ96 | Serra do Mel | RN | 04/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ97 | Serra do Mel | RN | 05/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ98 | Serra do Mel | RN | 06/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ99 | Serra do Mel | RN | 07/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ100 | Serra do Mel | RN | 08/11/2009 | Comum | Semi-árido | 131 | As |
| CCJ101 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ102 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ103 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |

| | | | | | | | |
|--------|-------------------|----|------------|---------|-------------|-----|----|
| CCJ104 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ105 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ106 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ107 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ108 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ109 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ110 | Fortaleza | CE | 25/11/2008 | Comum | Litoral | 38 | As |
| CCJ111 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ112 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ113 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ114 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ115 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ116 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ117 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ118 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ119 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ120 | Pacajus | CE | 23/11/2008 | Serrado | Litoral | 39 | As |
| CCJ121 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ122 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ123 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ124 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ125 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ126 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ127 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ128 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ129 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ130 | Paraipaba | CE | 24/11/2008 | CCP76 | Litoral | 28 | As |
| CCJ131 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ132 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ133 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ134 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ135 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ136 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ137 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ138 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ139 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ140 | Trairi | CE | 02/02/2009 | Comum | Litoral | 50 | As |
| CCJ141 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ142 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ143 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ144 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ145 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ146 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ147 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ148 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ149 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ150 | Limoeiro do Norte | CE | 24/09/2009 | CCP76 | Chap. Apodi | 136 | As |
| CCJ151 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ152 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ153 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ154 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ155 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ156 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ157 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |

| | | | | | | | |
|--------|------------------|----|------------|-------|------------|-----|----|
| CCJ158 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ159 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ160 | Ipú | CE | 01/02/2010 | Comum | sopé Serra | 237 | Aw |
| CCJ161 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ162 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ163 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ164 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ165 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ166 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ167 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ168 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ169 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ170 | Viçosa | CE | 02/02/2010 | Comum | Serra | 784 | Aw |
| CCJ171 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ172 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ173 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ174 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ175 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ176 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ177 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ178 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ179 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ180 | Pio IX | PI | 20/02/2010 | CCP76 | Semi-árido | 787 | Aw |
| CCJ181 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ182 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ183 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ184 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ185 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ186 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ187 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ188 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ189 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ190 | Rio Preto da Eva | AM | 06/12/2009 | Comum | Amazônia | 69 | Am |
| CCJ191 | Taquaritinga | SP | 07/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ192 | Taquaritinga | SP | 08/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ193 | Taquaritinga | SP | 09/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ194 | Taquaritinga | SP | 10/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ195 | Taquaritinga | SP | 11/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ196 | Taquaritinga | SP | 12/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ197 | Taquaritinga | SP | 13/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ198 | Taquaritinga | SP | 14/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ199 | Taquaritinga | SP | 15/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ200 | Taquaritinga | SP | 16/12/2009 | CCP76 | Temperado | 545 | Aw |
| CCJ201 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ202 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ203 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ204 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ205 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ206 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ207 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ208 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ209 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ210 | São Luiz | MA | | Comum | Litoral | 10 | Aw |
| CCJ211 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |

| | | | | | | | |
|---------|-----------|----|------------|--------------------------|---------|----|----|
| CCJ212 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ213 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ214 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ215 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ216 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ217 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ218 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ219 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | Am |
| CCJ220 | Recife | PE | 30/07/2008 | Comum | Litoral | 13 | - |
| CMM788 | Ca 788 T | CE | - | Pimentão | - | - | - |
| CMM789 | Ca2 789 A | CE | - | Pimentão | - | - | - |
| CMM2010 | Cg 2010 | PR | 19/06/2004 | Espinheira Santa (folha) | - | - | - |
| CMM2012 | Cg 2 2011 | PR | 19/06/2004 | Espinheira Santa (folha) | - | - | - |

* Classificação segundo Köppen – Am (Tropical com chuvas abundantes), Aw (Tropical com chuvas de verão) As (Tropical de estepes), BSh (árido com chuvas de inverno, seco e quente)

Anexo 2. Distribuição Geográfica dos Pontos de Coleta

