

# Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas

Hugo J. Tozze Júnior<sup>1</sup>, Margarita B. A. Mello<sup>1</sup>, Nelson S. Massola Júnior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Av. Pádua Dias, 11; 13418-900; Piracicaba-SP.

Autor para correspondência: Nelson S. Massola Júnior. <nmassola@esalq.usp.br>

Data de chegada: 12/11/04. Aceito para publicação em: 27/06/05.

1142

## ABSTRACT

Tozze Jr., H.J.; Mello, M.B.A.; Massola Jr., N.S. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

Anthrachnose is a very frequent disease of solanaceous crops. The causal agent is reported as *Colletotrichum gloeosporioides*. In this work, *Colletotrichum* sp. isolates from hot pepper, sweet pepper and garden egg were characterized based on some of their morphological and physiological characteristics. Morphological characterization was based on the size and shape of conidia and the shape of the apressoria of 30 isolates. Physiological characterization was based on growth in different temperatures, use of different carbon sources and sensitivity to benomyl. Fifteen isolates were cultured on PDA under 10, 15, 20, 25, 28 and 30°C. Use of carbon sources was achieved by culturing 32 isolates on minimal medium supplemented with glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose or starch. To establish benomyl sensitivity, 43 isolates were cultured on PDA supplemented with 0, 1, 10 and 100 µg/mL of the fungicide. Garden egg isolates were less

sensitive to benomyl and showed mainly fusiform conidia, with acute ends, similar to *C. acutatum*. Isolates from hot pepper and sweet pepper were highly sensitive to benomyl and showed mainly cylindrical conidia, with round ends, similar to *C. gloeosporioides*. Irregular, clavate or circular apressoria were observed in all isolates. Starch was the carbon source that led to the greater mycelial development of most isolates. The optimal temperature for almost all isolates was near to 25°C, except for an isolate from hot pepper, which developed better at 28°C. The mycelial growth rates of all isolates, for all tested temperatures, were similar to those showed by *C. acutatum* used as reference. The isolates collected from sweet pepper and hot pepper showed the greatest variability among the studied characteristics. Finally, it was shown that *C. acutatum* is also associated to anthracnose in solanaceous crops.

Additional keywords: variability, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, sweet pepper, hot pepper, garden egg.

## RESUMO

Tozze Jr., H.J.; Mello, M.B.A.; Massola Jr., N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

A antracnose é uma doença freqüente nas hortaliças solanáceas. O agente causal é reportado como o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Neste trabalho caracterizou-se a morfologia e a fisiologia de *Colletotrichum* sp. obtidos de pimenta, pimentão e jiló. A caracterização morfológica se baseou no tamanho e forma dos conídios e na forma dos apressórios de 30 isolados. A caracterização fisiológica foi baseada no crescimento em diferentes temperaturas, utilização de diferentes fontes de carbono e sensibilidade ao fungicida benomyl. Quinze isolados foram cultivados em meio BDA, nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 28, e 30°C. Trinta e dois isolados foram cultivados em meio mínimo acrescido de glicose, frutose, lactose, maltose, sacarose ou amido. Além disso, 43 isolados foram cultivados em meio BDA suplementado com 0, 1, 10 e 100 µg/mL de benomyl. Os isolados de jiló apresentaram

menor sensibilidade ao benomyl e predominância de conídios fusiformes, com ápices afilados e menores dimensões, características semelhantes às citadas para *C. acutatum*. Os isolados de pimentão e pimenta apresentaram alta sensibilidade ao benomyl e predominância de conídios cilíndricos com ápices arredondados, características citadas para *C. gloeosporioides*. Apressórios de formato irregular, circular e ovalado foram observados independente do hospedeiro de origem do isolado. O amido foi a fonte de carbono que proporcionou maior desenvolvimento micelial para a maioria dos isolados. A temperatura ótima de desenvolvimento, para todos os isolados, foi próxima a 25°C, exceto para um único isolado de pimenta, com maior desenvolvimento a 28°C. A velocidade de crescimento micelial para todos os isolados, em todas as temperaturas testadas, foi semelhante à apresentada pelo isolado pa-

drão de *C. acutatum* usado no teste. Os isolados de pimentão e pimenta foram os que mostraram maior variabilidade para as características es-

tudadas. Finalmente, ficou demonstrado que *C. acutatum* também está associado à antracnose nessas solanáceas.

Palavras-chave adicionais: variabilidade, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, pimentão, pimenta, jiló.

Patógenos do gênero *Colletotrichum* têm sido relatados como parasitas de mais de uma centena de angiospermas (2). A antracnose, doença causada por fungos deste gênero, é uma das doenças de maior importância para muitas plantas cultivadas, sendo de ocorrência comum em hortaliças solanáceas, como pimentão (*Capsicum annuum*), pimenta (*Capsicum* spp.) e jiló (*Solanum gilo*).

Os sintomas são caracterizados, em frutos, pela ocorrência de depressão circular de diâmetro variável, ocorrendo, em condições de alta umidade, presença de uma massa alaranjada de esporos, no centro das mesmas. Em condições de clima ameno a quente e épocas chuvosas, quando não se faz um controle adequado, os prejuízos podem chegar a 100% (14). Muitas vezes, devido à ocorrência de infecção latente (11), os sintomas só se manifestam após a colheita e transporte dos frutos, estendendo os prejuízos aos comerciantes e consumidores.

Entre os patógenos do gênero *Colletotrichum*, há especialização para determinados grupos de hospedeiros. Para hortaliças solanáceas, a espécie relatada é *C. gloeosporioides*, espécie que também causa antracnose em alguns frutos como manga, mamão e abacate (14).

Tradicionalmente, características morfológicas como tamanho e forma de conídios e formato de apressórios são utilizados para taxonomia de *Colletotrichum* (18). Esse tipo de avaliação permitiu a Goes & Kimati (8), diferenciar três grupos de *Colletotrichum* associados à queda prematura dos frutos cítricos, o grupo denominado FGG (*C. gloeosporioides*), com apressórios de formato predominante lobulado e conídios de maiores dimensões, o grupo KLA (*C. acutatum*) com apressórios arredondados e conídios de dimensões intermediárias e o grupo SGO (*C. acutatum*) com apressórios de formato clavado e conídios de menores dimensões.

A caracterização baseada unicamente em critérios morfológicos, entretanto, pode não ser suficiente, devido a grande variabilidade destas características para alguns fungos deste gênero, acentuada quando os isolados em estudo são cultivados em meios artificiais (20). Esta variabilidade é citada para *C. gloeosporioides* e algumas confusões, especialmente com *C. acutatum*, têm ocorrido (21). Para minimizar o problema, estudos visando a integração de métodos devem ser considerados (16). Assim, outros critérios também tem sido utilizados na caracterização dessas espécies.

Entre esses critérios, o desenvolvimento distinto de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em diferentes temperaturas tem sido utilizado por alguns autores para separação dessas espécies. Para *C. gloeosporioides* isolado de plantas de citrus e mamão, Adaska-veg & Hartin (1), obtiveram 30°C como temperatura ótima de desenvolvimento, diferindo de *C. acutatum* obtido de pêssego, morango e amêndoa, cujo crescimento micelial foi mais intenso a temperatura de 25°C. Smith & Black (17), utilizando isolados obtidos de morango observaram maior desenvolvimento de *C. gloeosporioides* que *C. acutatum*, quando cultivados à temperatura de 32°C.

Essas espécies também têm sido diferenciadas pela sensibilidade a fungicidas. *C. gloeosporioides* é citado como mais sensível a benomyl, captan e propiconazole, e menos sensível a myclobutanil e tebuconazole que *C. acutatum* (20).

No Brasil, Kuramae-Izioka et al. (13) e também Goes & Kimati (9) verificaram que os isolados de *Colletotrichum* associados à queda prematura dos frutos cítricos podem ser divididos em dois grupos bastante distintos com relação à sensibilidade ao fungicida benomyl. O comportamento diferenciado foi relacionado à presença de duas espécies diferentes de *Colletotrichum* associadas às plantas doentes.

Além da diferenciação de espécies, a sensibilidade diferencial a fungicida também tem sido utilizada como ferramenta para caracterizar a variabilidade entre isolados de uma mesma espécie fúngica. Para *C. gloeosporioides*, um estudo realizado por Badel & Kelemu (4), no CIAT, revelou uma altíssima variabilidade na sensibilidade a benomyl entre setenta e sete isolados sul-americanos, todos coletados em *Stylosanthes*. Comparando com as testemunhas, os autores encontraram redução no crescimento micelial de 21% a 96,4% quando o benomyl foi incorporado ao meio de cultivo na concentração de 0,25 µg/mL. Foi possível relacionar a sensibilidade dos isolados ao local de origem dos mesmos, indicando haver evolução adaptativa deste fungo para diferentes condições ambientais.

Um outro critério que evidencia a variabilidade entre os indivíduos de uma população, é a observação de diferenças fisiológicas quanto à capacidade de utilização de diferentes substratos. Este fato já foi relatado para diversos fungos, inclusive para isolados de *C. gloeosporioides* causadores de antracnose em manga (3). Além de diferenças no crescimento micelial e esporulação em função do substrato usado para o cultivo, diferenças na agressividade ao hospedeiro já foram observadas. Esta característica, citada por Lenn & Brown (15), está intimamente relacionada ao estado nutricional do fungo e o estabelecimento das interações entre o patógeno e seu hospedeiro, afetando processos como germinação dos esporos e desenvolvimento do patógeno.

Esses estudos de caracterização são fundamentais para que se identifique corretamente e se conheça a amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de métodos de controle, seja químico, genético ou cultural, os quais tornam possível o manejo adequado da doença.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de pimentão, pimenta e jiló, por meio de análises morfológicas, fisiológicas e de sensibilidade ao benomyl.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos Isolados

Os 44 isolados utilizados nos experimentos, provenientes de diferentes localidades, foram cedidos por pesquisadores de diferentes instituições, ou obtidos a partir de frutos infectados. O

isolamento foi realizado mediante coleta de esporos diretamente da superfície das lesões, com agulha histológica, e posterior plaqueamento em meio BDA. Para garantir uniformidade genética necessária à realização dos experimentos, foram obtidas culturas monospóricas para todos os isolados (Tabela 1).

### Caracterização Morfológica

Neste experimento, 30 isolados (PI01, PI02, PI03, PI04, PI05, PI06, PI07, PI08, PI09, PI10, PI11, PI15, PI16, PI20, PI41, PI634, PI809, PA01, PA02, PA05, PA06, PA08, PA10, JI02, JI03, JI04, JI05, JI06, JI07, JI11), foram caracterizados quanto ao tamanho e forma dos conídios e quanto ao formato dos apressórios.

Os esporos utilizados foram obtidos de colônias desses isolados, cultivadas por 7 a 10 dias, em meio BDA (Difco®), a 25 ±1°C e sob luz fluorescente contínua.

Para avaliação da morfologia dos conídios, prepararam-se lâminas semipermanentes em lactofenol. Cinquenta conídios de cada isolado tiveram a largura e comprimento medidos indiretamente por meio da mensuração da imagem dos mesmos, projetada em monitor televisivo através de sistema de vídeo-câmara acoplado ao microscópio óptico. O valor correspondente às dimensões das imagens (mm), foi convertido para escala real (µm), correspondente às dimensões dos conídios, por meio da relação obtida entre a escala grafada no instrumento de medida utilizado para mensuração das imagens e a projeção da escala grafada em lâmina micrométrica no monitor televisivo (5). Esses conídios, além das suas dimensões, foram classificados quanto à forma, segundo Sutton (18).

Para a avaliação do formato dos apressórios, foi preparada, para cada isolado, uma suspensão contendo 10<sup>5</sup> conídios/mL. Gotas com 40mL, dessas suspensões, foram depositadas sobre o fundo de placas de poliestireno e mantidas em câmara úmida, a 25±1°C, por 24 h, no escuro. Após este período, cada gota foi fixada com 20mL de lactofenol e uma lamínula foi depositada sobre a mesma. A avaliação consistiu na observação do formato predominante dos apressórios formados por cada isolado, em toda a área delimitada pela lamínula.

### Caracterização fisiológica

Para a caracterização fisiológica, avaliou-se o efeito de diferentes temperaturas, fontes de carbono e doses do fungicida benomyl sobre o desenvolvimento dos isolados.

O desenvolvimento micelial sob diferentes temperaturas foi testado para 15 isolados (PI08, PI20, PI41, PI634, PI809, PA02, PA03, PA06, PA08, PA09, JI02, JI04, JI05, JI07, JI13), além de um isolado de *C. gloeosporioides* obtido de citros e um isolado de *C. acutatum* obtido de morango, utilizados como padrões para essas espécies.

Discos de micélio com 5 mm de diâmetro, coletados nas bordas de colônias com aproximadamente uma semana, foram transferidos para o centro de placas contendo meio BDA (Difco®) e incubadas, em condições de escuro, nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 28 e 30°C por 7 dias. Diariamente, mensuraram-se dois diâmetros perpendiculares da colônia de cada isolado.

No caso da avaliação do desenvolvimento micelial em meio acrescido de diferentes fontes de carbono, utilizaram-se de 32 isolados, (JI02, JI03, JI04, JI05, JI07, PA01, PA02, PA05, PA06, PA08, PA09, PA10, PI01, PI02, PI03, PI04, PI05, PI06, PI07, PI08, PI09, PI10, PI11, PI13, PI15, PI16, PI20, PI30, PI40, PI41, PI634, PI809).

**Tabela 1.** Designação, hospedeiro de origem e procedência de isolados do gênero *Colletotrichum* utilizados neste trabalho.

Isolado	Hospedeiro	Procedência
JI02	Jiló	Londrina-PR
JI03	Jiló	Londrina-PR
JI04	Jiló	Bragança Paulista-SP
JI05	Jiló	Desconhecida
JI06	Jiló	Desconhecida
JI07	Jiló	Campinas-SP
JI08	Jiló	Indaiatuba-SP
JI10	Jiló	Desconhecida
JI11	Jiló	Desconhecida
JI12	Jiló	Desconhecida
JI13	Jiló	Brasília-DF
PA01	Pimenta vermelha	Desconhecida
PA02	Pimenta doce	Desconhecida
PA03	Pimenta vermelha	Pardinho-SP
PA05 <sup>1</sup>	Pimenta vermelha	Recife-PE
PA06 <sup>1</sup>	Pimenta vermelha	Recife-PE
PA08	Pimenta americana	Londrina-PR
PA09	Pimenta americana	Elias Fausto-SP
PA10	Pimenta cambuci	Desconhecida
PA11	Pimenta vermelha	Desconhecida
PI01	Pimentão	Piracicaba-SP
PI02	Pimentão	Campinas-SP
PI03	Pimentão	Jarinu-SP
PI04	Pimentão	Desconhecida
PI05	Pimentão	Desconhecida
PI06	Pimentão	Desconhecida
PI07	Pimentão	Mombuca-SP
PI08	Pimentão	Elias Fausto-SP
PI09	Pimentão	Desconhecida
PI10	Pimentão	Paulínia-SP
PI11	Pimentão	Paulínia-SP
PI12 <sup>1</sup>	Pimentão	Recife-PE
PI13 <sup>1</sup>	Pimentão	Recife-PE
PI15	Pimentão	Piracicaba-SP
PI16	Pimentão	Desconhecida
PI17	Pimentão	Londrina-PR
PI20	Pimentão	Londrina-PR
PI30 <sup>2</sup>	Pimentão	Botucatu-SP
PI40	Pimentão	Brasília-DF
PI41	Pimentão	Brasília-DF
PI634 <sup>3</sup>	Pimentão	Lins – SP
PI809 <sup>3</sup>	Pimentão	Bragança Paulista-SP
PI923 <sup>3</sup>	Pimentão	Clementina-SP
PI2523 <sup>3</sup>	Pimentão	Bragança Paulista-SP

Doadores dos isolados: <sup>1</sup>Prof. Dra. Maria Menezes (UFRPE); <sup>2</sup>Prof. Dr. Nilton L. Souza (FCA/UNESP); <sup>3</sup>Sakata Seed Sudamerica

Neste experimento, discos de micélio foram obtidos das bordas de colônias com 5 dias crescidas em meio mínimo, preparado segundo Kimati (12). Estes discos foram transferidos para os centros de placas contendo o mesmo meio, porém com diferentes fontes de carbono. As fontes utilizadas foram glicose, frutose, lactose, sacarose, maltose e amido. As placas foram incubadas no escuro, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 7 dias e a avaliação foi realizada da mesma forma que no experimento anterior.

Para verificar a sensibilidade ao benomyl, foram utilizados 43 isolados (JI02, JI03, JI04, JI05, JI06, JI07, JI08, JI10, JI11, JI12, PA01, PA02, PA03, PA05, PA06, PA08, PA09, PA10, PA11, PI01, PI02, PI03, PI04, PI05, PI06, PI07, PI08, PI09, PI10, PI11, PI12, PI13, PI15, PI16, PI17, PI20, PI30, PI40, PI41, PI634, PI809, PI922, PI2523).

Esses isolados foram cultivados em meio BDA, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5 dias. Das bordas dessas colônias, foram obtidos discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro, os quais foram transferidos para o centro de placas de BDA (Difco®) suplementado com benomyl, nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , adicionado antes da autoclavagem (7). Meio BDA sem adição de benomyl correspondeu à concentração de 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Essas placas foram incubadas por uma semana a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob condição de escuro contínuo.

As avaliações foram realizadas diariamente, por meio da mensuração de dois diâmetros perpendiculares das colônias. Os dados foram transformados em porcentagem de inibição do crescimento micelial, assumindo como 100% o crescimento verificado na concentração de 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Todos os experimentos acima descritos foram conduzidos segundo o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 4 repetições.

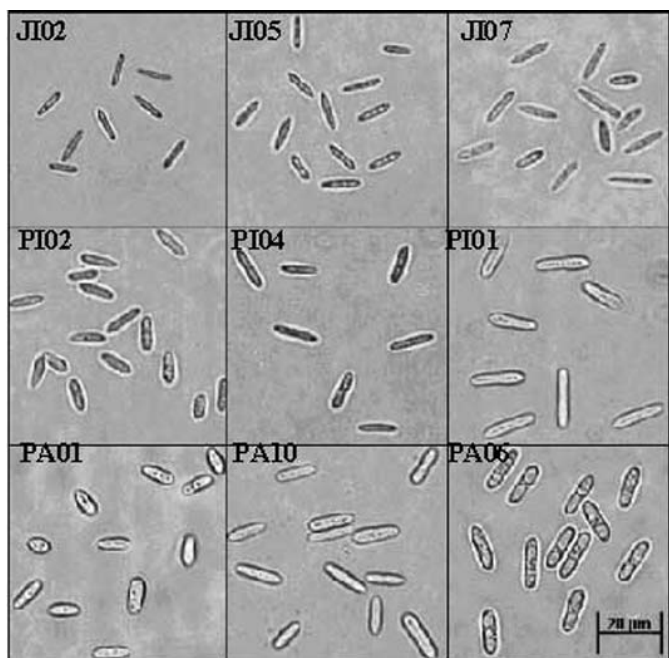
**Caracterização morfológica**

Dentre os isolados estudados, alguns apresentaram morfologia semelhante a *C. acutatum* e outros a *C. gloeosporioides*, segundo Sutton (18) (Tabela 2). De acordo com esse autor, *C. acutatum* apresenta conídios retos, fusiformes e abruptamente afilados nas extremidades, com comprimento variando entre 8,5 e 16,5  $\mu\text{m}$  e largura entre 2,5 e 4,0  $\mu\text{m}$ , enquanto *C. gloeosporioides* possui conídios retos, cilíndricos, de ápices arredondados, com comprimento entre 12 e 17  $\mu\text{m}$  e largura entre 3,5 e 6  $\mu\text{m}$ . Também foram observados conídios afilados somente em uma das extremidades, semelhante ao relatado por Vinnere (20), em isolado padrão de *C. gloeosporioides*.

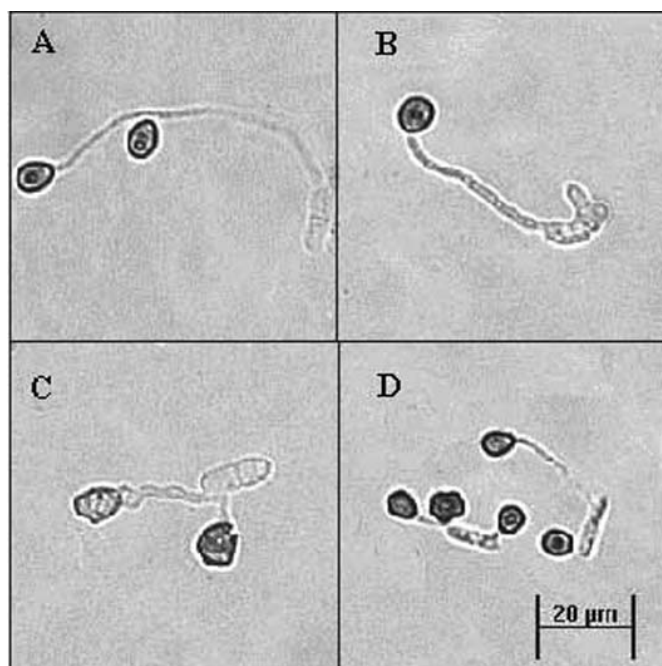
Os isolados de jiló apresentaram esporos com características morfológicas semelhantes às descritas para *C. acutatum* por Sutton (18), ou seja, predominância de conídios com ápices afilados, de menores dimensões que aqueles dos isolados de pimenta e pimentão. Estes apresentaram predominância de esporos cilíndricos com ápices arredondados (Tabela 2 e Figura 1).

Apesar dos formatos predominantes de esporos dos isolados de pimentão e pimenta corresponderem à *C. gloeosporioides*, segundo Sutton (18), grande parte dos isolados demonstraram largura média dos conídios, inferior ao valor mínimo citado pelo autor para essa espécie, e correspondente aos valores citados para *C. acutatum*. O mesmo ocorreu para os isolados PA01 e PI02 com relação ao comprimento médio dos conídios (Tabela 2).

Os formatos de apressórios observados também se enquadram nos padrões citados para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Apressórios ovalados (Figura 2a), circulares (Figura 2b) e



**Figura 1.** Conídios de isolados de *Colletotrichum* obtidos de jiló, pimentão e pimenta.



**Figura 2.** Diferentes formas de apressórios de *Colletotrichum*: (A) ovalado, (B) circular e (C) irregular. (D) Diferentes tipos de apressórios no mesmo isolado. (A) e (B): isolado PA10, (C): isolado PA06, D: isolado PI01.

**Tabela 2.** Características morfológicas de 30 isolados do gênero *Colletotrichum*.

Isolado	Formato dos conídios (%)			Tamanho médio dos conídios (µm)		Formato predominante dos apressórios
	Cilíndrico Ápices arredondados	Fusifforme Ápices afilados	Clavado*	Comprimento Méd. (Mín.-Máx.)	Largura Méd. (Mín.-Máx.)	
JI02	4	96	0	10,2 (8,2-13,7)	2,4 (1,8-3,3)	circular
JI03	0	94	6	12,2 (8,8-15,9)	2,8 (2,2-3,7)	ovalado
JI04	0	100	0	11,1 (13,1-9,2)	2,9 (2,0-3,5)	ovalado
JI05	0	100	0	11,6 (8,8-16,1)	2,8 (2,2-3,3)	irregular
JI06	0	98	2	11,9 (9,2-15,9)	2,7 (2,2-3,1)	ovalado
JI07	2	94	4	12,9 (10,4-15,3)	3,1 (2,4-3,9)	ovalado
JI11	4	90	6	11,3 (9,2-16,3)	2,8 (2,0-3,7)	circular
PA01	100	0	0	10,7 (6,5-15,5)	3,5 (2,6-4,3)	ovalado
PA02	100	0	0	12,8 (9,4-18,2)	3,1 (2,6-3,9)	ovalado
PA05	100	0	0	14,4 (12,4-16,1)	4,0 (3,3-4,7)	irregular
PA06	100	0	0	14,7 (12,6-16,5)	4,2 (3,7-5,1)	irregular
PA08	90	8	2	13,0 (8,8-19,2)	3,1 (2,4-4,1)	ovalado
PA10	96	0	4	13,9 (10,8-19,2)	3,8 (2,9-4,7)	circular
PI01	82	0	18	15,3 (12,2-19,2)	3,7 (2,9-4,5)	irregular
PI02	82	12	6	11,6 (9,8-14,3)	3,1 (2,4-3,9)	circular
PI03	86	8	6	13,0 (9,6-15,9)	3,1 (2,0-3,9)	ovalado
PI04	74	22	4	13,1 (11,0-15,7)	2,9 (2,4-3,7)	ovalado
PI05	82	10	8	13,4 (10,2-18,0)	3,1 (2,4-4,1)	ovalado
PI06	86	8	6	13,5 (11,2-15,9)	3,3 (2,8-3,9)	ovalado
PI07	100	0	0	12,0 (9,4-19,4)	3,1 (2,6-4,0)	ovalado
PI08	80	6	14	13,8 (11,2-17,5)	3,0 (2,6-4,1)	ovalado
PI09	90	10	0	13,5 (8,8-21,6)	3,3 (2,6-4,1)	ovalado
PI10	96	4	0	13,5 (10,0-20,8)	3,0 (2,2-4,7)	ovalado
PI11	86	12	2	13,0 (10,0-20,8)	3,3 (2,6-4,1)	circular
PI15	96	0	4	12,3 (8,8-25,5)	3,3 (2,4-4,1)	ovalado
PI16	68	8	24	13,3 (9,4-20,4)	3,4 (2,4-5,7)	ovalado
PI20	80	14	6	12,2 (9,4-14,5)	2,8 (2,2-3,7)	ovalado
PI41	92	0	8	13,6 (9,8-18,2)	3,5 (2,5-4,7)	ovalado
PI634	84	12	4	12,8 (10,2-19,0)	2,8 (2,4-3,4)	ovalado
PI809	94	4	2	13,4 (8,8-16,3)	3,4 (2,5-4,3)	ovalado

\* Conídios afilados em uma das extremidades e arredondados na outra.

irregulares (Figura 2c) foram encontrados, independente do hospedeiro de origem do isolado (Tabela 2). Para alguns dos isolados (PI01, PA02, JI11, JI05) a presença dos três tipos de apressórios (Figura 2d) foi constatada.

Analisando-se conjuntamente os resultados apresentados na Tabela 2 e Figuras 1 e 2, é possível notar que os isolados testados, de modo geral, se dividem em 2 grupos. Aqueles provenientes de jiló possuem características semelhantes a *C. acutatum*, enquanto que aqueles provenientes de pimentão e pimenta se enquadram melhor nas características de *C. gloeosporioides*, segundo Sutton (18). Entretanto, mesmo dentro desses grupos, foi grande a variação encontrada nas características estudadas, dificultando a delimitação precisa de espécies.

Este fato tem sido relatado por outros autores e é verdadeiro

especialmente para o gênero *Colletotrichum*. Formas intermediárias são comuns, devido à influência do ambiente, principalmente. Além disso, sabe-se que existe variação na morfologia dos conídios em função do local onde são produzidos. Conídios produzidos em acérvulos são mais uniformes que aqueles produzidos em conidióforos fialídicos (16), freqüentemente produzidos em meio de cultura. Dessa forma, cada isolado de *Colletotrichum* é constituído por uma população de biótipos, tornando muito difícil a definição do conceito morfológico de espécie (6).

#### Caracterização fisiológica

Em relação ao desenvolvimento sob diferentes temperaturas, todos os isolados apresentaram maiores velocidades de crescimento à temperatura de 25°C, com exceção de PA06, com maior

desenvolvimento a 28°C (Figura 3). Comparando-se aos isolados utilizados como padrão, estes isolados apresentaram temperatura ótima para o desenvolvimento micelial mais próximas daquelas apresentadas por *C. gloeosporioides* que *C. acutatum*. Para o isolado padrão de *C. gloeosporioides* o maior desenvolvimento micelial ocorreu entre 25 e 28°C, similar ao descrito por Vinnere (20), que relata temperatura ótima, para esta espécie entre 26-28,5°C. Entretanto, o isolado padrão de *C. acutatum* apresentou temperatura ótima de desenvolvimento micelial próxima a 28°C, diferindo da faixa de temperatura ótima citada pelo mesmo autor, para essa espécie, correspondente a 25-26,5°C.

Nas diferentes temperaturas, a velocidade de crescimento micelial de todos os isolados foi semelhante ao isolado de *C. acutatum* usado como padrão, diferindo do isolado de *C. gloeosporioides*, o qual apresentou maior velocidade de crescimento micelial que os demais isolados.

A 25°C, a menor amplitude de variação entre isolados de um mesmo hospedeiro, foi constatada para aqueles obtidos de jiló, revelando maior semelhança entre os mesmos para essa característica.

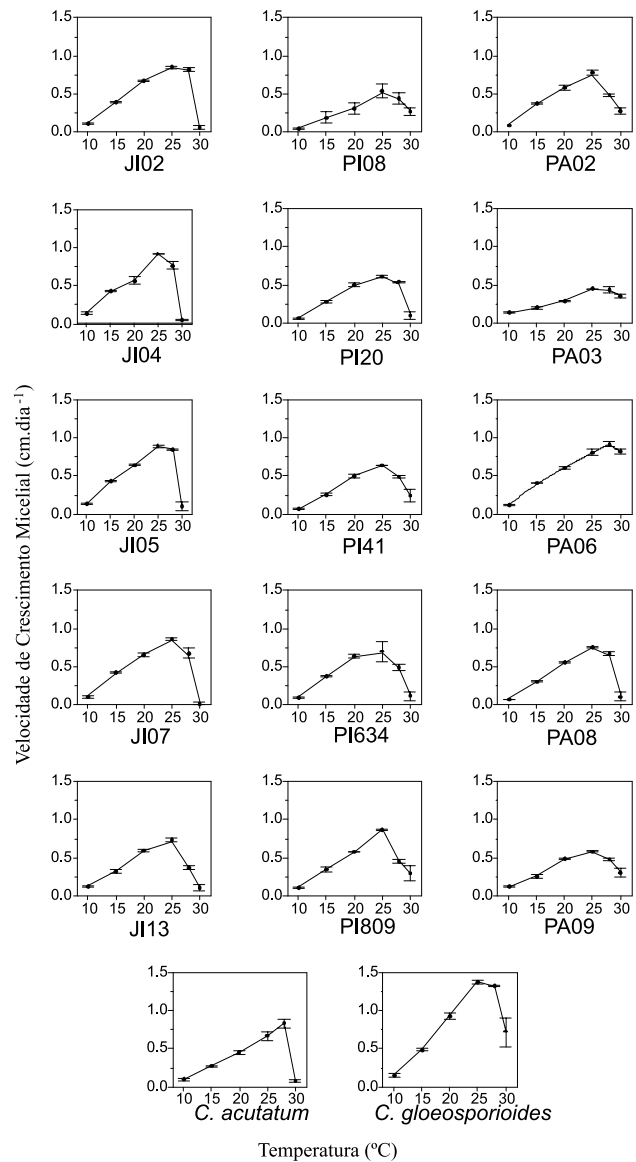
Entre as fontes de carbono utilizadas, o amido proporcionou o maior crescimento micelial para maior parte dos isolados estudados (Tabela 3), semelhante à constatação de Assis et al. (3). Esses autores obtiveram maiores valores para crescimento micelial, esporulação e peso seco, além de maior patogenicidade, para isolados de *C. gloeosporioides* quando estes foram cultivados em meio batata-ágar-amido, em relação àqueles crescidos em meio com maltose ou glicose. Os autores atribuíram este fato à lentidão na hidrólise do amido, promovendo menor acúmulo de ácidos no substrato do que fontes de carbono mais simples.

O menor desenvolvimento micelial, considerando isolados de pimentão e pimenta, não foi ocasionado por uma única fonte de carbono, entretanto, todos os isolados obtidos de jiló apresentaram menores velocidades médias de desenvolvimento micelial, quando cultivados em meio acrescido de frutose, embora, estatisticamente, semelhantes aos apresentados em algumas outras fontes de carbono.

Nas diferentes fontes de carbono, os isolados PI01, PI13 e PI30 apresentaram desenvolvimento superior aos demais. Essa alta velocidade de desenvolvimento micelial é citada como característica da espécie *C. gloeosporioides*, a qual apresenta maior velocidade de crescimento que *C. acutatum* (10).

Os isolados provenientes de pimentão e pimentas foram mais sensíveis ao fungicida Benomyl, apresentando ED<sub>50</sub> em concentrações abaixo de 1µg/mL, com exceção dos isolados PI40 e PI41, que apresentaram ED<sub>50</sub> na faixa entre 1 e 10 e 10 e 100µg i.a./mL, respectivamente (Tabela 4). Os isolados provenientes de frutos de jiló foram menos sensíveis ao fungicida, com ED<sub>50</sub> situado em concentrações maiores que 100 µg i.a./mL, com os isolados JI04 e JI11 como exceções, com ED<sub>50</sub> entre 10 e 100 µg i.a./mL e o isolado JI12 com ED<sub>50</sub> entre 1 e 10 µg i.a./mL.

Resultados semelhantes a esses foram obtidos para isolados de *Colletotrichum* associados à queda prematura dos frutos cítricos por Kuramae-Izioka et al. (13) e Goes & Kimati (9). Os autores dividiram esses isolados em dois grupos distintos com relação à sensibilidade ao fungicida benomyl, um deles contendo isolados altamente sensíveis, apresentando crescimento nulo em meio com 1µg i.a./mL, e o outro, isolados que cresciam em meio com concentrações elevadas desse fungicida. Além dessa diferença na sensibilidade a benomyl, esses dois grupos apre-



**Figura 3.** Velocidade de crescimento micelial de isolados do gênero *Colletotrichum* em diferentes temperaturas

sentavam outras características particulares. Assim, o grupo dos isolados sensíveis apresentava crescimento rápido em meio de cultura, com colônias de coloração cinza escuro, enquanto que os isolados menos sensíveis apresentavam crescimento mais lento e colônias de coloração cinza clara a alaranjada. Utilizando outras análises, como morfologia de conídios e apressórios, testes de patogenicidade e análise molecular, identificou-se como *C. gloeosporioides* os isolados do grupo sensível a benomyl e como *C. acutatum* os isolados que cresciam em meio suplementado com o fungicida.

Analisando-se os resultados do presente trabalho, com base nas informações dos trabalhos acima mencionados, é possível fazer duas interpretações distintas. A primeira delas refere-se aos grupos de isolados com sensibilidades diferenciadas a benomyl. Nota-se que, no presente trabalho, também foi possível distinguir dois grupos com relação à sensibilidade ao benomyl. O comportamento dos isolados provenientes de jiló muito se assemelhou ao grupo dos isolados menos sensíveis de citros,

**Tabela 3.** Crescimento micelial de isolados do gênero *Colletotrichum* em meio mínimo, acrescido de diferentes fontes de carbono.

Isolado	Velocidade de crescimento micelial (cm/dia)*													
	AMIDO		FRUTOSE		GLICOSE		LACTOSE		MALTOSE		SACAROSE	MÉDIA		
JI02	0,535	A lm	0,457	B de	0,457	B de	0,435	BC kl	0,448	BC fgh	0,459	B ij	0,459	def
JI03	0,574	A jkl	0,537	A bcd	0,537	A bcd	0,543	A cdefghijk	0,576	A cdef	0,546	A efghi	0,552	bcdef
JI04	0,576	A ijkl	0,525	B bcde	0,525	B bcde	0,476	C ghijkl	0,493	BC defg	0,478	C ghij	0,502	bcdef
JI05	0,555	A klm	0,507	AB bcde	0,507	AB bcde	0,466	B ijkl	0,489	B efg	0,477	B hij	0,493	cdef
JI07	0,528	A lm	0,502	AB bcde	0,502	AB bcde	0,444	BC jkl	0,407	C gh	0,521	A efghi	0,464	def
PA01	0,501	B nm	0,501	B bcde	0,501	B bcde	0,590	A cdefg	0,498	B defg	0,523	B efghi	0,519	bcdef
PA02	0,653	AB efgh	0,501	D bcde	0,501	D bcde	0,632	B abcd	0,673	A c	0,571	C cdefg	0,602	bcd
PA05	0,562	A kl	0,612	A bc	0,612	A bc	0,285	C m	0,562	A cdefg	0,423	B jk	0,471	def
PA06	0,621	A fghij	0,475	AB cde	0,475	AB cde	0,412	AB l	0,298	B h	0,502	AB efghij	0,453	ef
PA08	0,742	A cd	0,610	B bc	0,610	B bc	0,650	AB abcd	0,643	AB cde	0,651	AB bcd	0,649	b
PA09	0,648	A efgh	0,501	D bcde	0,501	D bcde	0,548	CD defghijk	0,607	AB cde	0,530	CD efghi	0,566	bcdef
PA10	0,671	A ef	0,532	D bcd	0,532	D bcd	0,573	C cdefghi	0,621	B cde	0,496	E efghij	0,579	bcde
PI01	0,860	AB b	0,860	B a	0,860	B a	0,714	B ab	1,023	A a	0,734	C b	0,811	a
PI02	0,612	A ghijk	0,582	AB bcd	0,582	AB bcd	0,470	C hijkl	0,549	AB cdefg	0,518	BC efghi	0,530	bcdef
PI03	0,748	A c	0,606	BC bc	0,606	BC bc	0,626	BC bcd	0,620	BC cde	0,575	C cdef	0,640	bc
PI04	0,748	A c	0,621	BC b	0,621	BC b	0,626	BC bcd	0,627	BC cde	0,662	B bc	0,639	bc
PI05	0,633	A efgh	0,503	B bcde	0,503	B bcde	0,610	A bcde	0,618	A cde	0,577	AB cde	0,589	bcde
PI06	0,673	A ef	0,526	D bcde	0,526	D bcde	0,592	BC cdef	0,621	AB cde	0,544	CD efghi	0,586	bcde
PI07	0,447	A n	0,389	B e	0,389	B e	0,449	A jkl	0,442	A gh	0,352	B k	0,427	f
PI08	0,641	A efh	0,533	CD bcd	0,533	CD bcd	0,540	CD efghijk	0,596	B cdef	0,502	D efghij	0,561	bcdef
PI09	0,599	A hijk	0,525	BC bcde	0,525	BC bcde	0,503	CD efghijkl	0,561	AB cdefg	0,542	BC fgh	0,532	bcdef
PI10	0,626	A fghij	0,539	C bcd	0,539	C bcd	0,574	B cdefghi	0,588	B cdef	0,519	C efghi	0,562	bcdef
PI11	0,648	A efgh	0,525	C bcde	0,525	C bcde	0,607	AB cde	0,623	A cde	0,558	BC defgh	0,594	bcde
PI13	0,860	B b	0,930	A a	0,930	A a	0,659	D abc	0,853	BC b	0,966	A a	0,846	a
PI15	0,630	A efghij	0,559	A bcd	0,559	A bcd	0,485	A fghijkl	0,444	A fgh	0,575	A cdef	0,534	bcdef
PI16	0,685	A de	0,498	C bcde	0,498	C bcde	0,550	B cdefghijk	0,573	B cdef	0,541	B efghi	0,567	bcdef
PI20	0,666	A efg	0,550	AB bcd	0,550	AB bcd	0,419	B kl	0,641	A cde	0,564	AB defgh	0,570	bcdef
PI30	1,030	A a	1,000	A a	1,000	A a	0,742	C a	0,859	B b	0,969	A a	0,897	a
PI40	0,653	A efgh	0,446	D de	0,446	D de	0,583	B cdefgh	0,512	C defg	0,482	CD fghij	0,526	bcdef
PI41	0,653	A efgh	0,530	D bcd	0,530	D bcd	0,616	AB bcde	0,648	A cd	0,566	CD defg	0,601	bcde
PI634	0,608	AB ghijk	0,550	C bcd	0,550	C bcd	0,557	C cdefghij	0,640	A cde	0,578	BC cde	0,589	bcde
PI809	0,666	A efg	0,514	C bcde	0,514	C bcde	0,610	AB bcde	0,640	AB cde	0,562	BC defgh	0,601	bcde
<b>Média</b>	0,652	A	0,564	AB	0,564	AB	0,550	B	0,547	B	0,564	AB		

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula (na horizontal) e minúscula (na vertical) não diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

identificados como *C. acutatum*. Por outro lado, a maior sensibilidade ao produto sugere que os isolados de pimentão e pimentas possam ser de *C. gloeosporioides*. A outra interpretação leva em consideração que os isolados identificados como *C. gloeosporioides* nos trabalhos acima mencionados foram completamente inibidos pela concentração de 1µg/mL de benomyl. Portanto, poder-se-ia concluir que todos os isolados testados neste trabalho possuem comportamento, para essa característica, semelhante a *C. acutatum*, uma vez que nenhum foi inibido completamente naquela concentração. Neste último caso, as diferenças detectadas nas sensibilidades ao fungicida poderiam refletir adaptações diferenciadas dos isolados provenientes de jiló em relação aos de pimentão e pimentas.

O gênero *Colletotrichum* é reconhecidamente um dos mais importantes grupos de agentes causais de doenças em plantas no mundo todo. Entretanto, a delimitação de espécies e a precisa caracterização da variabilidade em isolados deste gênero é, muitas vezes, difícil (6, 16). Isto decorre da enorme plasticidade fenotípica exibida por esse gênero, levando, frequentemente, a resultados conflitantes e difíceis de interpretar. Quando se comparam os resultados da caracterização morfológica, fisiológica e de sensibilidade ao benomyl obtidos neste trabalho, percebe-se que diversos isolados não mantêm sempre o mesmo comportamento, ora se assemelhando a *C. gloeosporioides*, ora a *C. acutatum*. Essas variações no comportamento são atribuídas à plasticidade fenotípica

**Tabela 4.** Inibição “in vitro” do crescimento micelial e intervalo do ED<sub>50</sub> para isolados de *Colletotrichum* cultivados em meio BDA acrescido de benomyl.

Isolados	% de Inibição *			Intervalo do ED <sub>50</sub> (µg/mL)
	1µg/mL	10µg/mL	100µg/mL	
JI 02	43,1	41,1	44,6	> 100
JI 03	43,8	39,5	49,1	> 100
JI 04	49,68	47,91	51,38	10 – 100
JI 05	41,8	36,4	45,4	>100
JI 06	39,5	35,14	44,03	>100
JI 07	35,16	37,88	42,42	>100
JI 08	32,71	38,61	43,75	> 100
JI 10	36,81	35,7	44,23	> 100
JI 11	32,83	47,39	55	10 – 100
JI 12	44,89	84,78	100	1 – 10
PA 01	62,3	69,2	69,2	0 – 1
PA 02	58,2	61,8	67,3	0 – 1
PA 03	50,9	54,95	54,95	0 – 1
PA 05	91,32	91,32	91,32	0 – 1
PA 06	90,43	90,43	90,3	0 – 1
PA 08	52,61	55,45	63,98	0 – 1
PA 09	56,6	56,6	64,43	0 – 1
PA 10	54,46	55,59	61,03	0 – 1
PA 11	84,17	90,50	90,50	0 – 1
PI 01	82,9	87,5	89,2	0 – 1
PI 02	51,9	59,6	61,5	0 – 1
PI 03	58,5	62,3	66,0	0 – 1
PI 04	53,7	61,1	62,9	0 – 1
PI 05	54,5	60	65,4	0 – 1
PI 06	55,5	61,1	66,6	0 – 1
PI 07	56,42	59,7	63,48	0 – 1
PI 08	57,9	63,1	64,9	0 – 1
PI 09	51,1	53,5	65,1	0 – 1
PI 10	50	51,97	53,37	0 – 1
PI 11	51,02	58,16	61,9	0 – 1
PI 12	53,2	60,0	65,5	0 – 1
PI 13	77,7	85,27	100	0 – 1
PI 15	55,83	59,35	60,7	0 – 1
PI 16	57,57	60,3	64,27	0 – 1
PI 17	76,55	88,33	100	0 – 1
PI 20	56,3	61,8	60	0 – 1
PI 30	86,67	90	93,33	0 – 1
PI 40	46,96	52,70	54,05	1 – 10
PI 41	42,05	49,24	54,83	10 – 100
PI 634	54,74	61,77	64,62	0 – 1
PI 809	57,97	62,12	64,67	0 – 1
PI 922	50,25	53,56	63,18	0 – 1
PI 2523	52,96	55,92	59,7	0 – 1

\* Em relação à concentração de 0 µg/mL

mencionada. Entretanto, em todas as caracterizações realizadas, houve sempre comportamentos semelhantes aos de *C. acutatum*. Este fato sugere que esta espécie também está associada à antracnose das solanáceas, além de *C. gloeosporioides* originalmente descrito na literatura. De fato, Tozze Jr. et al. (19) já haviam relatado o envolvimento de *C. acutatum* com essa doença, utilizando a técnica de PCR com iniciadores específicos para essa espécie.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Natália A. R. Peres, da University of Florida, Gult Cost Research and Education Center, Dover, USA, pelo fornecimento dos isolados padrões de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* utilizados nos testes de caracterização fisiológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaskaveg, J.E.; Hartin, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.9, p.979-987, 1997.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996. 868p.
- Assis, T.C.; Menezes, M.; Andrade, D.E.G.T.; Coelho, R.S.B.; Oliveira, S.M.A. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, n.2., p.208-212, 2001.
- Badel, J.L.; Kelemu, S. Variación en crecimiento, esporulación y sensibilidad a benlate de aislamientos suramericanos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Pasturas Tropicales**, Cali, v.19, n.1, p.2-9, 1997.
- Caldari Júnior, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Cannon, P.F.; Bridge, P.D.; Monte, E. Liking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M.B. *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. St. Paul: APS Press, 2000. cap.5, p.1-20.
- Ghini, R.; Kimati, H. Ocorrência de linhagens de *Botrytis squamosa* resistentes a fungicidas do grupo benzimidazóis e dicarboximidas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.15, n.3/4, p.246-256, 1989.
- Goes, A.; Kimati, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.23, n.1, p.4-10, 1997.
- Goes, A.; Kimati, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos de citros: resistente ou insensível a benomyl? **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.24, n.3/4, p.246-253, 1998.
- Gunnel, P.S.; Gluber, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, New Orleans, v.84, n.1, p.157-165, 1992.
- Jeffries, P.; Dodd, J.C.; Jeger, M.J.; Prumley, R.A. *Colletotri-*



- chum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v.39, n.3, p.343-366, 1990.
12. Kimati, H. **Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.)Wils [sensu ARX,1975]**, 1975. 103f. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
  13. Kuramae-Izioka, E.E.; Lopes,C.R.; Souza, N.L.; Machado, M.A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht , v. 103, n. 4, p. 323-329, 1997.
  14. Kurozawa, C.; Pavan, M.A. Doenças das solanáceas. In: Kimati,H.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2., cap.62, p.665-675.
  15. Lenn, J.M.; Brown, A.E. Factors influencing the germination of pathogenic and weakly pathogenic isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaf surfaces of *Stylosanthes guianensis*. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, n.2, p.227-232, 1991.
  16. Menezes, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, supl., p.523-524, 2002.
  17. Smith, B.J.; Black, L.L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolates from strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, n.1. p.69-76, 1990.
  18. Sutton, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, 1992. p.1-26.
  19. Tozze Júnior, H.J.; Bueno, C.R.; Massola Júnior, N.S. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* sp de hortaliças solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.1, p.73-73, 2004. (Resumo).
  20. Vinnere, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science ad Technology**, Uppsala, v.917, 72p., 2004. Disponível em: <[http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn\\_se\\_uu\\_diva-3902.pdf](http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn_se_uu_diva-3902.pdf)>. Acesso em: 21 out. 2004.
  21. Yang, H.A.; Sweetingham, M.W. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.49, n.8, p.1213-1223, 1998.