

## DIVERSIDADE GENOTÍPICA E PATOGÊNICA DE *Colletotrichum musae* NO ESTADO DE PERNAMBUCO<sup>1</sup>

PAULO CÉZAR DAS MERCÊS SANTOS<sup>2</sup>, WALÉRIA GUERREIRO LIMA<sup>3</sup>,  
CÍNTIA DE SOUSA BEZERRA<sup>4</sup>, SAMI JORGE MICHEREFF<sup>5</sup>,  
MARCOS PAZ SARAIVA CÂMARA<sup>6</sup>

**RESUMO** - Sessenta isolados de *Colletotrichum* oriundos de campos de produção de banana dos Municípios de Vicência, São Vicente Férrer e Machados, no Estado de Pernambuco, foram avaliados quanto a características morfológicas, moleculares, culturais, de virulência e de diversidade genética. Os isolados foram identificados como *C. musae*, tendo a maioria conídios retos, oblongos, com ápices arredondados. A taxa de crescimento micelial variou de 1,36 a 1,91 cm/dia. Foram encontrados três grupos de coloração para as colônias: branca, creme e salmão, enquanto a presença de setores variou de 0 a 8 por isolado e, na maioria dos isolados (73,3%), houve a presença de microescleródios. A diferença em virulência foi significativa para a área abaixo da curva de progresso da doença, indicando variabilidade entre os isolados. O dendrograma gerado pela análise UPGMA dos marcadores ISSR-PCR revelou a formação de três grupos pelo coeficiente de similaridade de Dice, os quais correspondem, na sua maioria, às três áreas amostradas.

**Termos para indexação:** *Musa* sp., antracnose, doença pós-colheita, morfologia, ISSR-PCR.

## DIVERSITY GENOTYPIC AND PATHOGENIC OF *Colletotrichum musae* IN PERNAMBUCO

**ABSTRACT** - Sixty *Colletotrichum* isolates originating from fields producing banana in the municipalities of Vicência, São Vicente Férrer and Machados in the State of Pernambuco were evaluated for physiological, morphological, molecular, cultural, virulence and genetic diversity characteristics. The isolates were identified as *C. musae*, with most conidia, straight, oblong with rounded summits. The mycelial growth rate ranged from 1.36 to 1.91 cm / day. Three groups of staining for colonies were found: white, cream and salmon, while the presence of sectors ranged from 0 to 8 per isolate, and in most isolates (73.3%) there were the presence of microsclerotia. The difference in virulence was significant for the area under the disease progress curve, indicating variability among isolates. The dendrogram generated by UPGMA analysis of ISSR-PCR markers revealed the formation of three groups by Dice similarity coefficient which correspond mostly to the three sampled areas.

**Index terms:** *Musa* sp., anthracnose, postharvest disease, morphology, ISSR-PCR.

<sup>1</sup>(Trabalho 034-14). Recebido em: 23-01-2014. Aceito para publicação em: 15-01-2015.

<sup>2</sup>Mestre em Fitopatologia. Aluno do Curso de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900. Recife-PE. E-mail: pmerces@bol.com.br

<sup>3</sup>Dra. em Fitopatologia. Bolsista PNP/Capes, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900. Recife-PE. E-mail: wagueli@hotmail.com

<sup>4</sup>Dra. em Fitopatologia Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900. Recife-PE. E-mails: wagueli@hotmail.com; cintiasbezerra@gmail.com

<sup>5</sup>Dr. em Fitopatologia. Professor, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900. Recife-PE. E-mail: sami@depa.ufrpe.br

<sup>6</sup>Ph. D. em Fitopatologia. Professor, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900. Recife-PE. E-mail: mcamara@depa.ufrpe.br

## INTRODUÇÃO

Dentre as patologias pós-colheita da banana (*Musa L. spp.*), a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx representa o mais grave problema em todas as regiões produtoras do mundo (CORDEIRO et al., 2005; VENTURA; HINZ, 2002). A doença geralmente ocorre na fase de maturação; entretanto, o fungo infecta os frutos verdes no campo de produção, e as infecções permanecem quiescentes até o início do estágio de maturação (CORDEIRO; MATOS, 2005; CORDEIRO et al., 2005).

Por muitos anos, a caracterização morfológica de *C. musae* gerou dados ambíguos que podem levar à classificação dessa espécie como sendo *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. No entanto, trabalhos recentes desenvolvidos com isolados de banana determinaram as características fenotípicas e moleculares classificando essa espécie como um grupo monofilético dentro do complexo "*C. gloeosporioides*" (PHOTITA et al., 2005; ZAKARIA et al., 2009; ABD-ELSALAM et al., 2010). Como o isolado da espécie-tipo descrita para *C. musae* foi perdido durante o processo de conservação no pericarpo de banana, um neótipo foi designado por Su et al. (2011). Essa espécie apresenta alto grau de especificidade em relação ao gênero *Musa* (UDAYANGA et al., 2013).

Estudos de diversidade genética também são bastante úteis para estabelecer a estrutura de uma determinada população e o seu potencial evolutivo numa dada área de ocorrência da doença e a técnica de Inter-Simple Sequence Repeat–Polymerase Chain Reaction (ISSR–PCR), por ser um marcador dominante, pode ser uma alternativa viável para tais estudos. Em *C. musae*, nenhum estudo do tipo conseguiu fazer uma associação entre a variabilidade genotípica e a origem dos isolados em diferentes áreas de cultivos de banana. Medeiros et al. (2010) usaram essa técnica para estudar a variabilidade de isolados de *Colletotrichum* provenientes de vários hospedeiros, conseguindo demonstrar a diferença entre os isolados, assim como diferenciar as espécies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* J.H. Simmonds e *C. sublineola* Henn. ex Sacc. & Trotter em seis grupos, anteriormente separados por *primers* específicos.

O entendimento das dinâmicas populacionais do patógeno é importante para prever as respostas dessas populações às diferentes medidas de controle adotadas (FREEMAN et al., 1997). McDonald e Linde (2002) citam, por exemplo, patógenos com maior potencial evolutivo impõem maior risco de sobrepor os efeitos dos genes de resistência ou o

desenvolvimento para anular o efeito dos métodos de controle, como a aplicação de fungicidas, que, por sua vez, é o método atualmente adotado para controlar a antracnose da banana.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivos estudar as características morfológicas, culturais, moleculares e patogênicas de isolados de *C. musae* oriundos de diferentes áreas produtoras de bananas no Estado de Pernambuco e analisar a diversidade genética por meio de ISSR-PCR.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta isolados de *C. musae* foram obtidos de bananas cvs. Pacovan e Prata, coletadas nos principais municípios produtores de Pernambuco: Vicência 07° 39' 38.87" S 35° 19' 44.91" O e 07° 40' 49.32" S 35° 24' 41.06" O (Zona da Mata Norte Pernambucana), São Vicente Férrer 07° 39' 38.87" S 35° 19' 44.91" O e Machados 07° 41' 09" S 35° 30' 54" O (Agreste Pernambucano) (Figura 1). Foram coletados dois frutos por planta, sendo as plantas escolhidas aleatoriamente dentro das áreas de plantio, totalizando 20 plantas por área amostrada. O isolamento foi efetuado quando os frutos se encontravam no estágio de maturação comercial I, em meio BDA suplementado com 50 µg/mL de cloridrato de tetraciclina. Culturas monospóricas foram obtidas conforme a metodologia descrita por Ho e Ko (1997) e incorporadas à Coleção de Fungos Fitopatogênicos "Professora Maria Menezes" - CMM, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada no Recife, Pernambuco, Brasil.

Os isolados monospóricos foram cultivados em placas contendo meio BDA mantidas em fotoperíodo de 12 h, à temperatura de 25 ± 1 °C. Para análise do crescimento micelial, foi realizada diariamente a mensuração do diâmetro médio das colônias em dois sentidos perpendiculares para o cálculo da taxa de crescimento micelial (TCMD) de cada isolado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições por isolado, sendo cada repetição constituída por uma placa. Adicionalmente, ao final do experimento, foi realizada a caracterização cultural observando a coloração das colônias e a cor do reverso, além do relevo (comportamento do crescimento micelial) e da formação de setores (análise visual e contagem do número de setores).

Na análise morfológica, adotaram-se os procedimentos utilizados por Than et al. (2008) com modificações, caracterizando o tamanho e o formato dos conídios. Esporos de colônias de *Colletotrichum*

foram utilizados em preparações microscópicas, montadas e observadas ao microscópio óptico, usando a objetiva de 40×. Posteriormente, o comprimento (C) e a largura (L) de 400 conídios, por isolado, foram medidos utilizando o software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group Co., Ltd, Xiamen, Fujian, China). Com os dois dados, foi calculada a relação comprimento/largura (C/L). A partir das imagens fotografadas, procedeu-se à avaliação dos formatos de 100 conídios por isolado de acordo com a descrição de Sutton (1992) e a escala proposta por Tozze Júnior (2007), em que o formato 1 é reto, fusiforme, com ápices afilados; o formato 2 é reto, oblongo, com ápices arredondados; o formato 3 é reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra, e o formato 4 é reto, com constrição. Os resultados foram transformados em porcentagem para cada formato de conídios apresentado por isolado.

Na caracterização da virulência, foram utilizados frutos sadios da cultivar Pacovan no estágio de maturação II. Os frutos previamente desinfestados foram depositados em bandejas plásticas e inoculados sem e com ferimentos com auxílio de uma microagulha em dois pontos equidistantes. Em seguida, foram depositadas 30 µL de suspensão (10<sup>6</sup> esporos/mL) de conídios de cada isolado sobre o local dos pontos com e sem ferimentos. O controle foi feito por meio do depósito de 30 µL de água destilada esterilizada sobre a superfície do fruto. Após a inoculação, os frutos foram mantidos em sala de incubação, à temperatura de 27 ± 2 °C, em fotoperíodo de 12 horas, sendo previamente mantidos em câmara úmida por 24 horas.

As avaliações de severidade, foram realizadas diariamente, desde o aparecimento do sintoma até que lesões individuais não fossem mais distinguíveis. As medições foram feitas com uma régua flexível milimetrada, em dois sentidos diametralmente opostos. Com os dados diários de severidade foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a regra do ponto médio ou método de integração trapezoidal (CAMPBELL; MADDEN, 1990). O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento, e a parcela experimental foi representada por uma fruta inoculada em dois pontos.

Para análise de diversidade genotípica e caracterização molecular, foi feita a extração do DNA genômico de 60 isolados monospóricos com sete dias de cultivo, em meio BDA, de acordo com o protocolo de Schäfer e Wöstemeyer (1992) modificado por Junghans et al. (1998). O DNA extraído foi

ressuspendido, quantificado e armazenado a -20 °C.

Os isolados foram caracterizados pela técnica de ISSR-PCR, utilizando três primers, GTG5 (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'), GACA (5'-GAC AGA CAG ACA GAC A-3') e 820 (5'-GTG TGT GTG TGT GTG TC-3') (Invitrogen™). A reação contendo 100 ng de DNA foi realizada com 25 µL do tampão 10× para PCR, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada um dos quatro dNTP, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos e 0,04 U de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen™). A PCR foi realizada em termociclador com o programa: desnaturação inicial 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 45 °C (820) ou 52 °C (GTG5 e GACA) por 45 s, 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, em tampão 1× Tris-acetato EDTA (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) por meio de eletroforese a 100 V por 2 h e visualizados em fotodocumentador após coloração com SyBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com o marcador molecular 1 Kb Plus DNA® Ladder (Invitrogen™).

As análises dos dados morfológicos e de virulência foram conduzidas em duas etapas: inicialmente, para cada variável, verificou-se a adequabilidade dos resíduos às pressuposições da distribuição normal. Confirmando essa adequabilidade, procedeu-se à análise de variância univariada que foi utilizada para identificar grupos de isolados dentro de cada variável. Os valores de crescimento micelial foram ajustados ao modelo de regressão linear simples ( $y = a + b.x$ ), tendo o tempo (em dias) como variável independente, e o crescimento micelial (em cm) como dependente. A taxa de crescimento micelial diária para cada isolado (cm/dia) foi estimada pelo parâmetro "b" da equação de regressão, considerando os dados de apenas cinco dias de leitura. Em relação aos dados de morfometria de conídios, para cada isolado, foram calculados o valor médio e o intervalo de confiança ( $P = 0,05$ ). A TCMD, comprimento, largura e relação C/L dos conídios, AACPD de frutas inoculadas com e sem ferimentos foram submetidas à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $P = 0,05$ ), utilizando-se do programa estatístico Sisvar versão 5.0 (Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil).

Para a determinação da estrutura genética, foram analisados os 60 isolados das três áreas de plantio comercial. Os dados obtidos nos géis de eletroforese foram transformados em dados binários: 1 – para presença de bandas; e 0 – para

ausência de bandas. A análise de diversidade genética da população foi realizada usando o programa POPGENE® version 1.32 (Population Genetic Analysis, University of Alberta, Edmonton, AB, CA) para executar a análise combinada dos dados obtidos e gerar os valores de diversidade gênica ( $H$ ), diversidade genética total ( $H_T$ ), diversidade genética intrapopulacional ( $H_S$ ), diferenciação genética interpopulacional ( $G_{ST}$ ) (NEI, 1973, 1978) e número de migrantes ( $N_m$ ).

A análise de diversidade genotípica para cada população e para a população total difere em riqueza, igualdade e diversidade, como descrito previamente, e foi calculado com os índices de Hill (1973):  $N_1$  e  $N_2$ , em que  $N_1 = e^H$ , em que,  $H$  refere-se ao índice de Shannon (1948):  $H = -\sum p_i \times \ln(p_i)$ , em que  $p_i$  é a frequência observada do  $i^{\text{th}}$  genótipo.  $N_1$  representa o número de genótipos comuns de forma uniforme que podem produzir a mesma diversidade  $H$ .  $N_2$  corresponde ao índice de diversidade genotípica presente em Stoddart e Taylor (1988):  $G = 1/\sum p_i^2$ .  $N_1$  e  $G$  medem quão eficazmente as concentrações populacionais proporcionais são distribuídas entre os diferentes genótipos.  $G$  dá um peso maior ao número de genótipos abundantes, enquanto  $N_1$  dá um peso maior a genótipos raros.  $N_1$  geralmente fica entre o número de genótipos observados ( $g_{obs}$ ) e o valor de  $G$ . Foi realizado um *bootstrapping* usando 1.000 reamostragens com intervalo de confiança de 95% (DIXON, 1993; GRÜNWARD et al., 2003). A riqueza genotípica que expressa o número de patótipos esperados na amostra foi estimada usando curvas de rarefação com base no tamanho da amostra da menor população (GRÜNWARD et al., 2003; HURLBERT, 1971). O índice de equitabilidade, que mede como os genótipos estão distribuídos na amostra ( $E_s$ ), foi calculado com a fórmula  $E_s = (G - 1)/(N_1 - 1)$  (ALATALO, 1981; LUDWIG; REYNOLDS, 1988; GRÜNWARD et al., 2003).

Todas as análises foram executadas usando o software estatístico R version 2.15.0 (R Development Core Team, 2012, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, VIE, AT).

A análise foi realizada em duas etapas: i) todos os 60 isolados representando a população total foram avaliados segundo os critérios descritos acima; e ii) as três populações foram analisadas separadamente, comparadas para diversidade genética e genotípica. Foi realizada uma avaliação da relação genética entre os isolados, através de uma análise de agrupamento e, com base no coeficiente de similaridade de Dice (1945), foi construído um dendrograma pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), usando o software NTSYSpc®

version 2.1 for Windows (Applied Biostatistics Inc., Port Jefferson, NY, USA) (Figura 2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros das variáveis fisiológicas avaliadas neste trabalho estão de acordo com as observações já descritas por diversos autores para a espécie *C. musae* (PHOTITA et al., 2005; ZAKARIA et al., 2009; ABD-ELSALAM et al., 2010; SU et al., 2011). As médias obtidas com a taxa de crescimento micelial, além das características culturais que foram analisadas e agrupadas, estão apresentadas na Tabela 1. Os isolados de *C. musae* diferiram quanto à TCMD, com a formação de três grupos, pelo teste de Scott-Knott ( $P = 0,05$ ), e todos os isolados apresentaram crescimento médio superior a 1,0 cm/dia.

Na caracterização cultural, para os 60 isolados de *C. musae*, houve variação no que diz respeito à coloração das colônias. Foi possível fazer a separação em três grupos de coloração, que variou de branca, creme a salmão. Da mesma forma, comportou-se o reverso da placa (dados não mostrados). Quanto à topografia das colônias, houve predominância de micélio aéreo.

A maioria das colônias de *C. musae* desenvolveu micélio em setores regulares, que acompanharam o crescimento radial normal da colônia. A formação dos setores miceliais apareceu em isolados, independentemente da área de coleta. Para sete isolados (11,6%), foi observado um único setor por colônia (placa), enquanto alguns isolados apresentaram mais de um por placa, com número máximo de oito setores formados. Roca-Magallanes et al. (2004) trabalhando com o complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado às sementes de algodão verificaram que as culturas sempre mantinham as mesmas características fenotípicas para a formação de setores, quando da realização de sucessivas transferências em meios de cultura. No presente trabalho, foi verificado esse efeito de formação de setores nas repicagens periódicas.

A presença de microescleródios, que funcionam como estruturas de resistência, foi observada em 44 isolados (73,3%) e não houve a formação de setas, em meio de cultura, para nenhum dos isolados estudados. A detecção de microescleródios, em meios de cultura, é um passo importante para o manejo de doenças causadas por espécies de *Colletotrichum*, uma vez que a observação *in vitro*, dessa estrutura de sobrevivência dá uma ideia da diversidade do comportamento das espécies. O agente causal da antracnose do sorgo [*C. graminicola* (Ces.) G.W.

Wilson.] sobrevive, de modo saprofítico, em colmos secos, por até 18 meses, principalmente na forma de microescleródios. O manejo dessa doença pode ser realizada pela eliminação de restos culturais, visando a redução do inóculo primário (CASELA; FREDERIKSEN, 1993; FREDERIKSEN, 2000; COSTA et al., 2003).

Os dados referentes à caracterização morfológica dos conídios de *C. musae* estão apresentados na Tabela 1. Os conídios apresentaram-se hialinos, retos, obtusos nas extremidades e alguns truncados na base, com presença de três formas predominantes: cilíndricas, elipsoides e clavadas. Tomando por base a classificação proposta por Tozze Júnior (2007), o formato de conídios que mais se destacou foi o 2 (reto, oblongo e ápices arredondados), com 63,2% do total de conídios, seguido pelo formato 3 (reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra) com 26,0% de frequência. Os formatos 4 (reto, com constricção) e 1 (reto, fusiforme, com ápices afilados) apresentaram 9,4 e 1,4%, respectivamente.

Em relação à aplicação do intervalo de confiança ( $P = 0,05$ ) (dados não mostrados), para o comprimento, os valores médios variaram de 12,2 a 17,8, para largura a variação foi de 3,8 a 6,1, enquanto a relação C/L foi de 2,4 a 4,5. Houve diferença significativa entre as variáveis comprimento, largura e relação comprimento/largura, de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P = 0,05$ ), permitindo subdividir os isolados em nove, treze e doze grupos, respectivamente. Os limites inferior e superior do comprimento dos conídios foram 9,3 e 30,2  $\mu\text{m}$ , enquanto para a largura, os valores foram 2,6 e 12,6  $\mu\text{m}$ , e para a relação C/L, 1,1 e 7,5, com média geral ( $n = 6.000$ ) de  $15,0 \times 4,9 \mu\text{m}$  e 3,1, para comprimento, largura e relação C/L, respectivamente.

Para todas as características fenotípicas avaliadas, foram observados padrões de variação dentro dos limites estabelecidos para *C. musae* (SUTTON, 1992). O comportamento variável de determinadas características fisiológicas e culturais de uma mesma espécie de *Colletotrichum* pode ser explicada pela condição heterozigótica para um determinado caráter das populações de biótipos que constituem essa espécie (COUTO; MENEZES, 2004). Esse comportamento é governado por diversos fatores que acabam influenciando sobre as características fenotípicas da espécie, de acordo com as condições ambientais e temporais de cultivo em que esta foi colocada.

Todos os isolados foram patogênicos em bananas, quando inoculados com ferimentos, e

20 isolados (33,3%) não estabeleceram infecção quando inoculados sem ferimentos (Tabela 1). Essa observação é importante no que diz respeito aos cuidados no manuseio pós-colheita, visando a evitar danos mecânicos que possam facilitar a penetração e o estabelecimento das relações parasitárias de *C. musae*. Não houve correlação entre a origem dos isolados e a diferença na virulência quando inoculados em frutos de bananeira.

As bananas inoculadas, neste trabalho, apresentaram sintomas típicos da antracnose. Esses sintomas foram lesões necróticas de coloração marrom-escura que se tornaram deprimidas conforme a colonização do tecido, algumas de formato circulares e outras que eram delimitadas pelas quinhas da casca. Posteriormente, as lesões eram tomadas pelo sinal do fitopatógeno, com a formação de pequenas pontuações (acérvulos) com a presença de massas de esporos de coloração alaranjada. Os frutos utilizados como tratamento-controle não apresentaram sintomas no decorrer da condução do experimento.

A AACPD variou de 2,11 (CMM 3142) a 5,12 (CMM 3197) nas inoculações com ferimentos e 0,44 (CMM 3129) a 3,10 (CMM 3125) para as inoculações sem ferimentos, indicando a existência de variação na virulência entre os isolados. De acordo com o teste de Scott-Knott ( $P = 0,05$ ), houve diferenças significativas entre os isolados, permitindo subdividi-los em 2 grupos para as inoculações realizadas com e sem ferimentos, respectivamente.

Isolados de *C. musae* podem apresentar comportamento diferenciado entre si, quando inoculados na própria cultivar de origem de obtenção desses isolados, ou até mesmo nem causar doença, no caso de um isolado obtido em uma cultivar e, posteriormente, inoculado em outra (COUTO et al., 2002). Fato semelhante foi observado neste trabalho. Os ferimentos realizados na casca da banana podem ter facilitado a entrada do fitopatógeno, promovendo o processo de infecção e colonização, já que muitas doenças são iniciadas através de ferimentos. Para frutos do tratamento sem ferimentos, nos quais os isolados não conseguiram causar infecções, a ausência de sintomas, entretanto, não significa que o fitopatógeno não iniciou o processo infeccioso.

Foram identificados 20 haplótipos ISSR entre os 60 isolados estudados. Um alto grau de similaridade genética foi encontrado entre os isolados, com 11 grupos de isolados com similaridade genética máxima entre eles, o maior destes grupos com 20 isolados, todos da população de Machados. Ao analisar o dendograma (Figura 2), encontram-se dois isolados do município de Vicência (CMM3120

e CMM3122) agrupados com os isolados de Machados, e dois isolados de São Vicente Férrer (CMM3179 e CMM3180) agrupados com os de Vicência. Apesar disso, quando os isolados são agrupados em populações, o dendograma revela maior similaridade genética entre as populações de Machados e São Vicente Férrer (Figura 2; Tabela 3). Nenhum dos haplótipos encontrados é compartilhado entre as três populações.

Os primers GACA, GTG5 e 820 também foram úteis para avaliar a diversidade genética entre isolados de *C. gloeosporioides* (FREEMAN; SHABI, 1996) provenientes de abacate e amêndoa de Israel e Estados Unidos e, tal como apresentado neste estudo, verificaram que estes foram agrupados de acordo com sua origem geográfica.

A heterozigidade esperada ( $H_s$ ), indicando o nível de diversidade genética intrapopulacional, foi de 0,109, representando 35% da diversidade genética total ( $H_T = 0,312$ ). Assim, na população total, a maior parte da diversidade genética encontrada é devido ao alto nível de diferenciação entre populações ( $G_{ST} = 0,649$ ). Apesar do alto valor de  $G_{ST}$ , o número de indivíduos que migram por geração, número de migrantes ( $Nm = 0,270$ ) encontrado é suficiente para contrapor os efeitos da deriva e, assim, impede grande divergência genética entre as populações (Tabela 2). Quando as populações foram analisadas aos pares, os valores de  $G_{ST}$  foram menores que o da população total, variando de 0,334 a 0,573, mas ainda revelando uma moderada distância genética entre as populações. As populações mais divergentes foram São Vicente Férrer e Vicência, e esses dados foram confirmados pelos valores de identidade genética que variaram de 0,56 a 0,71, com a maior identidade entre as populações de Machados e São Vicente Férrer (Tabela 2).

A partir dos valores de  $G_{ST}$  de cada par de populações, foi inferida a estimativa de fluxo gênico entre elas, entre São Vicente e Vicência,  $Nm = 0,37$  e Machados e Vicência,  $Nm = 0,86$ , insuficiente para contrapor os efeitos da deriva e, conseqüentemente, permitindo divergência entre populações. Por outro lado, entre Machados e São Vicente Férrer, o fluxo gênico foi  $Nm = 1$ , valor suficiente para manter as populações geneticamente semelhantes (Tabela 3).

A diversidade genotípica das populações variou de 1 a 7,68. A riqueza genotípica estimada pela rarefação com menor tamanho de amostra ( $n = 20$ ) foi baixa na população de Machados e alta para São Vicente Férrer. A equitabilidade genotípica foi alta em todas as populações, com valores entre 0,85 e 1, a população de Machados apresentou a equitabilidade máxima 1, quando cada genótipo ocorre na mesma

frequência, no caso desta população, um único genótipo distribuído igualmente na população. A diversidade genotípica da população de Machados foi significativamente diferente das populações de Vicência e São Vicente Ferrer, visto que não houve sobreposição dos intervalos de confiança calculados com base no erro-padrão de cada estimativa. Entre as populações de Vicência e São Vicente Ferrer, houve sobreposição dos intervalos de confiança, revelando que não há diferenças significativas na diversidade genotípica destas populações. A diversidade genotípica da população total foi 13% do máximo possível quando  $G = n$ , ou seja, todos os isolados têm um fingerprint de DNA diferente. A diversidade genética foi moderada nas populações de Vicência e São Vicente Férrer, 0,2 e 0,12 respectivamente. Para Machados, não houve diversidade genética ( $H = 0,0$ ) (Tabela 3).

A análise dos índices de diversidade genotípica confirmou a variabilidade dos isolados de *C. musae* dentro de cada área, exceto na população de Machados. No entanto, quando a população foi vista como um todo, a variabilidade foi moderada quando comparada com o número total de genótipos e o número de isolados estudados. A ocorrência de um grande número de isolados geneticamente idênticos e concentrados geograficamente pode ser explicada pelo modo de dispersão do *Colletotrichum*, que ocorre com respingos de água e que não alcança grandes distâncias, além disso, os locais em estudo, estão isolados por barreiras naturais.

Os índices também indicaram a ocorrência de fluxo gênico, provavelmente, devido ao fungo ser transportado via material de propagação e não haver fiscalização sanitária entre regiões. Ademais, a reprodução assexuada pode ser responsável pela manutenção do padrão populacional de *C. musae*.

Este é o primeiro estudo relatando a diversidade genética em populações de *C. musae* associadas à antracnose da banana via ISSR-PCR. Essa técnica pode ser uma alternativa viável para estudos de variabilidade de *C. musae*, visto que fungos desse gênero, quando analisados em relação à morfologia, testes bioquímicos e fisiologia, são bastante variáveis e mostram-se bastante influenciados pelas condições ambientais.

**TABELA 1** – Características fisiológicas, culturais, morfológicas e de virulência de isolados de *Colletotrichum musae* obtidos de banana com sintomas de antracnose e provenientes de três municípios do Estado de Pernambuco.

Isolado	LC <sup>1</sup>	TCMD (cm/dia) <sup>2</sup>	ME <sup>3</sup>	Setor <sup>4</sup>	Cor da colônia <sup>5</sup>	Comprimento (μm) <sup>6</sup>	Largura (μm) <sup>7</sup>	Relação C/L <sup>8</sup>	AACPD <sup>9</sup>	
									CF <sup>10</sup>	SF <sup>11</sup>
CMM 3120	VIC	1,65 b*	P	1	Branca	15,26 d	3,78 n	4,07 c	2,97 b	0
CMM 3122	VIC	1,88 a	A	0	Creme	16,05 c	5,21 e	3,11 h	3,25 b	0
CMM 3125	VIC	1,59 b	P	0	Creme	13,75 g	4,77 h	2,91 i	4,28 a	3,10 a
CMM 3126	VIC	1,64 b	A	0	Branca	12,89 h	4,55 j	2,86 i	2,71 b	0
CMM 3127	VIC	1,51 c	A	0	Creme	16,18 c	5,12 f	3,20 g	4,02 a	1,27 b
CMM 3129	VIC	1,65 b	A	0	Salmão	16,35 b	5,84 b	2,85 i	2,87 b	0,44 b
CMM 3132	VIC	1,72 a	P	0	Salmão	15,24 d	5,36 e	2,86 i	4,03 a	0
CMM 3133	VIC	1,82 a	P	3	Salmão	13,98 f	5,70 c	2,49 d	4,32 a	0,67 b
CMM 3135	VIC	1,73 a	P	5	Branca	14,88 e	5,78 b	2,59 l	3,14 b	0
CMM 3136	VIC	1,79 a	A	0	Salmão	13,60 g	4,77 h	2,87 i	4,36 a	2,08 a
CMM 3140	VIC	1,84 a	P	0	Salmão	16,59 b	5,73 c	2,95 i	3,60 b	0,73 b
CMM 3142	VIC	1,52 c	P	8	Salmão	16,97 b	6,03 a	2,85 i	2,11 b	1,61 a
CMM 3144	VIC	1,45 c	A	2	Branca	15,05 d	5,38 e	2,82 i	3,16 b	0
CMM 3146	VIC	1,45 c	A	0	Branca	14,21 f	5,31 e	2,69 j	3,03 b	0,85 b
CMM 3148	VIC	1,68 a	A	1	Salmão	12,37 i	4,42 j	2,82 i	3,54 b	1,20 b
CMM 3152	VIC	1,69 a	P	0	Salmão	16,38 b	5,27 e	3,16 g	3,06 b	0
CMM 3153	VIC	1,74 a	P	0	Salmão	17,64 a	3,95 m	4,51 a	3,28 b	0
CMM 3155	VIC	1,75 a	P	0	Salmão	13,96 f	4,64 i	3,02 h	3,56 b	0
CMM 3156	VIC	1,57 b	A	0	Branca	14,74 e	4,98 f	2,99 h	4,16 a	2,51 a
CMM 3157	VIC	1,81 a	P	0	Salmão	15,72 c	5,85 b	2,72 j	4,72 a	2,01 a
CMM 3158	SVF	1,80 a	P	0	Salmão	16,02 c	5,49 d	2,95 i	3,65 b	0,62 b
CMM 3161	SVF	1,83 a	P	8	Salmão	15,43 d	4,14 l	3,78 d	3,42 b	1,74 a
CMM 3162	SVF	1,60 b	P	1	Creme	16,64 b	4,68 i	3,59 e	3,11 b	0,80 b
CMM 3163	SVF	1,82 a	P	0	Creme	13,13 g	4,80 h	2,75 j	3,54 b	0
CMM 3165	SVF	1,80 a	A	0	Creme	13,22 c	4,65 i	2,86 i	3,54 b	0,77 b
CMM 3168	SVF	1,82 a	P	3	Salmão	17,80 a	5,52 d	3,25 g	4,02 a	0,78 b
CMM 3175	SVF	1,67 a	A	0	Salmão	13,49 g	4,73 h	2,88 i	4,66 a	1,23 b
CMM 3177	SVF	1,78 a	P	0	Salmão	13,98 f	4,99 f	2,82 i	3,94 a	1,24 b
CMM 3179	SVF	1,87 a	P	0	Salmão	15,66 c	4,96 f	3,20 g	4,24 a	2,31 a
CMM 3180	SVF	1,47 c	P	5	Creme	16,14 c	4,67 i	3,50 e	3,29 b	0,88 b
CMM 3183	SVF	1,80 a	A	0	Branca	17,52 b	4,63 i	3,83 d	2,51 b	0
CMM 3187	SVF	1,69 a	P	0	Salmão	16,20 c	4,69 i	3,49 e	3,30 b	1,98 a
CMM 3188	SVF	1,74 a	P	0	Salmão	14,48 e	4,63 i	3,20 g	3,44 b	2,49 a
CMM 3189	SVF	1,67 a	P	0	Branca	13,98 f	4,16 l	3,40 f	2,81 b	0
CMM 3191	SVF	1,54 b	P	7	Salmão	12,16 i	5,16 f	2,37 m	2,99 b	0
CMM 3194	SVF	1,44 c	A	1	Branca	16,81 b	4,30 l	3,96 c	3,09 b	0
CMM 3196	SVF	1,73 a	P	0	Salmão	13,57 g	5,06 f	2,69 j	3,77 b	1,25 b
CMM 3197	SVF	1,77 a	A	0	Salmão	13,70 g	5,14 f	2,69 j	5,12 a	1,21 b
CMM 3199	SVF	1,69 a	P	0	Salmão	15,13 d	4,69 i	3,24 g	3,43 b	0
CMM 3200	SVF	1,65 b	P	0	Branca	15,27 d	4,56 j	3,36 f	4,14 a	2,97 a
CMM 3202	MAC	1,41 c	P	4	Salmão	14,68 e	4,04 m	3,70 d	3,32 b	1,03 b
CMM 3204	MAC	1,59 b	P	0	Salmão	15,13 d	4,79 h	3,23 g	3,96 a	1,37 b

CMM 3208	MAC	1,82 a	P	0	Salmão	14,81 e	4,87 g	3,07 h	4,36 a	1,03 b
CMM 3209	MAC	1,79 a	P	0	Salmão	14,34 f	5,04 f	2,88 i	4,14 a	2,06 a
CMM 3211	MAC	1,56 b	P	0	Salmão	14,79 e	4,55 j	3,31 g	3,03 b	0
CMM 3213	MAC	1,80 a	P	2	Salmão	14,69 e	5,03 f	2,95 i	4,87 a	0,83 b
CMM 3215	MAC	1,65 b	P	1	Salmão	17,55 a	4,14 l	4,27 b	2,81 b	0,79 b
CMM 3218	MAC	1,73 a	A	0	Creme	14,82 e	5,22 e	2,86 i	3,97 a	1,93 a
CMM 3219	MAC	1,76 a	P	2	Creme	16,12 c	4,92 g	3,31 g	3,27 b	1,04 b
CMM 3220	MAC	1,77 a	P	4	Branca	13,40 g	5,00 f	2,71 j	4,46 a	1,89 a
CMM 3223	MAC	1,54 b	P	4	Creme	16,67 b	5,06 f	3,35 f	3,46 b	0,66 b
CMM 3224	MAC	1,64 b	P	0	Salmão	16,76 b	4,27 l	3,97 c	3,58 b	1,00 b
CMM 3225	MAC	1,65 b	P	5	Salmão	16,15 c	5,38 e	3,08 h	5,06 a	2,30 a
CMM 3226	MAC	1,81 a	P	1	Salmão	15,15 d	5,24 e	2,95 i	4,20 a	1,77 a
CMM 3228	MAC	1,78 a	P	3	Salmão	15,72 c	4,93 g	3,24 g	2,69 b	0
CMM 3231	MAC	1,91 a	P	0	Salmão	15,90 c	4,66 i	3,44 f	4,22 a	0
CMM 3232	MAC	1,79 a	P	1	Salmão	13,56 g	4,69 i	2,91 i	3,70 b	0
CMM 3234	MAC	1,78 a	P	4	Branca	14,21 f	6,05 a	2,39 m	3,13 b	0,78 b
CMM 3235	MAC	1,36 c	P	6	Branca	13,15 g	4,56 j	2,91 i	3,58 b	0
CMM 3238	MAC	1,77 a	A	0	Creme	12,93 h	4,68 i	2,78 j	4,65 a	1,74 a

<sup>1</sup>LC: Local de coleta – VIC: Vicência (PE); SVF: São Vicente Férrer (PE); MAC: Machados (PE).

<sup>2</sup>TCMD: Taxa de crescimento micelial diária dos isolados estimada com os dados de leitura de cinco dias em meio BDA, cultivados a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h.

<sup>3</sup>ME: Microescleródios. A = Ausente; P = Presente.

<sup>4</sup>Quantidade total de setores presentes nas quatro repetições do isolado.

<sup>5</sup>Descrição baseada na carta de cores de Saccardo (1894) e observada nas quatro repetições, aos seis dias após a repicagem. Os isolados foram cultivados em meio BDA, a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h.

<sup>6,7</sup>Média de 100 conídios produzidos em meio BDA, aos sete dias de cultivo a 25 ± 1 °C e 12 h de fotoperíodo.

<sup>8</sup>Média de 100 valores da relação C/L, calculada pela divisão do comprimento pela largura de cada isolado.

<sup>9,10,11</sup>AACPD: Área abaixo da curva de progresso da doença. CF: Com ferimento; SF: Sem ferimento.

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $P = 0,05$ ).

**TABELA 2** - Estimativa da identidade da distância genética de isolados entre três populações de *C. musae* oriundas de municípios de Vicência (Mata Norte Pernambucana), São Vicente Férrer e Machados (Agreste Pernambucano).

População	Vicência	São Vicente Férrer	Machados
Vicência	-	0,5664	0,6944
São Vicente Férrer	0,5684	-	0,7178
Machados	0,3648	0,3315	-

Identidade genética de Nei (1978) (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal).

O valor máximo de 1,0 ocorre quando os mesmos alelos estão nas mesmas frequências, nas populações.

**TABELA 3** - Índices de diversidade genética para isolados de *C. musae* agrupados em três populações regionais: Vicência (Mata Norte Pernambucana), São Vicenter Ferrer e Machados (Agreste Pernambucano).

Sub- população	Tamanho da Amostra ( $n$ ) <sup>a</sup>	Diversidade gênica ( $H$ ) <sup>b</sup>	Genótipos Observados ( $G_{obs}$ ) <sup>c</sup>	Riqueza genotípica $E(g_n)$ <sup>d</sup>	Diversidade genotípica ( $G$ ) <sup>d</sup>	Equitabilidade genotípica ( $E_s$ ) <sup>f</sup>
Vicência	20	0,20	9	9	4(1,92-6,07) <sup>g</sup>	0,855
Machados	20	0,00	1	1	1 (1-1) <sup>g</sup>	1
São Vicente Ferrer	20	0,129	11	11	7,68 (5,13-10,2) <sup>g</sup>	0,933
TOTAL	60	0,312	21	21	7,869 (5,3-10,4) <sup>g</sup>	0,576

<sup>a</sup>Número de isolados.

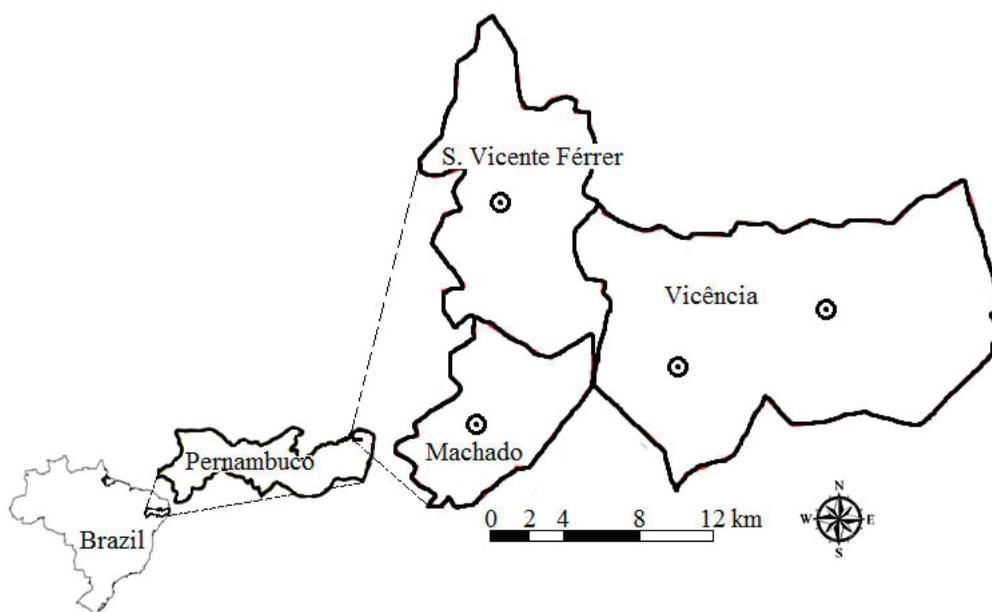
<sup>b</sup>Índice de diversidade genotípica de Stoddart e Taylor (1988).

<sup>c</sup>Diversidade genética de Nei (1973)

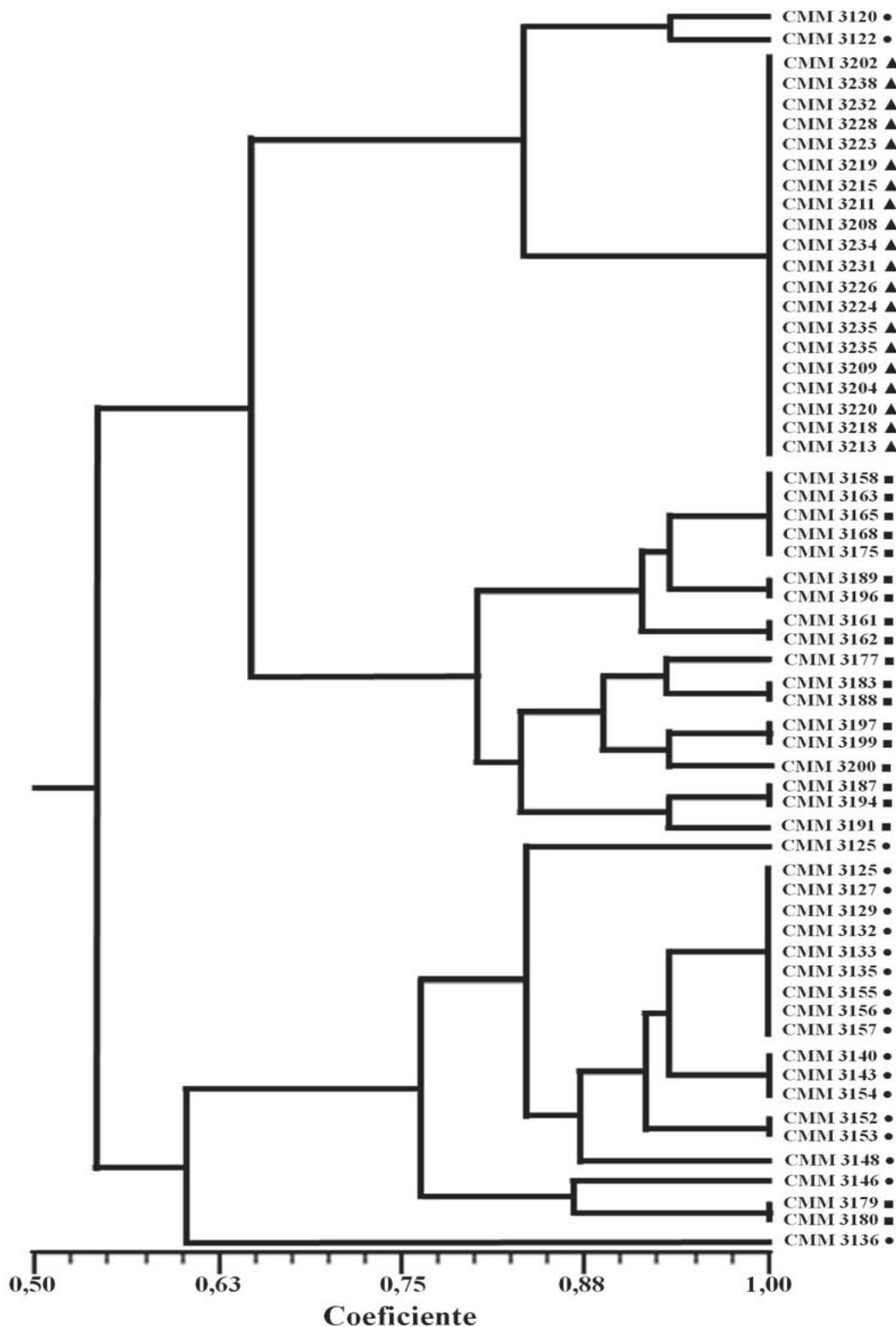
<sup>d</sup>Número esperado de genótipos estimado pelo método de rarefação, ou seja, o número de genótipos esperados ou a estimativa da riqueza para amostras de menor tamanho (GRÜNWARD et al., 2003), e Índice de diversidade genotípica de Stoddart e Taylor (1988).

<sup>e</sup>Índice de equitabilidade (ALATALO, 1981; LUDWIG; REYNOLDS, 1988; GRÜNWARD et al., 2003).

<sup>g</sup>Os números em parênteses indicam intervalo de confiança de 95%, calculado pelo método de *bootstrapping* (1.000 reamostragem), utilizando o procedimento de *bootstrap* acelerado (DIXON, 1993; GRÜNWARD et al., 2003).



**FIGURA 1** - Áreas produtoras de banana amostradas em Pernambuco.



**FIGURA 2** - Dendrograma da análise de UPGMA de isolados de *C. musae* no Estado de Pernambuco:  
 ▲ Machados; ■ São Vicente Férrer e ● Vicência.

## CONCLUSÃO

Em todas as características fenotípicas avaliadas para os isolados de diferentes áreas produtoras de banana do Estado de Pernambuco, foram observados padrões de variação para *C. musae*, embora todos estivessem dentro dos limites estabelecidos para a espécie.

Há variabilidade genética dos isolados de *C. musae* dentro de cada área amostrada, exceto na população de Machados.

Os isolados foram patogênicos em frutos de bananeira e diferiram significativamente quanto à virulência em resposta ao método de inoculação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio institucional, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de mestrado a Paulo César das Mercês Santos (processo n.º: 133094/2009-0). Os professores Marcos Paz Saraiva Câmara e Sami Jorge Michereff agradecem ao CNPq, pela concessão das bolsas de produtividade.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. A.; ROSHDY, S.; AMIN, O. E.; RABANI, M. First morphogenetic identification of the fungal pathogen *Colletotrichum musae* (Phyllachoraceae) from imported bananas in Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 2335-2342, 2010.
- ALATALO, R. V. Problems in the measurement of evenness in Ecology. **Oikos**, Copenhagen, v. 37, p. 199-204, 1981.
- BAILEY, J.A.; JEGER M.J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. p.88-120.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Temporal analysis of epidemics. I: Description and comparison of disease progress curves. In: CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons-Interscience, 1990. p.161-202.
- CASELA, C. R.; FREDERIKSEN, R. A. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residues. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 825-827, 1993.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Doenças da banana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, p. 12-16, 2005.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.v.2, p.99-117.
- COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; ZAMBOLIM, L.; FERREIRA, A. S. A antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 345-354, 2003.
- COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 406-412, 2004.
- COUTO, E. F.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação enzimática em meio sólido específico de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 260-266, 2002.
- DIXON, P. M. The bootstrap and the jackknife: describing the precision of ecological indices. In: SCHEINER, S. M.; GUREVITCH, J. (Ed.). **Design and analysis of ecological experiments**. New York: Chapman & Hall, 1993. p. 290-318.
- FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiology Molecular Plant Pathology**, Maryland, v. 49, p. 395-404, 1996.
- FREEMAN, S.; REDMAN, R. S.; GRANTHAM, G.; RODRIGUEZ, R. J. Characterization of a linear DNA plasmid from the filamentous fungal plant pathogen *Glomerella musae* [Anamorph: *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx.]. **Current Genetics**, Heidelberg, v. 32, p.152-156, 1997.
- GRÜNWARD, N.J.; GOODWIN S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p.738-746, 2003.
- HILL, M. O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 427-432, 1973.
- HO, W.-C.; KO, W.-H. A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 38, p. 41-44, 1997.

- JUNGHANS, D. T.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, W. V.; BARROS, E. G.; ARAUJO, E. F. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 7, p. 243-248, 1998.
- LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. Diversity indices. In: LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. **Statistical ecology: a primer on methods and computing**. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 85-103.
- McDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Dordrecht, v. 124, p.163-180, 2002.
- MEDEIROS L. V.; MACIEL D. B.; MEDEIROS V. V.; HOULLOU KIDOL L. M.; OLIVEIRAN. T. *pelB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. **Genetic Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 661-673, 2010.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J.; FORD, R.; HYDE, K. D.; LUMYONG, P. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 18, p. 117-133, 2005.
- ROCA-MAGALLANES, M. G.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; DAVIDE, L. C.; ROCHA, M. L. M. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 16-20, 2004.
- SACCARDO, P. A. **Chromotaxia seu nomenclator colorum polyglottus additis speciminibus coloratis ad usum botanicorum et zoologorum**. Patavii: Typis Seminarii, 1894. 22 p.
- SCHÄFER, C.; WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, p.124-136, 1992.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, 1977.
- STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, Madison, v. 118, p. 705-711, 1988.
- SU, Y.Y.; NOIREUNG, P.; LIU, F.; HYDE, K. D.; MOSLEM, M. A.; BANKALI, A. H.; ABD-ELSALAM, K. A.; CAI, L. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. **Mycoscience**, Tokyo, v. 52, p. 376-382, 2011.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1992. p. 1-26.
- THAN, P. P.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P. W. J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, p. 562-572, 2008.
- TOZZE JÚNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- UDAYANGA, D.; MANAMGODA, D. S.; LIU, X.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? **Fungal Diversity**, Kunming v. 61, p.165-179, 2013.
- VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIN, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda., v. 2, 2002. p. 839-938.
- ZAKARIA, L.; SAHAK, S.; ZAKARIA, M.; SALLEH, B. Characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. **Tropical Life Sciences Research**, Kedah, v. 20, p. 119-125, 2009.