

LUIZ CARLOS CORDEIRO DE ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Colletotrichum*, CARACTERIZAÇÃO DA
AGRESSIVIDADE E EFEITO DE INDUTORES QUÍMICOS NO CONTROLE
DA ANTRACNOSE EM MARACUJÁ AMARELO**

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

**RECIFE –PE
FEVEREIRO, 2005**

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

A447i Almeida, Luiz Carlos Cordeiro de
Identificação específica de *Colletotrichum*, caracteri-
zação da agressividade e efeito de indutores químicos
no controle da antracnose em maracujá amarelo / Luiz
Carlos Cordeiro de Almeida – 2005.
79 f. : il., tabs.

Orientador: Rildo Sartori Barbosa Coêlho
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agro-
nomia.
Referências.

CDD 632

1. Fitopatologia
 2. Agressividade
 3. *Colletotrichum gloeosporioides*
 4. Maracujá amarelo
 5. Pós- colheita
 6. *Passiflora edulis f. flavicarpa*
 7. Marcador enzimático
 8. Marcador fisiológico
 9. Marcador genético
 10. RAPD
 11. PCR
 12. Indutor químico
 13. Resistência sistêmica adquirida
- I. Coêlho, Rildo Sartori Barbosa
II. Título

**IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Colletotrichum*, CARACTERIZAÇÃO DA
AGRESSIVIDADE E EFEITO DE INDUTORES QUÍMICOS NO CONTROLE
DA ANTRACNOSE EM MARACUJÁ AMARELO**

LUIZ CARLOS CORDEIRO DE ALMEIDA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2005

ORIENTADOR:

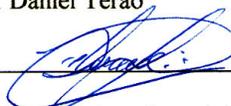


Prof. Dr. Rildo Sartori Barbosa Coêlho

EXAMINADORES:



Dr. Daniel Terao



Prof. Dr. Delson Laranjeira



Dr. José Luiz Bezerra



Profª. Drª. Maria Menezes



Profª. Drª. Sônia Maria Alves Oliveira

**RECIFE – PE
FEVEREIRO 2005**

IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Colletotrichum*, CARACTERIZAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E EFEITO DE INDUTORES QUÍMICOS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MARACUJÁ AMARELO

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof^o Dr. Rildo Sartori Barbosa Coêlho – Orientador

Prof^a Dra. Sônia Maria Alves Oliveira – Co-orientadora

Prof^a Dra. Maria Menezes – Co-orientadora

**RECIFE – PE
FEVEREIRO 2005**

**A minha esposa Antonia
OFEREÇO COM AMOR
E ETERNA GRATIDÃO**

**Aos meus filhos
Eric, Bruno e Vitor
DEDICO**

**A minha mãe Clarice
O MEU CARINHO**

**Aos colegas de trabalho
Bezerra, Edna, Olívia e Stela
A MINHA GRATIDÃO**

**Ao professor
Rildo Sartori Barbosa Coêlho
A MINHA ADMIRAÇÃO
E O MEU RESPEITO**

JESUS CRISTO: meu caminho, minha verdade e minha vida.

AGRADECIMENTOS

À UFRPE, por ter-me aceito como aluno.

À CEPLAC, pela oportunidade que me foi dada para o meu aperfeiçoamento.

Ao professor Rildo Sartori Barbosa Coêlho, pela amizade, compreensão e orientação.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos e pela ajuda financeira para a execução dos experimentos.

Aos Drs. Antônio Fonseca e Dijair Alves da Silva, dirigentes da EBAPE, que viabilizaram a coleta de frutos de maracujá com antracnose, para obtenção dos isolados de *Colletotrichum* utilizados nos trabalhos da tese.

À professora Maria Menezes, pelo carinho e pelas indispensáveis informações científicas.

À professora Sônia Maria Alves Oliveira, pela amizade e pelas informações científicas extremamente práticas.

À professora Elvira Maria Regis Pedrosa pelas sugestões nas análises estatísticas e ajuda na revisão dos Abstracts

Ao professor Sami Jorge Michereff, pelas sugestões nas análises estatísticas.

Ao professor Reginaldo Barros, pela acolhida e amizade.

A minha irmã Olívia Cordeiro de Almeida, pelo apoio.

À colega Karina Peres Gramacho e a Jorge Teodoro de Souza, pelas sugestões nos ensaios com marcadores RAPD.

Ao colega José Luis Pires, pela análise estatística dos dados com o uso do SAS.

Ao colega Lindolfo Pereira dos Santos Filho, pela colaboração nas análises estatísticas com uso de correlação e regressão.

Às biólogas Rita de Cássia S. Bahia, Acassi B. Flores e Brena F. Santos e ao laboratorista Reinaldo F. dos Santos pela ajuda no laboratório de Biomol do Cepec.

Ao colega de curso Rinaldo M. Lima Filho pelo apoio.

SUMÁRIO

	Folha
AGRADECIMENTOS.....	
RESUMO	9
ABSTRACT	11
Capítulo I – Introdução geral	14
Referências Bibliográficas	20
Capítulo II – Identificação específica de <i>Colletotrichum</i> spp. de maracujá amarelo e caracterização da agressividade com marcadores bioquímico, fisiológico e genético	30
Resumo	30
Abstract	32
Introdução	33
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	40
Agradecimentos	48
Referências Bibliográficas	48
Capítulo III - Efeito de indutores químicos no controle da antracnose do maracujá amarelo	62
Resumo	62
Abstract	63
Introdução	64
Material e Métodos	66
Resultados e Discussão	68
Agradecimentos	70
Referências Bibliográficas	70
Considerações Gerais	78

RESUMO

A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum* sp. é uma das doenças em pós-colheita mais importantes do maracujazeiro amarelo. Apesar da existência de medidas de manejo tanto para a pré-colheita como para a pós-colheita, o controle não é satisfatório. Visando contribuir com um programa para aumentar a resistência da planta, foram coletados 33 isolados de *Colletotrichum*, obtidos de três regiões produtoras do estado de Pernambuco, para: i) identificação específica com marcadores genéticos primers de PCR; ii) conhecer agressividades em maracujá amarelo; iii) caracterizá-la com marcador bioquímico, pela produção de enzimas hidrolíticas extra celulares em meios sólidos específicos, fisiológico, pelo crescimento micelial em meio de BDA e genético, com primers de RAPD. Também se estudou o controle da antracnose em maracujá amarelo com uso dos indutores químicos acibenzolar-S-metil (ASM), ácido LD β -amino-n-butírico (BABA) e jasmonato metílico (JM). Nenhum DNA dos isolados reagiu com os primers de PCR marcadores para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, mas 18 reagiram com o primer de PCR marcador para *Colletotrichum* de *Passiflora*, embora os isolados não identificados geneticamente apresentassem características morfológicas semelhantes às de *C. gloeosporioides*. Inoculações em maracujá amarelo permitiram separar os isolados em dois grupos de agressividade: alta (GA-1) e baixa (GA-2), embora a agressividade não tenha se correlacionado com a origem e os morfotipos teleomorfo e anamorfo. Os marcadores bioquímico (atividade enzimática amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica) e o marcador fisiológico (crescimento micelial) separaram os isolados em grupos, mas não se mostraram satisfatórios como marcadores para agressividade. Não foi detectada atividade enzimática pectinolítica devido ao método ter sido inadequado.

As bandas geradas pelas reações de 18 primers com os DNAs dos isolados permitiram observar que os isolados do GA-1 são mais próximos geneticamente entre si do que os isolados do GA-2, sendo possível dividi-los em dois grupos genéticos que não se relacionaram totalmente com os isolados do GA-1 e GA-2. O marcador banda na posição 14 em gel de agarose, resultante das reações dos DNAs dos isolados com o primer de RAPD OPA-9, possibilitou a caracterização de 85,7 % dos isolados do GA-1, com um erro de 15,7 % ao caracterizar como do GA-1 três isolados do GA-2, mas sem importância técnica. Os estudos com os indutores ASM, BABA e JM, evidenciaram que ASM e JM, nas concentrações 12,5; 25,0; 50,0; e 100,0 ppm, e BABA, nas concentrações 50; 100; 500; e 1000 ppm, não reduziram a germinação de conídios de *Colletotrichum* sp., mas BABA e JM estimularam este processo fisiológico. Os indutores ASM e JM reduziram o crescimento micelial e BABA apresentou efeito contrário. A imersão de maracujá amarelo em suspensão de ASM (100 ppm), JM (100 ppm), BABA (1000 ppm) e em água (testemunha) seguida de inoculação feita 24 h após com *Colletotrichum* sp. não resultou em controle da doença.

ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum* sp., is the most important post harvest disease on the yellow passion fruit. The disease management measures have not been satisfactory ever during the pre or post harvest period. Aiming to contribute to the program of cultivar resistance, 33 isolates were obtained from three producing regions of Pernambuco State, to: i) identify specie with genetic marker (PCR primer); ii) to know the pathogen aggressiveness on post harvested yellow passion fruits; iii) aggressiveness characterization using: biochemical (extra cellular enzymatic activity on specific solid media), physiological (micelial growth on PDA) and genetic (RAPD primer) markers. Also, it was studied anthracnose control on post harvested yellow passion fruit using acibenzolar-S-methyl (ASM), DL β -amine-n-butyric acid (BABA) and methyl jasmonate (MJ) chemical inducers. None DNA extracted from isolates reacted with *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* PCR primers markers, but 18 DNAs reacted with *Colletotrichum* of *Passiflora* PCR primer marker, although isolates not identified genetically showed morphological characteristics similar to *C. gloeosporioides*. Yellow passion fruits inoculations showed two isolate groups for aggressiveness: high (AG-1) and low (AG-2), but aggressiveness did not correlate with origin and teleomorphic and anamorphic morphotype. The biochemical (amilolytic, celullolytic, lypolytic and proteolytic enzymatic activities) and physiological (micelial growth) markers separated isolates in groups, but they were not a satisfactory makers to aggressiveness. It was not detected pectinolytic enzymatic activity by isolates because the used method it was not appropriated. Bands produced by reaction of 33 DNAs with 18 primers showed that AG-1 isolates are more related to each other than AG-2 isolates, being possible to separate isolates in two genetic groups,

which not totality related with AG-1 and AG-2 isolates. The reactions of the RAPD OPA-9 primer with isolates DNA produced bands in position 14, on agarose gel, which allowed characterization of the 85.7 % of AG-1 isolates, showing error of 15.7 % by including three isolates from AG-2 into AG-1, but without technique importance. Study with the chemical ASM, BABA e MJ inducers showed that ASM and MJ, at 12.5; 25.0, 50.0 and 100.0 ppm concentrations, and BABA, at 50, 100, 500 and 1000 ppm concentrations, did not reduce *Colletotrichum* conidia germination, but BABA and JM stimulate this physiological process. ASM and JM reduced mycelium growth and BABA showed contrary effect. Yellow passion fruits immersed in ASM (100ppm), BABA (1000 ppm) and MJ (100 ppm) suspension and water (control), followed by *Colletotrichum* inoculation 24 hours after treatment, did not show anthracnose control.

Introdução geral

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

O maracujazeiro, planta nativa do Brasil, pertence à família Passifloraceae, que compreende 12 gêneros com mais de 500 espécies. Do gênero *Passiflora*, cerca de 150 espécies são indígenas, das quais 60 produzem frutos que podem ser aproveitados direta ou indiretamente como alimentos (TEIXEIRA, 1995). Deste, as espécies mais cultivadas são *Passiflora edulis* Simmonds f. *flavicarpa* Degener, fruto conhecido como maracujá amarelo ou azedo, que constitui 95% dos plantios comerciais brasileiros, e 5 % ficam com as espécies *P. alata* Dryander e *P. edulis* Simmonds, frutos de coloração roxa, conhecidos respectivamente por maracujá roxo e maracujá doce (JUNQUEIRA, 2002; MELETTI; TRINDADE et al., 2000)

O maracujá foi levado para outros países, como o Peru, Estados Unidos, Austrália, África do Sul, Quênia, Índias Ocidentais, Taiwan, Indonésia, Filipinas e alguns outros, porém o Brasil é o maior produtor mundial (SOUZA et al., 2002), onde o valor da produção em 2003 foi de aproximadamente 228 milhões de reais, superando em 50 milhões ao da goiaba, *Psidium guajava* L. e 165 milhões de reais a menos em relação ao da manga, *Mangifera indica* L. A área nacional colhida foi de 34.994 ha, com rendimento médio (kg/ha) de 13.869, enquanto que o da região Sudeste foi de 18.973 e da região Norte 8.486 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005).

Entre os vários fatores que contribuem para reduzir o rendimento médio dos plantios de maracujá amarelo encontram-se as doenças, de várias origens etiológicas, mas a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo, teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & Schrenk, e por *Colletotrichum* sp., é a mais importante (AFANADOR-KAFURI et al., 2003;

LIBERATO, 2002) e ocorre em áreas onde as condições climáticas são favoráveis ao patógeno (MATTA, 1982). É observada com maior intensidade no período chuvoso e, a depender da região, restringe-se a esse período. A alta umidade relativa favorece o desenvolvimento da antracnose, mas só tem importância se for associada com chuva. A temperatura média ótima é de 27 °C. Temperaturas baixas, como 15 °C, limitam a doença, mesmo na presença de chuva. De modo geral, a doença torna-se mais expressiva no segundo ano do plantio (ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, 1988; LIBERATO, 2002; LIMA FILHO, 2003; TEIXEIRA, 1995), embora existam práticas de manejo integrado recomendadas para a pré-colheita (JUNQUEIRA, 2002)

O patógeno ataca toda a parte aérea da planta em qualquer idade, causando sintomas como lesões necrosadas nas folhas, que podem cair; cancos nos ramos, acarretando morte dos ponteiros; e manchas deprimidas de coloração escura nos frutos, que poderão afetar a polpa, resultar em podridão e provocar a queda destes frutos (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

Esta doença é também uma das mais importantes na pós-colheita (SILVA; DURIGAN, 2000), resultante de infecções quiescentes que levam ao descarte de frutas (BENATO, 1999; TEIXEIRA, 1995), apesar da existência de práticas de manejo para a pós-colheita (SILVA; DURIGAN, 2000). Em frutos de maracujazeiro amarelo, coletados em determinados pontos do comércio varejista de Recife, detectou-se em média 5 % de incidência (SILVEIRA, 1999). Na Central de Abastecimento de Recife houve recusa na compra de maracujá amarelo, proveniente de certos fornecedores da Zona da Mata de Pernambuco, em época chuvosa, devido às perdas significativas de frutos estocados, comprados nesta época do ano.

Apesar das práticas de manejo integrado recomendadas na pré e pós-colheita o controle não tem sido satisfatório. Rego et al. (1995) consideram que a resistência é o

meio mais simples, efetivo e econômico para controlar doenças de plantas. A busca de material resistente requer conhecimentos da interação entre patógeno e hospedeiro (LIMA; CHAVES, 1992). A produção das enzimas extracelulares, o crescimento micelial e a tecnologia do DNA recombinante permitem investigar variações genéticas e genes que controlam especificidade e patogenicidade de fungos em plantas (COUTO et al., 2002; LIMA; CHAVES, 1992; MANNERS et al., 1992). O maracujá amarelo embora suscetível à antracnose pode, a exemplo de outras plantas, possuir mecanismos eficientes de resistência, que seriam acionados ou ativados quando em contato com indutores (ROMEIRO, 1999).

Agressividade de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

Fundamentados na baixa resistência observada em seus estudos Wulff et al. (1994) sugerem investigar cultivares de maracujazeiro que expressem menor severidade da antracnose. O emprego da resistência genética tem merecido especial destaque dentro de um sistema integrado de controle (RAVA et al., 1994). Ao considerar que a resistência é o meio mais simples, efetivo e econômico para controlar doenças de plantas (REGO et al., 1995), Denoyes-Rothan et al. (1999) usaram esta estratégia visando o controle da antracnose do morango, *Fragaria X ananassa* Duch. Entretanto, o conhecimento da variabilidade do patógeno é de fundamental importância para futuros trabalhos de melhoramento (LIMA; CHAVES, 1992).

O gênero *Colletotrichum* é notoriamente variável em relação a determinadas características (BRYSON et al., 1992). Mais de uma espécie ataca um mesmo hospedeiro como *C. acutatum* Simmonds e *C. fragariae* Brooks, em morangueiro (TANAKA et al., 1997) e no hospedeiro isolados da mesma espécie apresentam

agressividade variável como *C. gloeosporioides* em cebola, *Allium cepa* L., cujos isolados foram separados em três grupos de agressividade (ASSUNÇÃO, 1997).

A espécie-grupo *Colletotrichum gloeosporioides* exibe consideráveis variações morfológica e patogênica que dificultam classificá-la, usando caracteres morfológicos (MANNERS et al., 1992). Para Assis (2001), o conhecimento da produção de enzimas extracelulares por fungos fitopatogênicos constitui uma ferramenta importante e adicional para estudos sobre taxonomia química em fungos, permitindo a detecção de diferenças, mesmo entre isolados de uma mesma espécie. Ao estudar *C. gloeosporioides* da manga observou que os isolados apresentaram atividade extracelular das enzimas amilolítica, lipolítica e proteolítica, mas não celulolítica, embora os isolados tenham sido diferenciados pelas atividades amilolítica e proteolítica.

Entre os aspectos morfológicos culturais, o crescimento micelial tem sido usado para caracterizar a variabilidade de isolados de fungos fitopatogênicos. Swart (1999) não observou diferença no diâmetro de colônias após sete dias entre isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos da manga e do abacate, *Persea americana* Mill., mas o diâmetro das colônias dos isolados das diferentes áreas de produção diferiram significativamente.

A tecnologia do DNA recombinante permite investigar variações genéticas e genes que controlam especificidade e patogenicidade de fungos em plantas (MANNERS et al., 1992). Os marcadores molecular *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) têm como base o uso de um primer, pequeno oligonucleotídeo de 10 bases com seqüência arbitrária, que ao se emparelhar às seqüências complementares dispersas no genoma do fungo, é amplificado por ação de uma enzima, a Taq polimerase (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Esta técnica requer pequenas quantidades de DNA, é de rápida execução e permite trabalhar com um número grande de isolados de

uma população do patógeno (MANNERS et al., 1992). Tem sido usada para caracterização de *C. gloeosporioides* (PERES et al., 2002), para identificação de isolados desta espécie, que se diferenciam pelos sintomas causados na planta hospedeira (MUNAUT et al., 1998), e também para identificação de isolados com agressividades diferentes, como aqueles de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr.) Dydo & Sutton in Sutton, em coníferas (BLODGETT; STANOSZ, 1999). Primers marcadores de *polimerase chain reaction* (PCR) além de outras aplicações tem sido usados na identificação de patógenos como *Colletotrichum* de *Passiflora* (AFANADOR-KAFURI et al., 2003).

Indução de Resistência

O emprego da resistência genética, para reduzir perdas, tem merecido destaque no manejo de doenças (TALAMINI et al., 2004), embora a obtenção dos resultados seja de médio a longo prazo. Entretanto, plantas possuem mecanismos eficientes de resistência que podem ser acionados ou ativados quando em contato com indutores (ROMEIRO, 1999), cuja expressão pode demorar de sete horas até 10 semanas (OOSTENDORP et al., 2001; STICHER et al., 1997). A redução na suscetibilidade a futuras infecções é conhecida como resistência sistêmica adquirida (RSA), que ocorre no local da indução ou em tecidos localizados em outras partes da planta (DELANEY, 1997; STICHER et al., 1997). Uma vez ativada a resposta de defesa natural, a proteção pode durar várias semanas e atuar contra uma faixa ampla de organismos invasores, como bactérias, fungos, nematóides e vírus, conferindo proteção quantitativa (STICHER et al., 1997).

A resistência das plantas pode ser ativada por indutores bióticos e abióticos (OOSTENDORP et al., 2001), existindo entre os abióticos os indutores físicos e químicos (WILSON et al., 1994; STICHER et al., 1997). Os mais usados, pela

disponibilidade no comércio, são os químicos sintéticos (STICHER et al., 1997; OOSTENDORP et al., 2001).

A aplicação do indutor acibenzolar-S-metil (ASM) e tratamento hidrotérmico em frutos de mamão, *Carica papaya* L., reduziram o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*, cujo resultado foi superior ao observado com aplicação de thiabendazole e tratamento hidrotérmico (BENATO et al., 2002). Em tomateiro, *Lycopersicon esculentum* L., o ASM reduziu significativamente a severidade da requeima, pinta preta, septoriose e mancha bacteriana, além de aumentar a produção e qualidade dos frutos (CASTRO et al., 2001). O indutor jasmonato metílico (JM) quando aplicado durante três dias na forma volátil protegeu plântulas de abeto, *Picea abies* (L.) Karst., em até 75 % das infecções causadas por *Pythium ultimum* Trow. (KOZLOWSKI et al., 1998) e o jasmonato aplicado no solo na forma líquida controlou a murcha e a morte de plântulas de *Arabidopsis*, causada por *P. mastophorum* Drechs. (VIJAYAN et al., 1998). O uso do indutor ácido DL- β -amino-n-butírico (BABA) protegeu completamente plantas suscetíveis de alface contra *Bremia lactucae* Regel (PAJOT et al., 2001). Porat et al. (1999) conseguiram reduzir a deterioração de toranja, *Citrus paradise* Mac Fad. cv. Star Ruby, pós-colheita, causada por *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc., com aplicação de ácido jasmônico e BABA.

Os indutores ASM e BABA ativam genes que produzem proteínas relacionadas à patogênese; quitinase e outras substâncias, a exemplo das fitoalexinas; proteínas relacionadas às modificações morfológicas, como aumento da lignificação e formação de papila, além de fortalecer a parede celular (JAKAB et al., 2001; PERCIVAL, 2001; ROMERO et al., 2001). O indutor jasmonato induz o gene PDF1.2, que codifica para um peptídeo antifúngico, o “defensin” (PENNINCKX et al., 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, May. 2003.

ALBUQUERQUE, J.A.S.; ALBUQUERQUE, T.C.S. **Prática de cultivo para maracujá na região do Submédio São Francisco**. Petrolina: EMBRAPA – CPATSA, 1988. 12 p. (Comunicado Técnico 22).

ASSIS, T.C. de. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose da mangueira, quanto a utilização de carboidratos, patogenicidade, produção de enzimas e análise de RAPD**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2001.

ASSUNÇÃO, I.P. **Identificação de fontes de resistência em cultivares de cebola (*Allium cepa* L.) e análise da variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Sensu Arx, 1957) assistida por marcadores moleculares**. 1997. 80 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1997.

BENATO, E.A.; PASCHOLATI, J.M.M.; SIGRIST, J.M.M.; CIA, P.; SANTANA, S.L.; CAMILI, E.C.; SILVA, C.A.R. Viabilidade do controle de antracnose em mamão

pós-colheita através de indução de resistência por acibenzolar-S methyl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, suplemento, p. S84, ago. 2002.

BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 1, p. 90-93, jan./mar. 1999.

BLODGETT, J.T.; STANOSZ, G.R. Differences in aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* marker group isolates on several conifers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 9, p. 853-856, Sept. 1999.

BRYSON, R.J.; CATEN, C.E.; HOLLOMON, D.W.; BAILEY, J.A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CABI, 1992. p. 27-46.

CASTRO, R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; AZEVEDO, L.A.S. Efeito do ativador de plantas acibenzolar-S-methyl na proteção contra doenças, incremento de produção e qualidade de frutos em tomate estaqueado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, suplemento, p. 492-493, ago. 2001.

COUTO, E.F.; MENEZES, M.; COELHO, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 3, p. 260-266, jul./set. 2002.

DELANEY, T.P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 113, n. 1, p. 5-12, Jan. 1997.

DENOYES-ROTHAN, B.; LAFARGUE, M.; GUERIN, G. Fruit resistance to *Colletotrichum acutatum* in strawberries. *Plant Disease*, Saint Paul, v.83, n. 6, p. 549-553, June. 1999.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp>> Acesso em 2 mar. 2005.

JAKAB, G.; COTTIER, V.; TOQUIN, V.; RIGOLI, G.; ZIMMERLI, L.; MÉTRAUX, J.P.; MAUCH-MANI, B. β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n. 1, p 29-37, Jan. 2001.

JUNQUEIRA, N.T.V. Manejo integrado de doenças do maracujazeiro, da mangueira, da goiabeira e das anonáceas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2002. p. 239-277.

KOZLOWSKI, G.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.P. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 53-58, July. 1998.

LIBERATO, J.R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2002. p. 699-825.

LIMA, E.F. & CHAVES, G.M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 61-66, abr. 1992.

LIMA FILHO, R.M. **Caracterização isoenzimática, inoculações cruzadas de Colletotrichum e influência da temperatura no desenvolvimento da antracnose em maracujá**. 2003, 54 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.

MANNERS, J.M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CABI, 1992. p.250- 268.

MATTA, E.A.F. **Doenças do maracujazeiro no estado da Bahia**. Salvador: EPABA, 1982. 17 p. (Circular Técnica, 2).

MELETTI, L.M.M.; MATA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico – IAC, 1999. 64 p. (Boletim Técnico, 181)

MUNAUT, F., HAMAIDE, N. STAPPEN, J.V. & MAREITE, H. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. In Africa and

Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 641-648, Oct. 1998.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 19-28, Jan. 2001.

PAJOT, E.; LE CORRE, D.; SILUE, D. Phytogard ® and DL-beta-amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 9, p. 861-969, Nov. 2001.

PENNINCKX, I.A.M.A.; THOMMA, B.P.H.J.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.P.; BROEKAERT, W.F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 12, p. 2103-2114, Dec. 1998.

PERCIVAL, G.C. Induction of systemic acquired disease resistance in plants: potential implications for disease management in urban forestry. **Journal of Arboriculture**, Champaign, v. 27, n. 4, p. 181-192, July. 2001.

PERES, N.A.R., KURAMAE, E.E. DIAS, M.S.C. & SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. Affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 150, n. 3, p. 128-134, Mar. 2002.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R.L.R. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica CERES, 1997, v.2, p.523-534.

PORAT, R.; VINOCUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DROBY, S. Effects of various elicitors on the resistance of citrus fruits against pathogens. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 27, n. 2, p. 158-159, Mar. 1999.

RAVA, C.A.; PERCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, jun. 1994.

REGO, A.M.; MAFFIA, L.A.; ALFENAS, A.C. Reação de germoplasma de melancia (*Citrullus lanatus*) e melão (*Cucumis melo*) a *Colletotrichum orbiculare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n 1, p. 48-55, mar. 1995.

ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1999. 45 p.

ROMERO, A.M.; KOUSIK, C.S.; RITCHIE, D.F. Resistance to bacterial spot pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 189-194, May. 2001.

SILVA, A.P.; DURIGAN, J.F. Colheita e conservação pós-colheita do maracujá. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 206, p. 67-71, set./out. 2000.

SILVEIRA, N.S.S. **Fungos fitopatogênicos associados com frutos e aspectos epidemiológicos relacionados ao desenvolvimento de doenças pós-colheita em frutos de tomateiro**. 1999. 139 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1999.

SOUZA, J.S.; CARDOSO, C.E.L.; LIMA, A.A.; COELHO, E.F. Comercialização. In: LIMA, A.A. (Ed.) **Maracujá: produção – aspectos técnicos**. Brasília: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, 2002. p. 91-96.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.M.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270. 1997.

SWART, G.M. **Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango**. 1999. 193 f. Tese (Ph. D. em Fitopatologia) – University of Pretoria, Pretoria, 1999.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; CARRIJO, F.R.F.; ISHIKAWA, F.H.; SILVA, K.J.D.; OLIVEIRA, F.A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 371-375, jul./set. 2004.

TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A.; BINOTTI, C.S.; NOVAIS, A.J. Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum fragariae* em rizomas e pecíolos de morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 4, p. 303-307, out./dez. 1997.

TEIXEIRA, C.G. Cultura. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Maracujá**: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2^a ed. Campinas: ITAL/IPEA, 1995. p. 1-42 (Serie Frutas Tropicais, 9).

TRINDADE, C.C.; TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; LUCAS, B.L.L. Doenças do maracujazeiro no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, suplemento, p. 346-347, ago. 2000.

VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LÉVESQUE, C.A.; COOK, R.J.; BROWS, J.A. Role for jasmonato in pathogen defense of Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 12, p. 7209-7214, June. 1998.

WILSON, C.L.; EL GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J.Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest disease of fruits and vegetables. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 9, p. 837-843, Sep. 1994.

WULFF, N.A.; ALQUINI, Y.; LEITE, B. Observações histopatológicas, espectrofotométricas e atividade de peroxidase em plantas de maracujá inoculadas com

Colletotrichum gloeosporioides (patógeno) e *Colletotrichum graminicola* (não patógeno). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, suplemento, p. 287-288, ago. 1994.

Identificação específica de *Colletotrichum* spp. de maracujá amarelo e caracterização da agressividade com marcadores bioquímico, fisiológico e genético

CAPÍTULO 2

**IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Colletotrichum* spp. DE MARACUJÁ
AMARELO E CARACTERIZAÇÃO DA AGRESSIVIDADE COM
MARCADORES BIOQUÍMICO, FISIOLÓGICO E GENÉTICO***

LUIZ C. C. DE ALMEIDA^{1} & RILDO S. B. COELHO²**

¹ Seção de Fitopatologia, Cepec/Ceplac, Cx. Postal 7, CEP 45600-970, Itabuna, BA,
fax: (73) 214-3204, e-mail: cordeirolc@yahoo.com.br; ²Fitossanidade/Departamento de
Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bairro Dois Irmãos, CEP
52171-900, Recife, PE, fax: (81) 3302-1205, e-mail: sartori@hotlink.com.br

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Luiz Carlos Cordeiro de Almeida.

ALMEIDA, L.C.C. & COELHO, R.S.B. Identificação específica de *Colletotrichum* spp.
de maracujá amarelo e caracterização da agressividade com marcadores bioquímico,
fisiológico e genético. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, é a doença pós-

*Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco (2005)

**Bolsista do CNPq e pesquisa financiada pela UFRPE e CNPq.

colheita mais importantes do maracujá amarelo. Visando conhecer a variabilidade do patógeno, foram obtidos 33 isolados de três regiões produtoras do Estado de Pernambuco. Nenhum DNA dos isolados reagiu com os primers de PCR marcadores para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, mas 18 DNAs reagiram com o primer marcador de PCR para *Colletotricum* de *Passiflora*, embora os isolados não identificados geneticamente tenham apresentado características morfológicas semelhantes às de *C. gloeosporioides*. Inoculações de maracujá amarelo separaram os isolados em dois grupos de agressividade: alta (GA-1) e baixa (GA-2), embora a agressividade não tenha se correlacionado com a origem e os morfotipos teleomorfo e anamorfo. Os marcadores bioquímico (atividade enzimática amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica) e o fisiológico (crescimento micelial) separaram os isolados em grupos, mas não se mostraram satisfatórios como marcadores para agressividade. As bandas geradas pela reação de 18 primers com os DNAs dos isolados permitiram observar que os isolados do GA-1 são mais próximos geneticamente entre si do que os isolados do GA-2, sendo possível dividi-los em dois grupos genéticos que não se relacionaram totalmente com os isolados do GA-1 e GA-2. O marcador banda na posição 14 em gel de agarose, resultante das reações dos DNAs dos isolados com o primer de RAPD OPA-9, possibilitou a caracterização de 85,7 % dos isolados do GA-1, com um erro de 15,7 % ao caracterizar como do GA-1 três isolados do GA-2, mas sem importância técnica.

Palavras-chave adicionais: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, antracnose, pós-colheita, enzima extracelular, PCR, RAPD.

ABSTRACT

Identification of *Colletotrichum* specie from yellow passion fruit and aggressiveness characterization with biochemical, physiological and genetic markers.

Anthrachnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is the most important disease of the post harvest yellow passion fruit. To know pathogen variability, were obtained 33 isolates from three producing regions of Pernambuco State. None DNA extracted from isolates reacted with *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* PCR primers markers, but 18 DNAs reacted with *Colletotrichum* of *Passiflora* PCR primer marker, although isolates not identified genetically showed morphological characteristics similar to *C. gloeosporioides*. Yellow passion fruits inoculations showed two isolate groups for aggressiveness: high (AG-1) and low (AG-2), but aggressiveness did not correlate with origin and teleomorphic and anamorphic morphotype. The biochemical (amilolytic, celullolytic, lypolytic and proteolytic enzymatic activities) and physiological (micelial growth) markers separated isolates in groups, but they were not a satisfactory makers to aggressiveness. Bands produced by reaction of 33 DNAs with 18 primers showed that AG-1 isolates are more related to each other than AG-2 isolates, being possible to separate isolates in two genetic groups, which not totality related with AG-1 and AG-2 isolates. The reactions of the RAPD OPA-9 primer with isolates DNA produced bands in position 14, on agarose gel, which allowed characterization of the 85.7 % of AG-1 isolates, showing error of 15.7 % by including three isolates from AG-2 into AG-1, but without technique importance.

INTRODUÇÃO

Uma das doenças mais importantes do maracujazeiro amarelo, *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. (Trindade *et al.*, 2000), na pós-colheita é a antracnose (Silva & Durigan, 2000), causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sac. (Liberato, 2002), apesar de na Colômbia isolados de *Passiflora* sp. tenham sido identificados geneticamente como *Colletotrichum* sp., porque os DNAs não reagiram com os primers de PCR do ITS1 marcadores para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, mas reagiram com o primer de PCR do ITS1 marcador para *Colletotrichum* de *Passiflora* (Afandor-Kafuri *et al.*, 2003).

A doença na pós-colheita, expressada por manchas ou podridões (Peruch, 1998), resulta de infecções quiescentes (Benato, 1999), que levam ao descarte de frutas (Teixeira, 1995).

Apesar das práticas de manejo integrado para a pré-colheita (Junqueira, 2002) e pós-colheita (Silva & Durigan 2000), o controle não tem sido satisfatório. A planta é suscetível à doença e extensas áreas cultivadas estão situadas onde as condições climáticas são favoráveis ao patógeno (Matta, 1982). Fundamentados na baixa resistência observada em seus estudos, Wulff *et al.* (1994) sugerem investigar cultivares que expressem menor severidade da doença. Para Rego *et al.* (1995) a resistência é o meio mais simples, efetivo e econômico no controle de doenças de plantas. Segundo Rava *et al.* (1994) o emprego da resistência genética tem merecido especial destaque dentro de um sistema integrado de manejo, visando a redução de perdas.

Como a interação entre patógeno e hospedeiro é importante na expressão da doença, Denoyes-Rothan *et al.* (2003) detectaram dois grupos de patogenicidade entre isolados de *C. acutatum* Simmonds em morangueiro, *Fragaria X ananassa* Duch, e

tendo em vista a importância do nível da virulência do patógeno em um programa de melhoramento, Denoyes-Rothan *et al.* (1999) inocularam um isolado mais virulento de *C. acutatum* em morangos imaturos destacados na seleção de quatro genótipos resistentes à antracnose.

Couto *et al.* (2002) demonstraram que a produção das enzimas extracelulares com atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica em meio sólido, permitiu comparar a variabilidade entre isolados de *C. musae* (Berk & Curtis) von Arx, agente da antracnose da banana, *Musa* spp. Lima & Chaves (1992) usaram o crescimento micelial, entre outras características, para estudar a variabilidade de isolados de *C. gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa do algodoeiro, *Gossypium* spp.

Para diferenciar isolados de *Colletotrichum* obtidos de diversos hospedeiros, os métodos tradicionais como forma e dimensão de conídios, coloração de colônia, taxa de crescimento micelial e outras características, não têm sido suficientes (Freeman *et al.*, 1998). A tecnologia do DNA recombinante permite investigar variações genéticas e genes que controlam a patogenicidade de fungos em plantas (Manners *et al.*, 1992). As técnicas *polymerase chain reaction* (PCR), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *arbitrarily primed* (ap)-PCR e outras têm sido usadas para determinar com segurança a diversidade genética intra e inter específica de *Colletotrichum* spp. (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). Primers de PCR têm sido usados, entre inúmeras finalidades, como marcadores para espécies de *Colletotrichum* (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003) e primers de RAPD vem sendo usados para identificação de isolados de *C. gloeosporioides* que se diferenciam pelos sintomas causados na planta hospedeira (Munaut *et al.*, 1998) e também para caracterização da agressividade de isolados de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr.) Dydo & Sutton in Sutton, em coníferas (Blodgett & Stanosz, 1999).

Ao se incluir novos isolados em um programa de resistência, o uso de marcador tem a vantagem de evitar a realização de novos testes de agressividade, os quais apresentam como inconvenientes a dificuldade de se conseguir quantidade suficiente do hospedeiro, na condição fisiológica ideal para ser trabalhado e sem resíduos de agrotóxicos, além de demandar tempo para obtenção dos resultados.

Neste trabalho, procurou-se identificar a espécie de *Colletotrichum* de isolados de maracujá amarelo, oriundos de três regiões do estado de Pernambuco, com primers marcadores de PCR; estudou-se a agressividade destes isolados em frutas pós-colheita; e buscou-se caracterizá-los pela agressividade com marcador bioquímico, através da produção de enzimas extracelulares, com marcador fisiológico, pelo crescimento micelial; e com marcador genético, usando primer de RAPD de modo que os resultados obtidos possam subsidiar estudos de melhoramento do maracujazeiro amarelo, visando resistência das frutas à antracnose.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação específica de *Colletotrichum* isolado de maracujá amarelo com primers de PCR

Frutas de maracujazeiro amarelo, com sintomas de antracnose, foram coletadas no mês de setembro de 2002, em propriedades agrícolas situadas na Zona da Mata Norte, Zona da Mata Sul e Agreste do estado de Pernambuco. Depois de etiquetadas foram transportadas para o Laboratório de Patologia Pós-colheita da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde se realizou o isolamento do patógeno.

As frutas foram lavadas com água e sabão e secadas com papel toalha. A seguir, depois de flambadas as lesões e removidas as epidermes com escalpelo flambado, foram

retirados fragmentos da área de transição da lesão e plaqueados em meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas em condições de laboratório, à temperatura de 25 ± 2 °C e sob luz contínua. As colônias desenvolvidas resultaram em 33 isolados de *Colletotrichum*, que foram identificadas com a sigla Cm (*Colletotrichum* de maracujá) e preservadas através do método de Castellani (1937). Para uso imediato, os isolados foram conservados em placas com BDA, mantidas em geladeira, a 4 °C.

Discos de cultura (6 mm de diâmetro) dos 33 isolados de *Colletotrichum*, com cinco dias de incubação à temperatura de 25 ± 2 °C e sob luz contínua, foram transferidos individualmente para frascos de Erlenmeyer e cultivados em meio líquido de batata-dextrose durante cinco dias. A massa micelial produzida foi coletada e lavada com ADE retirando-se o excesso de umidade com lenço de papel. Foram tomadas amostras de 120 mg de micélio de cada isolado e depois liofilizadas durante 12 h.

A extração do DNA foi conduzida de acordo com o protocolo descrito por Faleiro *et al.* (2004) com modificações. As modificações constaram do aumento de 700 para 800 µl do tampão de lise e redução do tempo de incubação (70 °C) de uma hora para 30 min. Na desproteinização, a adição de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) passou de 600 para 700 µl e se estabeleceu o volume de retirada do sobrenadante para 700 µl.

Na precipitação do DNA, protocolo de Faleiro *et al.* (2004) modificado, foram adicionados ao sobrenadante final 14 µl de NaCl 5 M e 500 µl de isopropanol a -20 °C. Os tubos, depois de agitados por suaves inversões e mantidos a -20 °C por 2 h, foram centrifugados como descrito anteriormente. Descartou-se o sobrenadante e o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 300 µl de etanol 70 % (v/v) e seco à temperatura ambiente. Os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 150 µl de água, contendo

RNase na concentração de 40 µg/ml, e os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 1 h para a completa ressuspensão.

Na quantificação do DNA seguiu-se o protocolo de Faleiro *et al.* (2004).

As amostras de DNA dos 33 isolados foram amplificadas pela técnica de RAPD (Williams *et al.*, 1990). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl (pH 8,8) 75 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Tween 20 0,01 %, MgCl₂ 1,2 mM, 100 mM de cada um dos desoxinucleotídios trifosfato – dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de cada um dos dois primers de PCR, quatro unidades da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. Os pares de primers usados para identificação taxonômica foram do ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC com o do ITS1 GGGGAAGCCTCTCGCGG para *C. acutatum*, com o do ITS1 GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG para *C. gloeosporioides* e com o do ITS1 GCCGTCCCCTGAAAAG para *Colletotrichum* de *Passiflora* sp. (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, programado da seguinte forma: 94 °C por dois min; 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 35 °C por 30 s, 72 °C por 90 s; 72 °C por 7 min; e redução para 4 °C. Após a amplificação, cada amostra, depois da adição de 3 µl de uma mistura de azul bromofenol (0,25 %) e glicerol (60 %) em água, foi aplicada nos poços de um gel de agarose (1,2 %) submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética dos fragmentos foi realizada em 3 h, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta para evidenciar as bandas formadas.

Estudo da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* spp. em maracujá amarelo

Frutas sadias de maracujazeiro amarelo, em fase intermediária de maturação, procedentes de Petrolina, PE, foram lavadas com água e sabão, tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 1,5 %, por dois min, lavadas por duas vezes em água destilada esterilizada (ADE) e secas com papel toalha (Lima Filho *et al.*, 2003).

O inóculo, com cinco dias de incubação, constituiu-se de discos de cultura (6 mm de diâmetro) dos 33 isolados de *Colletotrichum* spp.

As frutas receberam ferimentos em quatro locais equidistantes um do outro, com um perfurador (cinco pontas, abrangendo 5 mm de diâmetro e profundidade de 2 mm) flambado e, sobre os ferimentos, depositou-se discos de culturas de isolados diferentes. Cada fruta foi colocada em câmara úmida por 48 h, constituída de um saco plástico contendo no interior gotículas de ADE. No tratamento testemunha foi colocado sobre o ferimento disco de BDA. As avaliações foram realizadas sete dias após a inoculação, medindo-se o diâmetro da lesão (DL), expresso em mm, com paquímetro, em dois sentidos perpendiculares. O reisolamento foi efetuado para comparar as colônias obtidas com aquelas utilizadas como inóculo. O desenho experimental foi inteiramente casualizado, com cinco frutas para cada isolado, que constituíram as repetições. Foi realizada a análise de variância dos dados e os isolados foram agrupados pelo teste de Scott-Knot ($P=0,05$), depois de verificada a homogeneidade da variância pelo teste de Bartlett.

Caracterização da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* spp. através da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares e pelo crescimento micelial

Discos de cultura (6 mm de diâmetro) de cada um dos 33 isolado de *Colletotrichum* spp., com cinco dias de crescimento em BDA, foram retirados da borda

das colônias e transferidos, individualmente, para o centro de placas de Petri, contendo um dos meios específicos às atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica, proteolítica e pectinolítica, e também ao crescimento micelial. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C e sob luz contínua. Os procedimentos adotados para testar a habilidade dos isolados em degradar amido, lipídio e pectina em meio ácido foram realizados conforme metodologia descrita por Hankin & Anagnostakis (1975), para degradar celulose por Neirotti & Azevedo (1988) e para degradar proteína por Barbosa (1998).

O crescimento micelial dos isolados foi avaliado em meio de cultura BDA, distribuído em placas de Petri. Depois da inoculação, o meio foi incubado durante seis dias.

Em cada ensaio utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, por tratamento. Os halos de degradação dos substratos e o crescimento micelial em BDA foram avaliados por duas medições perpendiculares, expressas em mm, com auxílio de régua milimetrada. Foi realizada a análise de variância dos dados e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knot ($P=0,05$). Também foi estudada a correlação destes dados com os de agressividade, usando-se o método de Pearson.

Caracterização da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* spp. com primers de RAPD

Para a identificação dos marcadores RAPD capazes de caracterizar a agressividade dos isolados de *Colletotrichum*, foi usada a mesma metodologia descrita no primeiro item de Material e Métodos. Foram tomadas alíquotas dos DNAs extraídos e no preparo das reações de amplificação foram utilizados 18 primers decâmeros, resultantes de uma seleção prévia: OPA-2, OPA-3, OPA-9, OPA-10, OPA-11, OPA-12,

OPA-13, OPH-4, OPH-5, OPH-7, OPH-8, OPH-9, OPH-15, OPH-18, OPM-15, OPN-4, OPN-14 e OPP-19 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA).

O estudo da associação de marcas moleculares com a característica fenotípica agressividade, foi realizado através da análise de regressão linear múltipla, da variável fenotípica em função das variáveis moleculares (marcadores RAPD), usando o método de seleção por etapa, o Stepwise – PROC REG (SAS Institute, 1998), com o nível de 1 % de probabilidade para inclusão e preservação das variáveis no modelo.

O estudo das distâncias genéticas foi realizado partindo-se da matriz 1 – índice de Jaccard (Cruz, 2000), constituída com a consideração das variáveis moleculares; utilizando a redução de dimensões por Multidimensional Scaling – MDS/SAS (SAS Institute, 1998); e através da representação gráfica por SAS G3D (SAS Institute, 1998), considerando como referencial para mostrar a dispersão dos isolados lesões superiores e inferiores a 12,00 mm estabelecidas pelo teste de Scott Knott.

Para o agrupamento dos isolados foi usado o procedimento Cluster Analyses (SAS Institute, 1998), modelo Centróide, a partir da matriz de distâncias 1 – índice de Jaccard (Cruz, 2000), construída com a consideração das variáveis moleculares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação específica de *Colletotrichum* isolado de maracujá amarelo com primers de PCR

A coleta de frutas com antracnose permitiu obter 33 isolados de *Colletotrichum*, dos quais 18 foram provenientes do Agreste, sete da Zona da Mata Sul e oito da Zona da Mata Norte.

Os DNAs dos isolados de *Colletotrichum* não reagiram com os primers de PCR marcadores para *C. acutatum* (Figura 1A) e *C. gloeosporioides* (Figura 1B), mas os DNAs dos isolados Cm1, Cm2, Cm4, Cm5, Cm6, Cm7, Cm8, Cm11, Cm12, Cm13, Cm14, Cm16, Cm17, Cm20, Cm23, Cm27, Cm28 e Cm29 reagiram com o primer marcador para *Colletotrichum* de *Passiflora* (Figura 1C), e por este motivo serão considerados como *Colletotrichum* sp., permanecendo os demais isolados sem identificação genética (Figura 1C). Resultados semelhantes foram obtidos por Afanador-Kafuri *et al.* (2003). Entretanto, as características morfológicas como coloração de colônia e forma de conídios dos isolados não identificados geneticamente, assemelharam-se às de *C. gloeosporioides*.

Além do primer de PCR marcador para *C. gloeosporioides* usado por Afanador-Kafuri *et al.* (2003), existe outro, também gerado do ITS1, com a seqüência GACCCTCCCGGCCTCCCGCC utilizado por Xiao *et al.* (2004) como marcador para isolados de *C. gloeosporioides* do morangueiro. Com base neste conhecimento, se for realizado um estudo do sequenciamento dos nucleotídeos da região ITS1-2 dos isolados que não reagiram com os três primers de PCR marcadores testados, pode revelar uma ou mais de uma seqüência que justifique a síntese de outros primers de PCR do ITS1 que seriam capazes de reagir com os isolados não identificados. Pode-se também comparar estas seqüências com aquelas de outras espécies de *Colletotrichum*, como fizeram Afanador-Kafuri *et al.* (2003) em estudos de identificação de espécies de *Colletotrichum* de diversos hospedeiros.

Estudo da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* spp. em maracujá amarelo

Os 33 isolados de *Colletotrichum* spp., que englobam os isolados identificados geneticamente como *Colletotrichum* sp. e os outros isolados não identificados, quando

inoculados em maracujá amarelo mostraram agressividade variada, através de lesões com diâmetros estatisticamente diferentes, o suficiente para separá-los em dois grupos de agressividade: alta (GA-1) e baixa (GA-2) (Tabela 1). O gênero *Colletotrichum* é notoriamente variável em relação a determinadas características (Bryson *et al.*, 1992) e a agressividade é uma delas, demonstrada com diversas espécies como *C. graminicola* (Ces.) Wilson, na cultura do sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Costa *et al.*, 2003) e *C. gloeosporioides*, em cebola, *Allium cepa* L. (Assunção, 1997).

Quanto à origem, foram encontrados isolados provenientes de cada uma das regiões amostradas, nos dois grupos de agressividade (Tabela 1). Assunção (1997) também não detectou agressividade diferenciada em isolados de *C. gloeosporioides*, da cebola, com relação às suas origens, assim como Lima & Chaves (1992) não observaram relação entre a virulência dos isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, do algodoeiro, e suas respectivas origens geográficas.

As culturas reisoladas foram iguais àquelas usadas como inóculo. Tanto nas frutas inoculadas como em meio de cultura o isolado Cm5, originário da Zona da Mata Norte, e os isolados Cm11, Cm15, Cm16, Cm18, Cm21 e Cm23, originários do Agreste, produziram peritécios, que evidencia o homotalismo, e os outros isolados produziram acérvulos, que faz supor o heterotalismo. Nenhum isolado da Zona da Mata Sul produziu peritécio e, possivelmente, são heterotáticos. Tanto os isolados teleomórficos como os anamórficos apresentaram-se nos dois grupos de agressividade (Tabela 1). A reprodução sexuada e a recombinação constituem o principal fator que contribui para a variabilidade genética observada em populações de fungos, como a de *C. gloeosporioides* (Freeman *et al.*, 1998). Entretanto, Casela *et al.* (1996) têm demonstrado a alta variabilidade de *C. graminicola* em sorgo, apesar de reconhecerem que a reprodução deste patógeno seja predominantemente assexuada.

Caracterização da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* spp. através da produção de enzimas hidrolíticas e do crescimento micelial

Todos isolados apresentaram atividade enzimática hidrolítica extracelular para degradação de amido, cujo halo se apresentou translúcido com coloração amarelada em torno da colônia; para degradação da celulose, na forma de halo opaco e estreito em torno da colônia; para a degradação de proteína, como halo translúcido em torno da colônia; e, a exceção do isolado Cm19, um possível mutante, todos os outros degradaram lipídio, cujo halo em torno da colônia se evidenciou na forma de precipitado. Houve diferença estatística na produção de enzimas entre isolados, os quais foram agrupados de acordo com o diâmetro dos halos desenvolvidos, nos respectivos meios específicos (Tabela 2). Entretanto a metodologia usada neste trabalho não permitiu a detecção da atividade pectinolítica.

Lima Filho *et al.* (2003) observaram que os isolados de *Colletotrichum* de cinco fruteiras, incluindo o maracujá, apresentaram atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica, que variaram estatisticamente entre os isolados. Couto *et al.* (2002) obtiveram resultados semelhantes com *C. musae* da banana.

Assis (2001) observou diferença entre isolados de *C. gloeosporioides*, da manga, *Mangifera indica* L., quanto à atividade amilolítica e proteolítica, mas não para a celulolítica, devido possivelmente ao curto período de incubação usado, que foi de cinco dias, isto porque Lima (2000) conseguiu demonstrar que *C. graminicola* do milho, *Zea mays* L., apresentou esta atividade 15 dias após incubação. No presente trabalho, *C. gloeosporioides* apresentou atividade celulolítica cinco dias após incubação, embora com halo pequeno, mas suficiente para caracterização dos isolados.

No estudo do crescimento micelial em BDA, os isolados se comportaram estatisticamente diferentes e foram agrupados pelo tamanho da colônia (Tabela 3). Lima & Chaves (1992) também encontraram resultados semelhantes com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* do algodoeiro.

Os halos de degradação do amido, lipídio e proteína, e o crescimento micelial correlacionaram-se negativamente com agressividade, cujos respectivos coeficientes de correlação (r) foram -0,27110, -0,25472, -0,29296, -0,30107, embora o halo de degradação da celulose não tenha se correlacionado ao apresentar $r = -0,07118$. Porém, os valores de r foram demasiadamente baixos e não permitiram o desenvolvimento de modelos que ajudassem explicar o tamanho da lesão no maracujá amarelo, em função do tamanho do halo de degradação em um meio específico ou pelo tamanho da colônia em BDA. O valor de 48,6 % do CV no teste de agressividade pode ter contribuído para os baixos valores de r , embora o teste de Bartlett tenha mostrado a homogeneidade das variâncias. Em experimentos futuros, recomenda-se aumentar o número de repetições para reduzir o valor do CV.

Couto *et al.* (2002) encontraram correlação positiva, r (Pearson) = 0,8072, entre a atividade amilolítica e o tamanho das lesões causadas pelos isolados de *C. musae*. Outro resultado conflitante com aqueles obtidos no presente trabalho, foi a correlação positiva observada por Lima & Chaves (1992), entre crescimento micelial de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e o índice de doença no algodoeiro. A diferença entre as estratégias da patogênese de cada uma destas espécies talvez possa explicar esse conflito de resultados, visto que a espécie *C. gloeosporioides* exibe infecção inicial biotrófica intercelular, que pode se manifestar como hemibiotrófica intracelular, intramural subcuticular e também estes dois tipos de infecção, a depender da cultura hospedeira. A fase necrotrófica, responsável pelo desenvolvimento dos sintomas,

envolve o crescimento extensivo através do tecido do hospedeiro, no interior das células, nas paredes celulares e através delas, e no espaço intercelular. Todas as espécies de *Colletotrichum* produzem uma faixa ampla de enzimas, capazes de destruir os componentes estruturais dos tecidos da planta e algumas enzimas que podem matar as células (Bailey *et al.*, 1992). O fungo atua na busca por nutrientes, degradando várias substâncias como celulose, lipoproteínas, e entre outras o amido, para atender aos requerimentos exigidos às suas atividades fisiológicas. É nesta fase que pode haver diferenças entre as espécies, no requerimento de amido, para o desenvolvimento da patogênese. Esta explicação também é válida para o crescimento micelial, uma vez que o meio utilizado continha amido de batata.

De acordo com Bailey *et al.* (1992), as enzimas que degradam polímeros de pectina atuam no estabelecimento das infecções de espécies de *Colletotrichum* e no maceramento dos tecidos. A ausência de atividade pectinolítica dos isolados de *Colletotrichum* spp. do maracujá amarelo é um indicativo de que a metodologia usada neste trabalho não tenha sido adequada para detectar a atividade enzimática pectinolítica do patógeno.

Caracterização da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* spp. com primers de RAPD

As reações dos 18 primers selecionados com os 33 DNAs dos isolados geraram 250 bandas polimórficas, as quais permitiram estabelecer dois grupos de isolados, diferentes geneticamente (Tabela 4). Os isolados Cm17, Cm18 e Cm30, apesar de pertencerem ao GA-1, foram agrupados geneticamente com aqueles do GA-2 agressividade baixa. Por outro lado, os isolados Cm2, Cm27, Cm29 e Cm9 do GA-2 agruparam-se geneticamente com os isolados do GA-1. No estudo das distâncias

genéticas (Figura 2), observou-se que quatro isolados do GA-2 encontraram-se próximos do GA-1 e três isolados do GA-1 estavam próximos do GA-2. Entretanto, de modo geral, os isolados do GA-1 apresentaram-se mais próximos entre si do que os isolados do GA-2. A separação dos 33 isolados em dois grupos diferentes geneticamente confirma a diversidade genética de *C. gloeosporioides*, também observada por Assis (2001) em isolados de manga e por Assunção (1997) em isolados de cebola.

O polimorfismo das bandas não foi suficiente para separar os isolados em grupos por origem (Tabela 4). Este mesmo resultado foi obtido por Assunção (1997), embora Swart (1999) tenha conseguido agrupar isolados de *C. gloeosporioides* de diferentes áreas de produção com base em padrões de bandas de RAPD.

A busca de um modelo que pudesse explicar a agressividade através de marcadores RAPD, usando análise de regressão do tipo stepwise, evidenciou três marcadores que, juntos, explicam 73,3 % da agressividade, visto que o R^2 acumulado foi 0,733 (Tabela 1).

O primeiro marcador, observado na posição 14 no gel de agarose (Figura 3A), foi gerado pela reação do primer OPA-9 com os DNAs dos isolados Cm17, Cm20, Cm19, Cm3, Cm1, Cm12, Cm10, Cm13, Cm31, Cm23, Cm6, Cm32 (GA-1), Cm2, Cm27 e Cm29 (GA-2), e apresentou $R^2 = 0,506$ (Tabela 4), explicando 50,6 % do modelo matemático para agressividade. Porém este marcador ao excluir os isolados Cm18 e Cm30 (AG-2), possibilitou a caracterização de 85,7 % dos isolados do GA-1, com um erro de 15,7 % ao caracterizar como pertencentes ao GA-1 três isolados do GA-2. A exclusão de dois isolados do GA-1 e a inclusão de três isolados do GA-2 na caracterização de isolados do GA-1 não teria muita importância em um programa de

melhoramento, visto que os valores das lesões causadas por estes isolados estão próximos do menor valor de lesão causado pelo isolado do GA-1.

O segundo marcador, detectado na posição nove no gel de agarose (Figura 3B), foi produzido pela reação do primer OPN-14 com os DNAs dos isolados Cm15 e Cm22 (GA-2), e apresentou $R^2=0,139$, fazendo com que o modelo matemático explicasse 64,5 % da agressividade. Entretanto, estes dois isolados foram caracterizados como pertencentes ao GA-2 pelo primeiro marcador. Dessa forma ficou demonstrado que o segundo marcador não contribuiu para melhorar o desempenho do primeiro marcador.

O terceiro marcador, identificado na posição sete no gel (Figura 3C), foi gerado pela reação do primer OPH-18 com os DNAs dos isolados Cm17, Cm18, Cm30, Cm7, Cm15, Cm25, Cm22, Cm8, Cm16, Cm26, Cm11, Cm5 e Cm21, e gerou $R^2 = 0,088$, contribuindo para o modelo matemático explicar 73,3 % da agressividade. Este marcador teve como principal desvantagem caracterizar os isolados Cm17, Cm18 e Cm30 como pertencentes ao GA-2, quando de fato pertencem ao GA-1, principalmente o isolado Cm17 que é o mais agressivo.

Nenhum outro marcador contribuiu para melhorar o desempenho do primeiro marcador, na tentativa de caracterizar os isolados quanto a agressividade, ficando descartado o uso do modelo matemático para explicar a agressividade com uso dos marcadores de RAPD testados. Marcadores de RAPD foram eficientes para caracterizar isolados agressivos como os de *Fusarium graminearum* Schwabe do trigo, *Tritium aestivum* L., e do triticale, híbrido de *Tritium* sp. X *Secale cereale* L. (Angelotti *et al.*, 2004), de *Alternaria macrospora* Zimerrmm. do algodoeiro (Cassetari Neto *et al.*, 2003) e de *S. sapinea* de coníferas (Blodgett & Stanosz, 1999), mas não permitiram caracterizar isolados agressivos de *C. gloeosporioides* de manga e da cebola (Assis, 2001; Assunção, 1997).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. José L. Pires e ao matemático Lindolfo P. dos Santos Filho, pela ajuda nas análises estatísticas, à Dra. Karina P. Gramacho e ao Dr. Jorge T. de Souza, pelas sugestões nos ensaios com marcadores RAPD, ao Dr. José L. Bezerra, pela revisão do manuscrito, às biólogas Rita de Cássia S. Bahia, Acassi B. Flores e Brena F. Santos e ao laboratorista Reinaldo F. dos Santos, pela ajuda nos trabalhos com RAPD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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* 93:579-587. 2003.
- ANGELOTTI, F., TESSMANN, D.J., VIDA, J.B., ALVES, T.C.A., SOUTO, E.R. & HARAKAVA, R. Variabilidade genética e patogênica de isolados de *Fusarium graminearum* do trigo e triticales do Sul do Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 29:S127-S128. 2004. (Resumo).
- ASSIS, T.C. de. Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose da mangueira, quanto a utilização de carboidratos, patogenicidade, produção de enzimas e análise de RAPD. (Dissertação de Mestrado). Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2001.
- ASSUNÇÃO, I.P. Identificação de fontes de resistência em cultivares de cebola (*Allium cepa* L.) e análise da variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. &

Sacc. (Sensu Arx, 1957) assistida por marcadores moleculares. (Dissertação de Mestrado). Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1997.

BAILEY, J.A., O' CONNELL, R.J., PRING, R.J. & NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Ed.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford. CABI. 1992. pp. 88-120.

BARBOSA, M.A.G. *Cladosporium herbarum*, agente da verrugose do maracujazeiro (*Passiflora edulis*, Sims.): interações com *Trichoderma* spp. e estudo comparativo da atividade enzimática do fitopatógeno e antagonistas. (Dissertação de Mestrado). Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1998.

BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. *Summa Phytopathologica* 25:90-93. 1999.

BLODGETT, J.T. & STANOSZ, G.R. Differences in aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* marker group isolates on several conifers. *Plant Disease* 83:853-856, 1999.

BRYSON, R.J., CATEN, C.E., HOLLOMON, D.W. & BAILEY, J.A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Ed.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford. CABI. 1992. pp. 27-46.

CASELA, C.R., FERREIRA, A.S. & BRANÇÃO, N. Variabilidade e estrutura de virulência em *Colletotrichum graminicola* em sorgo. *Fitopatologia Brasileira* 21:357-361. 1996.

CASSETARI NETO, D., MEHTA, Y.R., CIA, E., PIZZINATTO, M.A., TEIXEIRA, E.A. & CUNHA, H. F. Variabilidade genética entre isolados de *Alternaria macrospora* do algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 28:S274. 2003. (Resumo).

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42:225-226. 1939.

- COSTA, R.V., CASELA, C. R., ZAMBOLIM, L. & FERREIRA, A.S. A antracnose do sorgo. *Fitopatologia Brasileira* 28:345-354. 2003.
- COUTO, E.F., MENEZES, M. & COELHO, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. *Summa Phytopathologica* 28:260-266. 2002.
- CRUZ, C.D. Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa. UFV. 2000.
- DENOYES-ROTHAN, B., GUÉRIN, G. DÉLYE, C., SMITH, B., MINZ, D., MAYMON, M. & FREEMAN, S. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathology* 39:219-228. 2003.
- DENOYES-ROTHAN, B., LAFARGUE, M. & GUÉRIN, G. Fruit resistance to *Colletotrichum acutatum* in strawberries. *Plant Disease* 83:549-553. 1999.
- FALEIRO, F.G., LUZ, E.D.M.N., CERQUEIRA, A.O., ROCHA, C.S.S., DANTAS NETO, A., FLORES, A.B., BAHIA, R.C.S. & FALEIRO, A.S.G. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauzeiro com base em marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 29:303-306. 2004
- FREEMAN, S., KATAN, T. & SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605. 1998.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607. 1975.
- JUNQUEIRA, N.T.V. Manejo integrado de doenças do maracujazeiro, da mangueira, da goiabeira e das anonáceas. In: Zambolim, L. (Ed.). Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas. Viçosa, MG. 2002. pp. 239-277.

- LIBERATO, J.R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R. do; Monteiro, A.J.A.; Costa, H. (Eds.). Controle de doenças de plantas: Fruteiras. Viçosa, MG. 2002. pp. 699-825.
- LIMA, E.F. & CHAVES, G.M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Fitopatologia Brasileira 17:61-66. 1992.
- LIMA, M.L.F. Caracterização patogênica, fisiológica e enzimática de isolados de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson, agente causal da antracnose do milho, *Zea mays* L. (Dissertação de Mestrado). Recife, Universidade Federal de Pernambuco. 2000.
- LIMA FILHO, R.M., OLIVEIRA, S.M.A. & MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. Fitopatologia Brasileira 28:620-625. 2003.
- MANNERS, J.M., MASEL, A., BRAITHWAITE, K.S. & IRWIN, J.A.G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Ed.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford. CABI. 1992. pp.250-268.
- MATTA, E.A.F.da. Doenças do maracujazeiro no estado da Bahia. Salvador:EPABA. Circular Técnica, 2. 1982.
- MUNAUT, F., HAMAIDE, N. STAPPEN, J.V. & MAREITE, H. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. Plant Pathology 47:641-648. 1998.
- NEIROTTI, E. & AZEVEDO, J.L. Técnica semiquantitativa de avaliação de produção de celulasas em *Humicola* sp. Revista de Microbiologia 19:78-81. 1988.
- PERUCH, L.A.M. Controle integrado da antracnose no maracujá amarelo. (Dissertação de Mestrado). Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 1998.

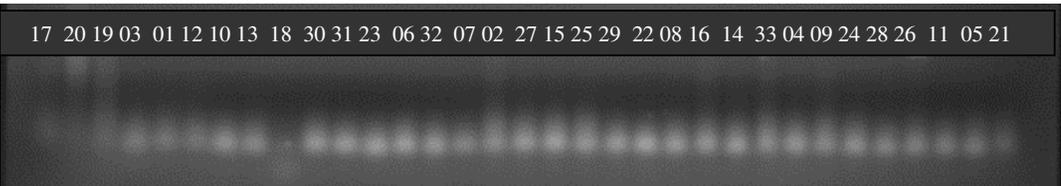
- RAVA, C.A., PERCHIO, A.F. & SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatologia Brasileira* 19:167-172. 1994.
- REGO, A.M., MAFFIA, L.A. & ALFENAS, A.C. Reação de germoplasma de melancia (*Citrullus lanatus*) e melão (*Cucumis melo*) a *Colletotrichum orbiculare*. *Fitopatologia Brasileira* 20:48-55. 1995.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT User's guide. Release 6.03. Cary, N.C. SAS Institute Inc. 1998.
- SILVA, A.P. da & DURIGAN, J.F. Colheita e conservação pós-colheita do maracujá. *Informe Agropecuário* 21:67-71. 2000.
- SWART, G.M. Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango. (Tese de Doutorado). Pretoria, University of Pretoria. 1999.
- TEIXEIRA, C.G. Cultura. In: Instituto de Alimentos. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2ª ed. Campinas. ITAL/IPEA. 1995. pp. 1-42 (Série Frutas Tropicais, 9).
- TRINDADE, C.C., TRINDADE, D.R., POLTRONIERI, L.S., ALBUQUERQUE, F.C. & LUCAS, B.L.L. Doenças do maracujazeiro no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 25:346-347. 2000 (Resumo).
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J. RAFALSKI, L.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535. 1990.
- WULFF, N.A., ALQUINI, Y. & LEITE, B. Observações histopatológicas, espectrofotométricas e atividade de peroxidase em plantas de maracujá inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* (patógeno) e *Colletotrichum graminicola* (não patógeno). *Fitopatologia Brasileira* 19:287-288. 1994. (Resumo).

XIAO, C.L., MACKENZIE, S.J. & LEGARD, D.E. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. *Phytopathology* 94:446-453. 2004.

A - Primer ITS 1 (5' – GGGGAAGCCTCTCGCGG – 3')



B - Primer ITS 1 (5' – GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG – 3')



C - Primer ITS 1 (5' – GCCGTCCCCTGAAAAG – 3')

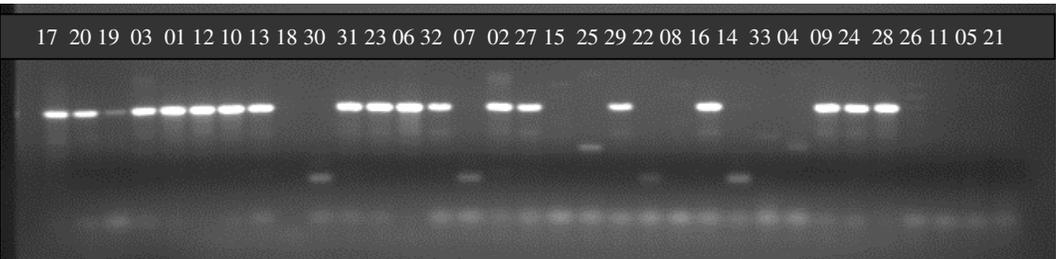


Fig 1 – Resultado das reações dos DNAs de 33 isolados de *Colletotrichum* spp. com primers de PCR marcadores para: **A** - *Colletotrichum. acutatum*; **B** – *Colletotrichum. gloeosporioides*; e **C** – *Colletotrichum* de *Passiflora*

TABELA 1 – Agrupamento de isolados de *Colletotrichum* spp., provenientes de três regiões do estado de Pernambuco, pela agressividade em maracujá amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, expressa pelo diâmetro da lesão. Outubro de 2002.

Isolado	Região de origem ¹	Diâmetro de lesão ² (mm)	Grupo de agressividade
Cm17	AGR	19,10 ³ a	1
Cm20	AGR	18,46 a	1
Cm19	AGR	17,52 a	1
Cm03	ZMS	17,08 a	1
Cm01	ZMS	16,68 a	1
Cm12	AGR	16,32 a	1
Cm10	ZMS	16,02 a	1
Cm13	AGR	15,28 a	1
Cm18	AGR	14,92 a	1
Cm30	ZMN	14,42 a	1
Cm31	ZMN	14,06 a	1
Cm23	AGR	13,44 a	1
Cm06	ZMN	13,32 a	1
Cm32	ZMS	12,66 a	1
Cm07	ZMN	11,78 b	2
Cm02	ZMS	11,74 b	2
Cm27	AGR	11,54 b	2
Cm15	AGR	11,20 b	2
Cm25	AGR	11,20 b	2
Cm29	ZMN	10,90 b	2
Cm22	AGR	10,80 b	2
Cm08	ZMN	10,32 b	2
Cm16	AGR	10,14 b	2
Cm14	AGR	10,12 b	2
Cm33	ZMS	9,70 b	2
Cm04	ZMN	9,64 b	2
Cm09	ZMS	9,00 b	2
Cm24	AGR	8,82 b	2
Cm28	AGR	7,72 b	2
Cm26	AGR	7,70 b	2
Cm11	AGR	6,64 b	2
Cm05	ZMN	6,12 b	2
Cm21	AGR	3,88 b	2

¹ AGR=Agreste, ZMS=Zona da Mata Sul, ZMN=Zona da Mata Norte;

² Média de cinco repetições;

³ Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott (P=0,05). CV=48,6 %

TABELA 2 – Atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica de *Colletotrichum* sp. em substratos sólidos específicos.

Atividade							
Amilolítica ¹		Celulolítica ²		Lipolítica ³		Proteolítica ⁴	
Isolado	Halo ⁵ (mm)	Isolado	Halo ⁵ (mm)	Isolado	Halo ⁵ (mm)	Isolado	Halo ⁵ (mm)
Cm16	54,9 A	Cm22	6,6 A	Cm08	46,7 A	Cm11	59,6 A
Cm15	52,4 B	Cm17	5,3 B	Cm33	46,4 A	Cm16	58,3 A
Cm11	51,9 B	Cm24	4,9 C	Cm11	45,6 A	Cm18	58,2 A
Cm18	51,3 B	Cm23	4,8 C	Cm14	45,4 A	Cm08	58,0 A
Cm25	50,6 C	Cm21	4,7 C	Cm18	45,0 B	Cm05	57,2 B
Cm08	49,8 C	Cm03	4,6 C	Cm16	44,9 B	Cm21	56,5 B
Cm05	48,6 D	Cm30	4,6 C	Cm05	44,2 B	Cm23	55,5 B
Cm26	48,3 D	Cm11	4,2 D	Cm15	43,9 B	Cm26	53,0 C
Cm25	47,9 D	Cm07	4,0 D	Cm21	43,4 C	Cm25	52,4 C
Cm33	47,4 D	Cm15	4,0 D	Cm30	43,4 C	Cm15	52,2 C
Cm30	46,8 E	Cm18	4,0 D	Cm23	43,0 C	Cm33	49,5 D
Cm04	46,3 E	Cm25	4,0 D	Cm28	42,9 C	Cm30	48,0 E
Cm21	46,3 E	Cm04	3,7 D	Cm07	42,4 C	Cm04	47,2 E
Cm07	44,7 F	Cm31	3,7 D	Cm22	42,4 C	Cm07	45,2 F
Cm14	44,5 F	Cm05	3,5 E	Cm26	42,4 C	Cm28	44,0 F
Cm22	44,5 F	Cm06	3,4 E	Cm25	40,6 D	Cm14	43,6 F
Cm28	41,2 G	Cm08	3,4 E	Cm04	39,5 D	Cm22	41,4 G
Cm17	38,8 H	Cm26	3,4 E	Cm17	39,4 D	Cm17	38,6 H
Cm20	34,8 I	Cm16	3,3 E	Cm02	37,7 E	Cm03	35,8 I
Cm31	34,6 I	Cm14	3,2 E	Cm06	37,4 E	Cm31	34,6 I
Cm29	34,2 I	Cm13	2,5 F	Cm01	36,5 F	Cm01	31,1 J
Cm27	34,1 I	Cm20	2,5 F	Cm32	36,0 F	Cm10	30,9 J
Cm13	33,5 I	Cm29	2,5 F	Cm03	35,9 F	Cm09	30,4 J
Cm12	32,7 J	Cm27	2,4 F	Cm24	34,8 G	Cm06	30,0 K
Cm10	31,8 J	Cm12	2,3 F	Cm20	34,4 G	Cm32	29,9 K
Cm24	31,8 J	Cm01	2,1 G	Cm31	34,3 G	Cm20	29,6 K
Cm09	31,3 J	Cm32	2,1 G	Cm10	33,9 G	Cm02	29,0 K
Cm19	30,5 K	Cm19	2,0 G	Cm09	33,7 G	Cm13	28,9 K
Cm03	29,8 K	Cm02	1,9 G	Cm29	33,5 G	Cm12	28,0 L
Cm02	29,3 L	Cm09	1,9 G	Cm13	32,9 H	Cm27	28,0 L
Cm06	28,4 L	Cm33	1,8 G	Cm12	32,7 H	Cm19	27,6 L
Cm01	26,3 M	Cm10	1,7 G	Cm27	30,9 I	Cm24	27,3 L
Cm32	23,2 N	Cm28	1,7 G	Cm19	0,0 J	Cm29	26,5 L

¹ CV 2,8 %;

² CV 11,6 %;

³ CV 3,0 %;

⁴ CV 2,9 %;

⁵ Média resultante de cinco repetições; valores acompanhados com mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (p=0,05).

TABELA 3 – Crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. em meio de BDA, seis dias após inoculação.

Isolado	Diâmetro da colônia¹ (mm)	Isolado	Diâmetro da colônia¹ (mm)
Cm21	83,6 a	Cm17	62,3 d
Cm08	82,7 a	Cm31	58,5 e
Cm33	82,2 a	Cm01	55,4 f
Cm18	81,7 a	Cm03	55,4 f
Cm05	81,4 a	Cm12	55,0 f
Cm15	81,1 a	Cm02	54,6 f
Cm16	81,1 a	Cm06	54,6 f
Cm23	80,7 a	Cm20	54,3 f
Cm11	80,2 a	Cm27	53,0 g
Cm14	79,6 b	Cm19	52,6 g
Cm22	79,5 b	Cm24	52,6 g
Cm26	78,0 b	Cm09	52,4 g
Cm07	76,9 b	Cm10	51,9 g
Cm25	76,8 b	Cm13	51,8 g
Cm30	70,9 c	Cm29	51,0 g
Cm04	70,6 c	Cm32	46,2 h
Cm28	63,5 d		

¹ Média de cinco repetições; CV 4,1 %; valores acompanhados com mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Scott Knott (p=0,05)

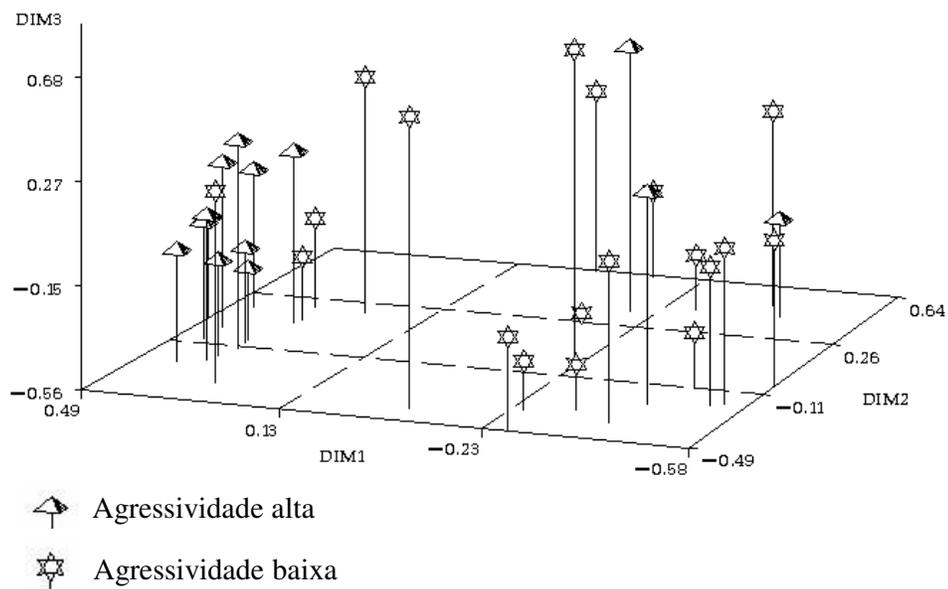


FIG 2 – Distâncias entre 33 isolados de *Colletotrichum* spp. determinadas pelo método Multidimensional Scaling, utilizando 250 marcadores RAPD e agressividade referencial com diâmetro de lesão superior a 12,00 mm.

TABELA 4 - Agrupamento de isolados de *Colletotrichum* spp., pela agressividade em maracujá amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, e pelo caráter genético e caracterização da agressividade com marcadores RAPD.

Isolado	Diâmetro de lesão ¹ (mm)	Grupo de agressividade	Grupo genético ²	Marcador ³		
				A9P14 ⁴	N14P9 ⁵	H18P7 ⁶
Cm17	19,10	1	2	1	0	1
Cm20	18,46	1	1	1	0	0
Cm19	17,52	1	1	1	0	0
Cm03	17,08	1	1	1	0	0
Cm01	16,68	1	1	1	0	0
Cm12	16,32	1	1	1	0	0
Cm10	16,02	1	1	1	0	0
Cm13	15,28	1	1	1	0	0
Cm18	14,92	1	2	0	0	1
Cm30	14,42	1	2	0	0	1
Cm31	14,06	1	1	1	0	0
Cm23	13,44	1	1	1	0	0
Cm06	13,32	1	1	1	0	0
Cm32	12,66	1	1	1	0	0
Cm07	11,78	2	2	0	0	1
Cm02	11,74	2	1	1	0	0
Cm27	11,54	2	1	1	0	0
Cm15	11,20	2	2	0	1	1
Cm25	11,20	2	2	0	0	1
Cm29	10,90	2	1	1	0	0
Cm22	10,80	2	2	0	1	1
Cm08	10,32	2	2	0	0	1
Cm16	10,14	2	2	0	0	1
Cm14	10,12	2	2	0	0	0
Cm33	9,70	2	2	0	0	0
Cm04	9,64	2	2	0	0	0
Cm09	9,00	2	1	0	0	0
Cm24	8,82	2	2	0	0	0
Cm28	7,72	2	2	0	0	0
Cm26	7,70	2	2	0	0	1
Cm11	6,64	2	2	0	0	1
Cm05	6,12	2	2	0	0	1
Cm21	3,88	2	2	0	0	1

¹ Média de cinco repetições;

² Baseado em marcadores RAPD, com uso do programa Cluster Analysis;

³ Banda produzida pela reação dos primers OPA-9, OPN-14 e OPH-18 com os DNAs dos isolados, detectadas em gel de agarose nas posições 14, 9 e 7, respectivamente; 1, presença de banda e 0, ausência;

⁴ R^2 0,506 e Prob > F 0,0001, na regressão Step Wise;

⁵ R^2 0,645 e Prob > F 0,0001, na regressão Step Wise, incluindo A9P14;

⁶ R^2 0,733 e Prob > F 0,0001, na regressão Step Wise, incluindo A9P14 e N14P9.

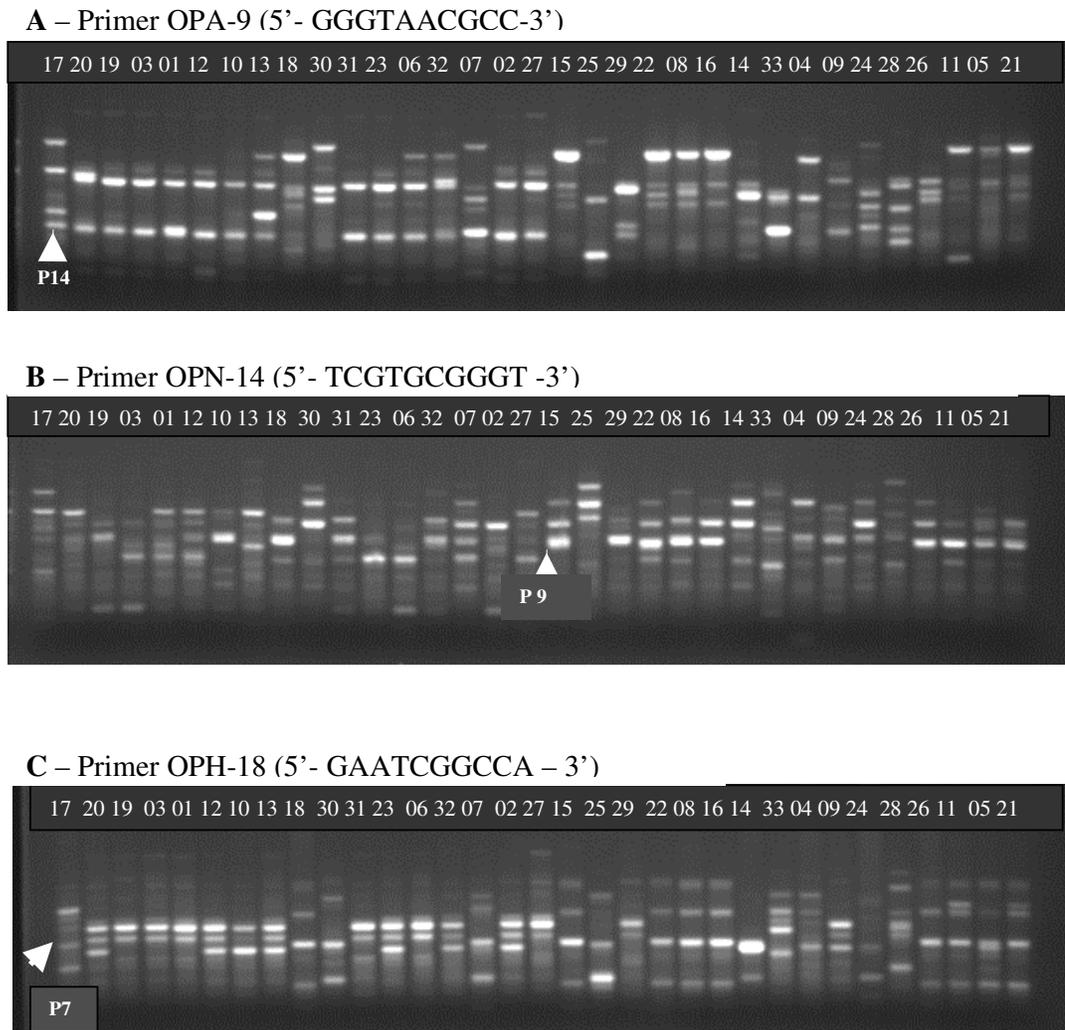


FIG. 3 – Produtos de amplificação de DNA genômico de 33 isolados de *Colletotrichum* spp. com primers de RAPD: **A** – OPA-9, bandas marcadoras na posição 14 do gel de agarose (seta), que caracterizam os isolados 17, 20, 19, 03, 01, 12, 10, 13, 31, 23, 06, 32, 02, 27 e 29; **B** – OPN-14, bandas marcadoras na posição 9 (seta), que caracterizam os isolados 15 e 22; **C** – OPH-18, bandas marcadoras na posição 7 (seta), que caracterizam os isolados 17, 18, 30, 07, 15, 25, 22, 08, 16, 26, 11, 05 e 21.

Efeito de indutores químicos no controle da antracnose do
maracujá amarelo

CAPÍTULO 3

**EFEITO DE INDUTORES QUÍMICOS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE
DO MARACUJÁ AMARELO ***

LUIZ C. C. DE ALMEIDA^{1} & RILDO S. B. COELHO²**

¹ Seção de Fitopatologia, Cepec/Ceplac, Cx. Postal 7, CEP 45600-970, Itabuna, BA,
fax: (73) 214-3204, e-mail: cordeirolc@yahoo.com.br; ²Fitossanidade/Departamento de
Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bairro Dois Irmãos, CEP
52171-900, Recife, PE, fax: (81) 3302-1205, e-mail: sartori@hotlink.com.br

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Luiz C. Cordeiro de Almeida.

ALMEIDA, L.C.C. & COELHO, R.S.B. Efeito de indutores químicos no controle da
antracnose do maracujá amarelo. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

Uma das doenças mais importantes do maracujá amarelo é a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Foram testados como indutores de resistência sistêmica o acibenzolar-S-metil (ASM), o ácido DL-β-amino-n-butírico (BABA) e o jasmonato

*Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco (2005)

**Bolsista do CNPq e pesquisa financiada pela UFRPE e CNPq.

metílico (JM) para a expressão de genes de defesa, objetivando reduzir as perdas de frutas provocadas por esta doença. ASM e JM, nas concentrações de 12,5; 25,0; 50,0; e 100,0 ppm, e BABA, nas concentrações de 50; 100; 500; e 1000 ppm, não reduziram a germinação de conídios de *Colletotrichum* sp., mas BABA e JM parece ter efeito contrário. O crescimento micelial foi reduzido por ASM e JM e estimulado por BABA. A imersão de maracujá amarelo em suspensões de ASM (100 ppm), JM (100 ppm) e BABA (1000) e também em água, seguida de inoculação com *Colletotrichum* sp. 24 horas após, não resultou em controle da doença.

Palavras-chave adicionais: acibenzolar-S-metil, ácido DL- β -amino-n-butírico, jasmonato metílico e resistência sistêmica adquirida.

ABSTRACT

Effect of chemical inducers on anthracnose disease control of post harvested yellow passion fruits.

The most important post harvest disease of the yellow passion fruit is anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Acibenzolar-S-methyl (ASM), DL- β -amino-n-butyric acid (BABA) and methyl jasmonato (MJ) chemical inducers were tested to induce systemic resistance through activation of defenses genes, aiming to reduce losses caused by anthracnose disease. ASM and MJ, at 12.5, 25.0, 50.0 and 100.0 ppm concentrations, and BABA, at 50, 100, 500 and 1000 ppm concentrations, did not reduce *Colletotrichum* conidia germination, but BABA and MJ probably they stimulated conidia germination. The micelial growth was reduced by ASM and MJ and was stimulated by BABA. Yellow passion fruits immersed in ASM (100 ppm), BABA (1000) and MJ (100 ppm) suspensions and also immersed in water, followed by *Colletotrichum* sp. inoculation 24 hours after treatment, did not control the disease.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro amarelo *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg., espécie mais cultivada no Brasil (Trindade *et al.*, 2000), é suscetível à antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Liberato, 2002) e por *Colletotrichum* sp. (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003), em áreas onde as condições climáticas são favoráveis ao patógeno (Matta, 1982), apesar das recomendações de manejo na pré-colheita (Junqueira, 2002). Na pós-colheita, embora exista pacote tecnológico para o manejo, esta doença é a mais importante (Silva & Durigan, 2000), visto que os sintomas, na forma de manchas ou de podridões (Peruch, 1998), se manifestam de infecções quiescentes provenientes da pré-colheita (Benato, 1999), levando frutas ao descarte (Teixeira, 1995).

O emprego da resistência genética, para reduzir perdas, tem merecido destaque dentro do manejo de doenças (Talamini *et al.*, 2004), embora a obtenção dos resultados seja de médio a longo prazo. Entretanto, as plantas possuem mecanismos eficientes de resistência que podem ser acionados ou ativados quando em contato com indutores (Romeiro, 1999), cuja expressão pode demorar de sete horas até 10 semanas (Oostendorp *et al.*, 2001; Sticher *et al.*, 1997). A redução na suscetibilidade a futuras infecções é conhecida como resistência sistêmica adquirida (RSA), que ocorre no local da indução ou em tecidos localizados em outras partes da planta (Delaney, 1997; Sticher *et al.*, 1997). Uma vez ativada a resposta de defesa natural, a proteção pode durar várias semanas e atuar contra uma faixa ampla de organismos invasores, como bactérias, fungos, nematóides e vírus, conferindo proteção quantitativa (Sticher *et al.*, 1997).

A resistência das plantas pode ser ativada por indutores bióticos e abióticos (Oostendorp *et al.*, 2001), existindo entre os abióticos os indutores físicos e químicos

(Sticher *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1994). Os mais usados, pela disponibilidade no comércio, são os químicos sintéticos (Oostendorp *et al.*, 2001; Sticher *et al.*, 1997).

A aplicação do indutor acibenzolar-S-metil (ASM) e tratamento hidrotérmico de mamão, *Carica papaya* L., reduziram o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*, cujo resultado foi superior ao observado com aplicação de thiabendazole e tratamento hidrotérmico (Benato *et al.*, 2002). Em tomateiro, *Lycopersicon esculentum* L., o ASM reduziu significativamente a severidade da requeima, pinta preta, septoriose e mancha bacteriana, além de aumentar a produção e qualidade das frutas (Castro, *et al.*, 2001). O indutor jasmonato metílico (JM) quando aplicado durante três dias na forma volátil protegeu plântulas de abeto, *Picea abies* (L.) Karst. em até 75 % das infecções causadas por *Pythium ultimum* Trow. (Kozłowski *et al.*, 1998) e o jasmonato aplicado no solo na forma líquida controlou a murcha e a morte de plântulas de *Arabidopsis*, causada por *P. mastophorum* Drechs. (Vijayan *et al.*, 1998). O uso do indutor ácido DL- β -amino-n-butírico (BABA) protegeu completamente plantas suscetíveis de alface, *Lactuca sativa* L., contra *Bremia lactucae* Regel (Pajot *et al.*, 2001). Porat *et al.* (1999) conseguiram reduzir a deterioração de toranja, *Citrus paradise* MacFad. cv. Star Ruby, causada por *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., com aplicação de ácido jasmônico e BABA.

Os indutores ASM e BABA ativam genes que produzem proteínas relacionadas à patogênese; quitinase e outras substâncias, a exemplo das fitoalexinas; proteínas relacionadas às modificações morfológicas, como aumento da lignificação e formação de papila, além de fortalecer a parede celular (Jakab *et al.*, 2001; Percival, 2001; Romero *et al.*, 2001). O indutor jasmonato induz o gene PDF1.2, que codifica para um peptídeo antifúngico, o “defensin” (Penninckx *et al.*, 1998).

Este trabalho teve a finalidade de estudar o efeito dos indutores químicos ASM, BABA e JM sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum*

sp. e na ativação dos genes de defesa do maracujá amarelo, de modo a reduzir as perdas provocadas pelo agente causal da antracnose.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito de indutores sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum sp.*

Discos de cultura (6 mm de diâmetro) de *Colletotrichum sp.* com cinco dias de crescimento em batata-dextrose-ágar (BDA), foram retirados da borda de colônias e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA, para esporulação. As placas foram incubadas durante 12 dias a 28 ± 2 °C, sob luz contínua. Após o período de incubação, foram colocados 10 ml de água destilada esterilizada (ADE) na superfície das colônias esporuladas e, com auxílio de uma lamínula, raspou-se a superfície da colônia para liberação dos conídios, os quais foram filtrados em gaze dupla esterilizada. Da suspensão de conídios tiraram-se alíquotas para diluir as suspensões concentradas dos indutores e se obter as concentrações desejadas de cada indutor (ASM e JM 0,0; 12,5; 25,0; 50,0; e 100,0 ppm e BABA 0; 50; 100; 500; e 1000 ppm), de modo que ao se depositar 100 µl destas concentrações próximos das extremidades de cada lâmina para microscopia, permitisse a contagem de 100 conídios em cada local. Cada lâmina foi apoiada em um suporte (canudo plástico esterilizado, dobrado em V) colocado sobre papel de filtro esterilizado, umedecido com água esterilizada e à base de uma placa de Petri com tampa, constituindo assim uma câmara úmida. Para cada concentração dos indutores foram utilizadas três lâminas. As placas foram mantidas em condições de laboratório, a 28 ± 2 °C, até se observar a germinação de conídios, que ocorreu em torno de dez h.

Iniciada a germinação de conídio na concentração 0 ppm do indutor (testemunha), com tubo germinativo maior que o comprimento, foram colocadas lamínulas sobre as suspensões depositadas nas lâminas, para leitura de 50 conídios ao acaso, anotando-se os germinados e os não germinados.

O ensaio obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial com três indutores, cinco concentrações e três repetições subdivididas. Foi calculado o percentual de germinação dos conídios, para efeito de análise de correlação dos dados com as cinco concentrações de cada indutor, usando o método de Pearson.

Para o crescimento micelial foi preparado meio de cultura BDA concentrado, ao qual, na temperatura em torno de 60 °C se adicionou alíquotas das suspensões concentradas de determinado indutor, de modo a se obter para ASM, JM e BABA as mesmas concentrações usadas no estudo germinação de conídios. Cada concentração preparada foi vertida em cinco placas de Petri, que serviram como repetições. Em seguida, foi depositado no centro de cada placa um disco de cultura (6 mm de diâmetro) de *Colletotrichum* sp. com cinco dias de crescimento. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C, sob luz contínua, durante sete dias.

O ensaio obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial com três indutores, cinco concentrações e três repetições. Os diâmetros das colônias foram avaliados por duas medições perpendiculares, expressas em mm, com auxílio de régua milimetrada, para efeito de análise de correlação dos dados com as cinco concentrações de cada indutor, usando o método de Pearson.

Efeito de indutores químicos no controle da antracnose em maracujá amarelo

Frutas sadias de maracujazeiro amarelo, em fase intermediária de maturação, procedentes de Igarassu - PE, foram lavados com água e sabão, tratados com solução de

hipoclorito de sódio a 1,5 %, por dois min, lavados por duas vezes em água destilada esterilizada (ADE) e secos com papel toalha (Lima Filho *et al.*, 2003). Em seguida, cinco frutas foram imersas por três min na suspensão de ASM (100 ppm), JM (100 ppm) e BABA (1000 ppm) e também em água (tratamento testemunha) contendo Tween 20 (0,02 %, v/v). As frutas secaram ao ar e, 24 horas após, foram inoculadas com discos de cultura (6 mm de diâmetro) de *Colletotrichum* sp., com cinco dias de incubação.

As frutas foram feridas em dois locais equidistantes um do outro, com perfurador (cinco pontas, abrangendo 5 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade) flambado e, sobre cada ferimento, depositou-se o inóculo. Depois, foram colocados em câmara úmida por 48 h, constituída de um saco plástico para cada fruto, contendo no seu interior ADE atomizada. As avaliações foram realizadas seis dias após a inoculação, medindo-se o diâmetro da colônia (DC), expresso em mm, com paquímetro, em dois sentidos perpendiculares.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado, com cinco frutas para cada tratamento, que constituíram as repetições, as quais foram representadas pelo valor médio de duas leituras. Foi realizada a análise de variância, a 5 % de probabilidade, para verificar diferença significativa entre tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de indutores sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* sp.

O indutor ASM não teve efeito sobre a germinação de conídios, mas JM e BABA, com aumento da concentração, causaram um pequeno estímulo à germinação de

conídios (Figura 1). Este efeito parece não ter tanta importância, visto que a diferença no acréscimo da germinação é de no máximo duas unidades percentuais, e o erro experimental poderia responder por essa diferença. Entretanto, Carré-Missio *et al.* (2004) encontraram efeito inibitório de ASM sobre a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* da acerola, *Malpighia emarginata* D.C.(concentração não especificada), mas López & Lucas (2000) não observaram este efeito sobre germinação de conídios de *C. gloeosporioides* do cajueiro, *Anacardium occidentale* L., em concentrações inferiores a 1,2 mM (235 ppm).

Os indutores ASM e JM reduziram o crescimento micelial enquanto BABA apresentaram efeito contrário, conforme os diâmetros das colônias mostrados na Figura 2. Resultado contrário ao obtido com o ASM foi observado por Carré-Missio *et al.* (2004), em que a DL_{50} para *C. gloeosporioides* em meio sólido foi maior que 1000 ppm. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelo fato de que apesar da espécie do patógeno ser a mesma, os isolados são oriundos de culturas diferentes, além da própria variação do fungo. Estudo de inoculação cruzada demonstrou que isolado de *C. gloeosporioides* do cajueiro não provocou lesão em maracujá (Muniz *et al.*, 1998).

Efeito de indutores químicos no controle da antracnose em maracujá amarelo

Apesar de ASM e JM terem reduzido o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. estes químicos, nas concentrações testadas, não conseguiram ativar as respostas fenotípicas de resistência, porque não houve diferença entre os diâmetros de lesões causados pelo patógeno em relação ao tratamento testemunha (Tabela 1). Este resultado não foi alterado mesmo usando a transformação dos dados com logaritmo e raiz quadrada.

O controle da antracnose em mamão com aplicação de ASM (Benato *et al.*, 2002), não pode ser atribuído tão somente ao efeito do indutor, mas também ao tratamento hidrotérmico. Os resultados positivos de ASM em frutos pós-colheita foram obtidos quando este indutor foi aplicado na pré-colheita, a exemplo da indução de resistência do mamão à antracnose causada por *C. gloeosporioides* (Dantas *et al.*, 2004), do morango, ao mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* Pers:Fr. (Terry & Joyce, 2000) e do melão, *Cucumis melo* L., contra as doenças causadas por *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp. e *Trichothecium* sp., cuja aplicação foi associada ao uso do fungicida guazatine (Huang *et al.*, 2000).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. José Luis Bezerra pela revisão do manuscrito e ao matemático Lindolfo Pereira dos Santos Filho, pela colaboração nas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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* 93:579-587. 2003.
- BENATO, E.A., PASCHOLATI, J.M.M., SIGRIST, J.M.M., CIA, P., SANTANA, S.L., CAMILI, E.C. & SILVA, C.A.R. Viabilidade do controle de antracnose em

- mamão pós-colheita através de indução de resistência por acibenzolar-S methyl. *Fitopatologia Brasileira* 27:S84. 2002. (Resumo)
- BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. *Summa Phytopathologica* 25:90-93. 1999.
- CARRÉ-MISSIO, V., NARUZAWA, E.S., MOREIRA, E.R. & PAPA, M.F.S. Fungitoxicidade de quitosana e acibenzolar-S-methyl a *Colletotrichum gloeosporioides* da acerola. *Fitopatologia Brasileira* 29:S255. 2004. (Resumo)
- CASTRO, R.M., VIEIRA, M., SCANAVACHI, V. & AZEVEDO, L.A.S. Efeito do ativador de plantas acibenzolar-S-methyl na proteção contra doenças, incremento de produção e qualidade de frutos em tomate estaqueado. *Fitopatologia Brasileira* 26:492-493. 2001. (Resumo).
- DANTAS, S.A.F., OLIVEIRA, S.M.A., BEZERRA NETO, E., COELHO, R.S.B. & SILVA, R.L.X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. *Summa Phytopathologica* 30:314-319. 2004.
- DELANEY, T.P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. *Plant Physiology* 113:5-12. 1997.
- HUANG, Y., DEVERALL, B.J., TANG, W.H., WANG, W. & WU, F.W. Foliar application of acibenzolar-S-methyl and protection of postharvest rock melons and Hami melons from disease. *European Journal of Plant Pathology* 106:651-656. 2000.
- JAKAB, G. COTTIER, V. TOQUIN, V., RIGOLI, G, ZIMMERLI, L., MÉTRAUX, J.-P. & MAUCH-MANI, B. β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107:29-37. 2001.
- JUNQUEIRA, N.T.V. Manejo integrado de doenças do maracujazeiro, da mangueira, da goiabeira e das anonáceas. In: Zambolim, L. (Ed.). *Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas*. Viçosa, MG. 2002. pp. 239-277.

- KOZLOWSKI, G., BUCHALA, A. & MÉTRAUX, J.P. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:53-58. 1998.
- LIBERATO, J.R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R. do; Monteiro, A.J.A.; Costa, H. (Eds.). *Controle de doenças de plantas: Fruteiras*. Viçosa, MG. 2002. pp. 699-825.
- LÓPEZ, A.M.Q. & LUCAS, J.A. Uso de ativadores de defesa nos estudos da resistência bioquímica de cajueiros a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Fitopatologia Brasileira* 25:387. 2000. (Resumo)
- MATTA, E.A.F.da. Doenças do maracujazeiro no estado da Bahia. Salvador:EPABA. Circular Técnica, 2. 1982.
- MUNIZ, M.F.S., SANTOS, R.C.R. & BARBOSA, G.V.S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. *Summa Phytopathologica* 24:177-179. 1998.
- OOSTENDORP, M., KUNZ, W. DIETRICH, B. & STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107:19-28. 2001.
- PAJOT, E., LE CORRE, D. & SILUE, D. Phytogard® and DL-beta-amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). *European Journal of Plant Pathology* 107:861-969. 2001.
- PENNINCKX, I.A.M.A., THOMMA, B.P.H.J., BUCHALA, A., MÉTRAUX, J.-P. & BROEKAERT, W.F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:2103-2114. 1998.

- PERCIVAL, G.C. Induction of systemic acquired disease resistance in plants: potential implications for disease management in urban forestry. *Journal of Arboriculture* 27:181-192. 2001.
- PERUCH, L.A.M. Controle integrado da antracnose no maracujá amarelo. (Dissertação de Mestrado). Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 1998.
- PORAT, R. VINOGRAD, V., WEISS, B., COHEN, L. & DROBY, S. Effects of various elicitors on the resistance of citrus fruits against pathogens. *Phytoparasitica* 27:158-159. 1999. (Abstract)
- ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa. Editora UFV. 1999.
- ROMERO, A.M, KOUSIK, C.S. & RITCHIE, D.F. Resistance to bacterial spot pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease* 85:189-194. 2001.
- SILVA, A.P. da & DURIGAN, J.F. Colheita e conservação pós-colheita do maracujá. *Informe Agropecuário* 21:67-71. 2000.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, b. & MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270. 1997.
- TALAMINI, V., SOUZA, E.A., POZZA, E.A., CARRIJO, F.R.F., ISHIKAWA, F.H., SILVA, K.J.D. & OLIVEIRA, F.A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. *Summa Phytopathologica* 30:371-375. 2004.
- TEIXEIRA, C.G. Cultura. In: Instituto de Alimentos. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2ª ed. Campinas. ITAL/IPEA. 1995. pp. 1-42 (Serie Frutas Tropicais, 9).
- TERRY, L. & JOYCE, D.C. Suppression of grey mould on strawberry fruit with the chemical plant activator acibenzolar. *Pest Management Science* 56:989-992. 2000.

TRINDADE, C.C., TRINDADE, D.R., POLTRONIERI, L.S., ALBUQUERQUE, F.C. & LUCAS, B.L.L. Doenças do maracujazeiro no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 25:346-347. 2000 (Resumo).

VIJAYAN, P., SHOCKEY, J., LÉVESQUE, C.A., COOK, R.J. & BROWS, J.A. Role for jasmonato in pathogen defense of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:7209-7214. 1998.

WILSON, C.L., EL GHAOUTH, A., CHALUTZ, E., DROBY, S., STEVENS, C., LU, J.Y, KHAN, V. & ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest disease of fruits and vegetables. *Plant Disease* 78:837-843. 1994.

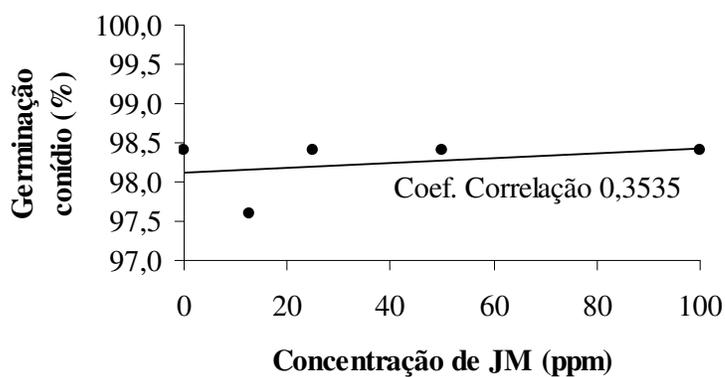
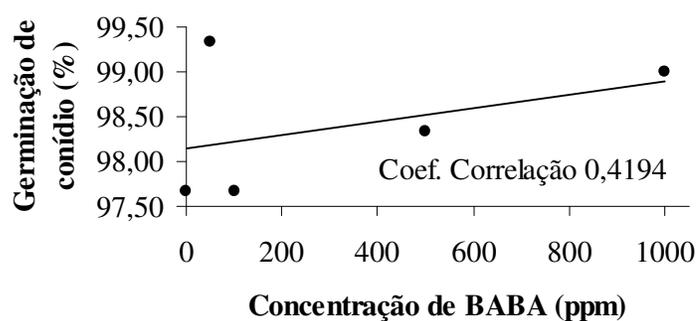
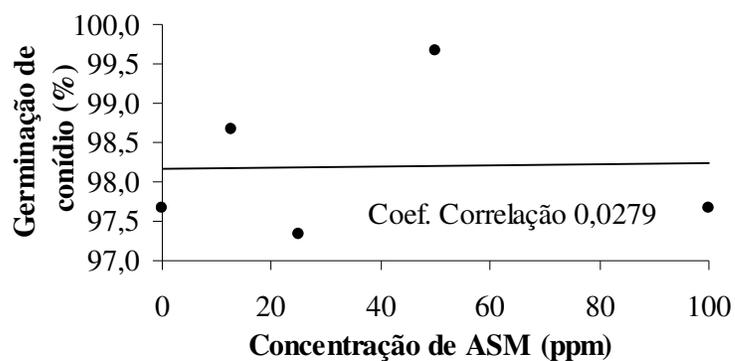


FIG 1 – Efeito dos indutores acibenzolar-S-metil (ASM), ácido DL- β -amino-n-butírico (BABA) e jasmonato metílico (JM) sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum* sp. do maracujá amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

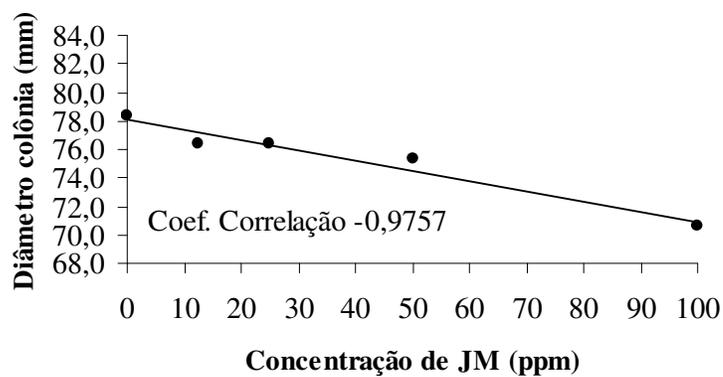
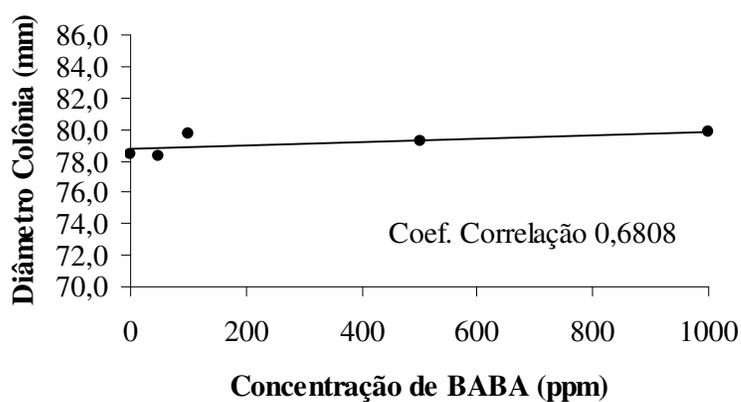
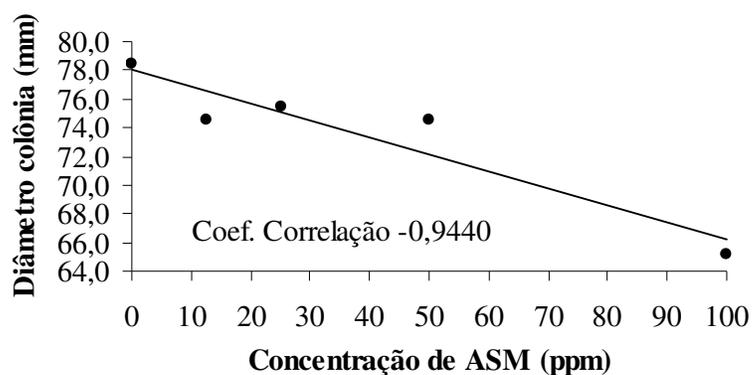


FIG 2 – Efeito dos indutores acibenzolar-S-metil (ASM), ácido DL- β -amino-n-butírico (BABA) e jasmonato metílico (JM) sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. do maracujá amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

TABELA 1 – Efeito dos indutores químicos acibenzolar-S-metil, ácido DL β -amino-n-butírico e jasmonato metílico no controle da antracnose em maracujá amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

Tratamento	Diâmetro de lesão¹
Jasmonato Metílico	15,45 n.s. ²
Testemunha	13,60 n.s.
Acibenzolar-S-metil	12,30 n.s.
ácido DL β -amino-n-butírico	10,00 n.s.

¹ Média de cinco repetições; CV=26,37 %

² Não significativo (P=0,05)

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando os estudos para identificar com marcadores genéticos a espécie de *Colletotrichum* dos isolados de maracujá amarelo, conhecer a agressividade destes isolados, caracterizá-la com marcadores bioquímico, fisiológico e genético e observar o efeito de indutores químicos sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. e no controle da antracnose em maracujá amarelo, pode-se concluir que:

- Os DNAs dos 33 isolados de *Colletotrichum* obtidos de maracujá amarelo não reagiram com primers de PCR marcadores para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.
- Os DNAs de 18 isolados reagiram com o primer de PCR para *Colletotrichum* de *Passiflora*.
- Os 33 isolados de *Colletotrichum* spp. foram separados em dois grupos de agressividade em maracujá amarelo: grupo 1, alta e grupo 2, baixa agressividade.
- A agressividade não foi correlacionada com a origem dos isolados (Zonas da Mata Norte e Sul e Agreste) e seus morfotipos anamorfo e teleomorfo.
- Os isolados diferiram entre si na produção de enzimas amilolítica, celulolítica, lipolítica, proteolítica e no crescimento micelial, mas estes marcadores não foram satisfatórios para caracterizar agressividade.
- As reações de primers de RAPD com os DNAs dos isolados permitiram mostrar que os isolados do grupo 1 de agressividade mostraram-se mais próximos geneticamente entre si do que os isolados do grupo 2.

- Estas reações também permitiram separar os em dois grupos genéticos, os quais não se relacionaram totalmente com os grupos de agressividade.
- As reações dos DNAs dos isolados com o primer OPA-9 possibilitaram a caracterização de 85,7 % dos isolados do grupo 1 de agressividade, com erro de 15,5 % ao caracterizar isolados do grupo 2 como do grupo 1, mas sem importância técnica.
- O indutor químico ASM não reduziu a germinação de conídios de *Colletotrichum* sp., mas BABA e JM estimularam este processo fisiológico.
- Os indutores ASM e JM reduziram o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. e BABA apresentou efeito contrário.
- Os indutores químicos ASM, BABA e JM não controlaram a antracnose em maracujá amarelo.