

Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie

Ilka Márcia Ribeiro de Souza Serra¹, Rildo Sartori Barbosa Coelho², Gabriela de Moraes Guerra Ferraz³, Angélica Virgínia Valois Montarroyos³ e Denise de Santos Silva²

¹Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Estadual do Maranhão, CP 2002, 65041-970; ²Departamento de Agronomia e Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE; ³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

Autor para correspondência: Ilka Márcia R. de S. Serra. (ilka.tt@gmail.com)

Data de chegada: 31/10/2008. Aceito para publicação em: 26/01/2011.

1625

RESUMO

Serra, I.M.R.S.; Coelho, R.S.B.; Ferraz, G.M.G.; Montarroyos, A.V.V. & Silva, D.S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.1, p.42-51, 2011.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade fenotípica e patogênica de 40 isolados de *Colletotrichum* obtidos de mangueira no Nordeste do Brasil e identificar diferentes espécies desse fitopatógeno, agente causal de antracnose, através da análise da sequência da região ITS do rDNA. Quanto à caracterização morfológica e cultural, as colônias dos isolados apresentaram diversidade em relação à cor e aspecto, sendo mais comum à cor branco-cinza, característica de *Colletotrichum gloeosporioides*. Não foram observadas variações expressivas na morfologia dos 40 isolados. Os conídios apresentaram-se, predominantemente, hialinos e unicelulares, com formato variando de bastonete para cilíndrico. Todos os isolados produziram apressórios variados em formato e quantidade e apenas 10 isolados apresentaram setas. Para efeito do crescimento micelial e taxa de crescimento foi possível classificar os isolados em sete grupos. Vinte e dois isolados

exibiram taxa de crescimento >10mm/dia, considerada típica da espécie *C. gloeosporioides*. Os isolados foram patogênicos em folhas destacadas de mangueira, induzindo sintomas de antracnose, na forma de manchas escuras levemente deprimidas, e apresentando variações quanto à agressividade. Na identificação específica, baseada na análise da sequência ITS do DNA ribossomal, 36 isolados amplificaram com o oligonucleotídeo CgInt, específico para *C. gloeosporioides* e o ITS4. Os isolados CM1, CM4, CM5 e CM10, não amplificaram produtos para nenhum dos oligonucleotídeos específicos, sendo identificados como *Colletotrichum* spp. Os resultados desse trabalho demonstraram que isolados de *Colletotrichum*, obtidos de mangueira, apresentam ampla variabilidade morfofisiológica e patogênica. E que, possivelmente, existe mais de uma espécie de *Colletotrichum* que causa antracnose em mangueira no Nordeste do Brasil.

Palavras-chave adicionais: *Mangifera indica*, patogenicidade, rDNA, *Glomerella cingulata*

ABSTRACT

Serra, I.M.R.S.; Coelho, R.S.B.; Ferraz, G.M.G.; Montarroyos, A.V.V. & Silva, D.S.. Phenotypic and pathogenic diversity in *Colletotrichum*, causal agent of anthracnose in mango and identification of species. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.1, p.42-51, 2011.

The present work aimed to study the phenotypic and pathogenic diversity of 40 *Colletotrichum* isolates obtained from mango trees in the Northeast of Brazil and to identify different species of this pathogen, incitant of anthracnose, through the analysis of the ITS sequence of the ribosomal DNA. As for the morphologic and cultural characterization, the colonies of the isolates presented diversity in relation to color and aspect, being more common the color white-ash, characteristic of *C. gloeosporioides*. Expressive variations were not observed in the morphology of the 40 isolates. The conidia were predominantly hyaline and unicellular varying in shape from rod to cylindrical. All isolates produced appressoria of different shapes and in different amounts, and 10 isolates showed setae. In relation to mycelial growth and growth rate the isolates were classified in seven groups. Twenty-two isolates

exhibited growth rate >10mm/day, considered typical of *C. gloeosporioides* species. The isolates were pathogenic to detached leaves of mango, inducing anthracnose symptoms such as dark lesions slightly depressed, and presenting variations of aggressiveness. In the specific identification based on the analysis of the ITS sequence of the ribosomal DNA, 36 isolates amplified with the primer CgInt, specific for *C. gloeosporioides* and with the primer ITS4. Isolates CM1, CM4, CM5 and CM10 did not amplify products for none of the specific primers, being identified as *Colletotrichum* spp. The results of this work demonstrate that *Colletotrichum* isolates obtained from mango trees present large morphophysiological and pathogenic variability, and also that, possibly exists more than one species of *Colletotrichum* that causes anthracnose in mango trees in the Northeast of Brazil.

Palavras-chave adicionais: *Mangifera indica*, pathogenicity, rDNA, *Glomerella cingulata*

A antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, é uma das doenças mais comuns e importantes em frutíferas, apresentando ampla distribuição geográfica e ocasionando problemas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Ocorre tanto nas fases de desenvolvimento vegetativo, como reprodutiva de diversos hospedeiros, sendo mais severa quando afeta os frutos (13).

No Brasil, a antracnose está disseminada em todas as regiões de cultivo da mangueira (*Mangifera indica* L.), constituindo fator limitante na exportação de frutos (9). O patógeno ataca folhas, ramos, inflorescências, pedúnculos e frutos, ocasionando prejuízos que variam em função do grau de suscetibilidade da planta hospedeira e das condições ambientais, sendo mais acentuados em épocas úmidas com temperaturas amenas (27). No Nordeste, a mangueira é cultivada em todos os estados, em particular nos perímetros irrigados da região semi-árida, que apresentam excelentes condições para o desenvolvimento da cultura e obtenção de elevada produtividade e qualidade dos frutos. Nessa região, as principais áreas cultivadas de manga estão localizadas na Bahia, Pernambuco e Ceará. Nesses Estados, a antracnose é a doença mais importante da mangueira, por força da elevada incidência e severidade, principalmente em frutos durante o desenvolvimento e na pós-colheita.

O agente causal de antracnose em mangueira e outras fruteiras tropicais no Brasil como abacate, acerola, goiaba, caju, mamão, maracujá, citrus e outras, tem sido referido como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (22). Relatos sobre doenças causadas por *C. gloeosporioides* em diversos hospedeiros têm demonstrado freqüentemente que o fungo apresenta ampla variabilidade morfológica, fisiológica e patogênica (2, 3, 28). O gênero *Colletotrichum* é notoriamente variável em relação a determinadas características, destacando-se a patogenicidade, demonstrada em diversos patossistemas como *C. graminicola* (Ces.) G.W.Wils. - sorgo (8); *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. - feijoeiro comum (5); *C. acutatum* J.H. Simm. e *C. gloeosporioides* - morangueiro (16). Portanto a ocorrência de populações de *Colletotrichum* spp. com comportamento patogênico diferenciado pode determinar variações na expressão da doença, interferindo na adoção de estratégias de controle (13).

A identificação da espécie de *Colletotrichum* responsável por antracnose em frutíferas é fundamental para o desenvolvimento e implantação de métodos eficientes no controle da doença. Freeman (14) descreve que várias espécies de *Colletotrichum* podem afetar um mesmo hospedeiro, citando como exemplos à antracnose em abacateiro e mangueira, causadas por *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, e em morangueiro por *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* Brooks e *C. acutatum*. Por outro lado, segundo este mesmo autor, uma única espécie de *Colletotrichum* pode infectar diferentes hospedeiros.

Tradicionalmente, a caracterização e determinação taxonômica de *Colletotrichum* spp. têm sido quase que exclusivamente feita por meio de características morfológicas, culturais e patogênicas, como morfologia de conídios, formação de apressórios, presença e ausência de setas, presença e ausência de teleomorfo, coloração de colônias, taxa de crescimento micelial, além da gama de hospedeiro (14, 29). Atualmente, técnicas biotecnológicas têm sido empregadas para auxiliar nos estudos taxonômicos de *Colletotrichum* spp. Estas incluem análises da seqüência de nucleotídeos da região espaçadora transcrita (ITS) do DNA ribossomal (rDNA), de genes da β -tubulina 2 (*tub2*) e histona 4 (*his4*), glutamina sintase (GS), genes introns gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH), DNA mitocondrial (mtDNA) e a utilização de marcadores como RAPDs, RFLPs e AFLPs (15, 32).

A eficiência de métodos de controle mais utilizados para a

antracnose da mangueira depende do conhecimento da variabilidade e caracterização a nível específico do agente causal. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade fenotípica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* obtidos de mangueiras no Nordeste do Brasil e identificar diferentes espécies desse fitopatógeno agente causal de antracnose em mangueira, mediante a análise da seqüência da região ITS do rDNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas fúngicas e condições de crescimento

Os isolados foram obtidos de lesões típicas de antracnose de folhas de mangueira, provenientes de várias regiões do Nordeste brasileiro, conforme mostra a Tabela 1.

Após as etapas rotineiras de limpeza e desinfestação do material, fragmentos da região de transição, entre a lesão e os tecidos sadios (23) foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e, em seguida, incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob alternância luminosa (12h de claro/ 12h de escuro). Posteriormente, fragmentos do micélio de colônias características do gênero *Colletotrichum*, foram transferidos para tubos contendo BDA e incubados nas mesmas condições já citadas. Os isolados foram codificados e, as culturas puras preservadas em tubos de ensaio contendo BDA, sob refrigeração (5°C).

Morfologia e características culturais de *Colletotrichum* em BDA

Para os estudos morfológicos, todos os isolados de *Colletotrichum* foram avaliados quanto ao aspecto da colônia, forma e dimensões de conídios, formação de apressórios e ausência e presença de setas, empregando-se a técnica de microcultura (23) para auxiliar as análises morfológicas. A incubação foi realizada em condições de laboratório (25°C , aproximadamente), durante o período de três a sete dias, sob condição de alternância luminosa (12h claro/ 12h escuro). Foram medidos cinquenta conídios de cada isolado. As dimensões desses conídios foram determinadas em microscópio óptico com aumento de 400x, utilizando-se de uma ocular micrométrica, anotando-se o comprimento e a largura média, além da amplitude de variação. Foi também observado o formato predominante dos mesmos, obtendo-se no final uma avaliação da variabilidade morfológica dos conídios.

Observações quanto à produção de apressórios também foram avaliadas, por meio da técnica de microcultura, permitindo a visualização da forma, coloração e quantidade formada, sendo documentados por fotomicrografias. Com relação às características das colônias, culturas dos quarenta isolados foram preparadas em BDA e incubadas, durante sete dias, nas mesmas condições citadas anteriormente. Quatro repetições foram preparadas para cada isolado. A avaliação consistiu na observação do aspecto topográfico das colônias e coloração das mesmas.

Caracterização fisiológica e patogênica de *Colletotrichum* obtidos de mangueira

Crescimento micelial em BDA

Para o estudo das características fisiológicas, discos da cultura de cada isolado (5,0mm de diâmetro), oriundos de colônia jovem, foram transferidos para o centro de placa de Petri, contendo meio BDA, as quais foram incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob condição de alternância luminosa (12h claro/ 12h escuro). Foi observado o crescimento do micélio,

Tabela 1 - Origens geográficas e genótipos hospedeiros de mangueira dos 40 isolados de *Colletotrichum* coletados no Nordeste do Brasil, usados no estudo.

Isolados	Origem Geográfica/ Município/Estado	Região	Genótipos Hospedeiros
CM1	Veneza-MA	Sertão maranhense	Manga Rosa
CM2	Casa Forte-PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM3	Veneza-MA	Sertão maranhense	Manga Rosa
CM4	Veneza-MA	Sertão maranhense	Manga Rosa
CM5	Veneza-MA	Sertão maranhense	Manga Espada
CM6	Cordeiro-PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM7	Camaragibe-PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM8	Camaragibe-PE	Metropolitana Recife	Manga Rosa
CM9	Paulista-PE	Zona da Mata Norte	Manga Espada
CM10	Paulista-PE	Zona da Mata Norte	Manga Comum
CM11	Paulista-PE	Zona da Mata Norte	Manga Rosa
CM12	Paulista-PE	Zona da Mata Norte	Manga Espada
CM13	Primavera-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM14	Dois Irmãos PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM15	Bonança-PE	Zona da Mata Norte	Manga Espada
CM19	Ipojuca-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM22	Ipojuca-PE	Zona da Mata Sul	Manguito
CM23	Ipojuca-PE	Zona da Mata Sul	Manga Comum
CM24	Ipojuca-PE	Zona da Mata Sul	Manga Jasmin
CM26	Camaragibe-PE	Metropolitana Recife	Manga Maranhão
CM27	Cabo Sto. Agostinho-PE	Zona da Mata Sul	Manga Comum
CM29	Cabo Sto. Agostinho-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM30	Cabo Sto. Agostinho-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM31	Cabo Sto. Agostinho-PE	Zona da Mata Sul	Manga Comum
CM32	Cabo Sto. Agostinho-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM34	Cabo Sto. Agostinho-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM35	Cabo Sto. Agostinho-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM37	Ipojuca-PE	Zona da Mata Sul	Manga Espada
CM38	Dois Irmãos-PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM39	Dois Irmãos-PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM40	Goiana-PE	Zona da Mata Norte	Manga Espada
CM41	Goiana-PE	Zona da Mata Norte	Rosari
CM43	Goiana-PE	Zona da Mata Norte	Manga Rosa
CM44	Goiana-PE	Zona da Mata Norte	Manga Espada
CM45	Igarassu-PE	Metropolitana Recife	Rosari
CM52	Camaragibe-PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM55	Lagoa grande-PB	Brejo Paraibano	Manga Espada
CM56	Campus UEMA-MA	Metropolitana São Luís	Manga Rosa
CM57	Dois Irmãos-PE	Metropolitana Recife	Manga Espada
CM58	Campus UFPB-PB	Brejo Paraibano	Manga Espada

medindo-se o diâmetro da colônia em intervalos de 24 horas, com auxílio de uma régua milimetrada, tomando-se duas medições, em sentidos diametralmente opostos. Em seguida, foi estabelecida a média de crescimento linear para cada placa. As leituras foram iniciadas 48 horas após a instalação do experimento, até a colonização de toda a superfície do meio de cultura, que correspondeu a sete dias de incubação. Para avaliação do crescimento micelial foram consideradas as leituras feitas até o quinto dia de incubação. O cálculo da taxa de crescimento foi realizado de acordo com Lilly & Barnett (20).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. As médias dos dados obtidos foram comparadas utilizando-se o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum*

Na avaliação do comportamento patogênico, os 40 isolados foram inoculados em folhas jovens, destacadas de mangueira (cultivar-Espada), usando-se discos de micélio e meio de cultura (5mm de

diâmetro) retirados de culturas do patógeno, com cinco dias de idade, crescidas em BDA. A inoculação foi realizada utilizando método com ferimento, produzido com estilete flambado, depositando-se o inóculo em três pontos da superfície foliar. Após a inoculação, as folhas foram acondicionadas em bandejas plásticas forradas com papel de filtro e mantidas em câmara úmida até o aparecimento dos sintomas. Para as testemunhas repetiram-se os mesmos procedimentos, porém sendo depositados somente discos de meio de cultura BDA. As bandejas foram mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob condição de alternância luminosa (12h claro/ 12h escuro).

A avaliação foi realizada aos sete dias após a inoculação, por meio da leitura do diâmetro das lesões e observação das características das lesões.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições (representadas por bandejas), e cada parcela constituída por cinco folhas/bandeja, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Identificação específica do agente causal da antracnose em mangueira

Extração e quantificação do DNA fúngico

Os isolados de *Colletotrichum* foram cultivados em 150mL de Batata-dextrose (BD) a temperatura de 25°C , sob condição de alternância luminosa (12h claro/ 12h escuro), com suaves agitações duas vezes ao dia, durante seis dias. O DNA dos isolados foi extraído a partir de 250 mg de micélio de acordo com o protocolo modificado descrito por Faleiro et al. (10) O micélio foi coletado por filtração e triturado em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido. Posteriormente, adicionou-se o tampão de lise (50mM Tris-HCL, pH 8,0; 50mM EDTA; NaCl 5M; 3% dodecil sulfato de sódio (SDS); 1% de b-mercaptoetanol) seguido de 30 minutos de incubação a 70°C com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 10 minutos e aos sobrenadantes foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A seguir as amostras foram agitadas por suaves inversões e novamente centrifugadas. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e o processo de desproteinização foi repetido.

Para a precipitação do DNA foram adicionados aos sobrenadantes finais, NaCl 5M e isopropanol refrigerado. Os tubos foram mantidos por 2 horas a -20°C , após essa etapa foi repetida a centrifugação. Os precipitados foram lavados duas vezes com etanol 70% e secos a temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos foram ressuspensos em 150 mL de água contendo RNase na concentração de 40mg/mL e colocados em banho-maria a 37°C por 1 hora para ressuspensão e digestão dos ácidos ribonucléicos. O DNA foi quantificado visualmente em gel de agarose a 0,8% e corado em solução de brometo de etídio a 0,05 mg/L, a partir da comparação com um padrão de DNA (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

Análise da seqüência ITS do DNA ribossomal

Os 40 isolados de *Colletotrichum* obtidos de mangueira foram submetidos a reação de PCR, com iniciadores específicos ("primer" ITS1). Para *C. gloeosporioides* foi utilizado o primer (CgInt): 5'-GACCCTCCCGGCCTCCCGCC-3' e para *C. acutatum* o primer (CaInt2): 5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3' (34). Os oligonucleotídeos foram usados em conjunto com o primer universal conservado ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3'), por corresponder a uma seqüência contida na subunidade 28S do DNA ribossomal.

A reação de amplificação foi realizada segundo protocolo descrito por Afanador-Kafuri et al. (2), para um volume final de 25mL contendo 10 a 70ng de DNA genômico, 0,25mM de cada oligonucleotídeo, 200mM de dNTPs, 1,5mM MgCl_2 , 1,25 U *Taq* DNA polymerase e água ultra pura para completar o volume final. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos, e um ciclo de 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose a 1,5% em tampão Tris-acetate-EDTA. A eletroforese horizontal ocorreu a 80V até que a linha de frente migrasse 5cm, em seguida o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5mg/l, tendo os produtos sido visualizados sobre luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia e características culturais de *Colletotrichum* em BDA

Os conídios, oriundos dos isolados, quando observados ao microscópio binocular, apresentaram-se hialinos, unicelulares, cilíndricos ou retos e com ápice obtuso. Estes foram produzidos em acérvulos, na grande maioria dos isolados, em sucessão na extremidade de conidióforos filídicos ou no ápice de setas e apresentaram grande variação em relação ao comprimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Menezes & Hanlin (24, 25) quando estudaram a variabilidade de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de abacate de diferentes regiões do Nordeste. As dimensões dos conídios estão apresentadas na Tabela 2. Os isolados CM7, CM13, CM15, CM22, CM24, CM38, CM52 e CM55 foram os que apresentaram maiores médias de comprimento, destacando-se o CM52 e CM13, cujos comprimentos (18,0mm) foram superiores ao padrão frequentemente encontrado. Este resultado sugere a ocorrência de segregação genética, a qual pode estar relacionada à condição nuclear dos conídios, fato este já relatado por Serra & Silva (29) e Menezes & Hanlin (25). O comprimento médio dos conídios variou de 10,8 a 18,0mm e a largura de 3,2 a 4,3mm. Esta variação, observada em todos os isolados, está dentro dos limites indicados para *C. gloeosporioides*, segundo Freeman (14). Neste trabalho os isolados apresentaram conídios uninucleados em 90% dos casos. TeBeest (33), realizando estudos com três espécies de *Colletotrichum*, observou a presença de conídios uninucleados (97%), binucleados (2%) e trinucleados (1%) e segundo o autor o número de núcleos variou com o tipo de meio de cultura usado no estudo.

Embora não seja de valor taxonômico, a presença de setas foi observada em 25% dos isolados. Estas se apresentaram retas, septadas e escuras, com ápice mais claro. Os isolados que exibiram estas estruturas foram CM1, CM3, CM4, CM5, CM6, CM31, CM39, CM56, CM57 E CM58. Todos os isolados produziram apressórios variados em formato e quantidade, com coloração castanha escura e forma ovalada e irregular, não sendo possível à utilização dessa estrutura para diferenciar os isolados, segundo Menezes & Hanlin (24). A forma ovalada ou irregular foi a que predominou, sendo possível observar outras formas. Quanto à caracterização quantitativa de formação dos apressórios, os isolados foram agrupados como de produção abundante (...), com produção mediana (..) e com produção escassa (.), conforme mostra a Tabela 2.

As colônias apresentaram grande diversidade com relação à cor e aspecto, de acordo com os diferentes isolados, sendo predominante à cor branco-cinza, característica de *C. gloeosporioides* (Figura 1). Em alguns casos foi visível a produção de massa de conídios distribuídas em anéis concêntricos na superfície da colônia, de coloração alaranjada

Tabela 2. Características morfológicas e médias do comprimento e largura dos conídios de 40 isolados de *Colletotrichum* associados à antracnose em mangueira.

Isolados	Comprimento(μm) Média (amplitude)	Largura(μm) Média (amplitude)	(%) Conídios cilíndricos	Setas*	Apressórios*
CM1	13,6 (9,9 - 16,5)	3,8 (3,3 - 4,9)	100	+	..
CM2	15,1 (13,2 - 19,8)	3,5 (2,6 - 4,9)	100	-	.
CM3	11,6 (9,9 - 13,2)	4,3 (3,3 - 4,9)	70	+	...
CM4	14,6 (13,2 - 18,1)	3,6 (3,3 - 4,9)	100	+	.
CM5	14,0 (13,2 - 16,5)	3,6 (3,3 - 4,9)	100	+	.
CM6	11,7 (9,9 - 14,8)	3,3 (2,6 - 3,3)	100	+	..
CM7	17,5 (13,2 - 21,4)	3,4 (3,3 - 4,9)	100	-	..
CM8	15,6 (13,2 - 18,1)	3,3 (3,3 -)	100	-	...
CM9	13,0 (9,9 - 14,8)	3,5 (3,3 - 4,9)	100	-	...
CM10	13,4 (11,5 - 14,8)	3,5 (3,3 - 4,9)	100	-	...
CM11	15,1 (13,2 - 18,1)	3,3 (2,6 - 4,9)	70	-	.
CM12	13,7 (9,9 - 16,5)	3,9 (3,3 - 6,6)	100	-	..
CM13	18,0 (16,5 - 19,8)	3,3 (2,6 - 4,9)	100	-	..
CM14	12,2 (6,6 - 14,8)	3,5 (3,3 - 4,9)	100	-	..
CM15	17,7 (16,5 - 23,1)	3,3 (2,6 - 3,3)	100	-	.
CM19	15,1 (11,5 - 19,8)	3,3 (3,3 -)	100	-	...
CM22	17,1 (14,8 - 19,8)	3,3 (3,3 -)	100	-	..
CM23	10,8 (8,25 - 13,2)	4,1 (3,3 - 4,9)	100	-	.
CM24	17,5 (13,2 - 23,1)	3,3 (3,3 -)	80	-	.
CM26	16,4 (13,2 - 21,4)	3,3 (2,6 - 3,3)	70	-	...
CM27	14,2 (13,2 - 16,5)	3,4 (3,3 - 4,9)	100	-	..
CM29	15,0 (14,8 - 18,1)	3,4 (3,3 - 4,9)	100	-	.
CM30	14,2 (13,2 - 16,5)	3,4 (3,3 - 4,9)	100	-	.
CM31	14,5 (11,5 - 16,5)	3,3 (3,3 -)	100	+	...
CM32	14,7 (13,2 - 16,5)	3,3 (3,3 -)	100	-	..
CM34	16,8 (14,8 - 19,8)	3,3 (2,6 - 3,3)	100	-	...
CM35	16,5 (13,2 - 19,8)	3,3 (3,3 -)	100	-	...
CM37	14,2 (13,2 - 18,1)	3,6 (3,3 - 4,9)	100	-	.
CM38	17,6 (14,8 - 21,4)	3,3 (3,3 -)	100	-	..
CM39	11,9 (9,9 - 14,8)	3,3 (3,3 - 4,9)	100	+	...
CM40	15,7 (13,2 - 18,1)	3,3 (3,3 -)	100	-	..
CM41	16,2 (13,2 - 18,1)	3,3 (3,3 -)	100	-	...
CM43	16,5 (13,2 - 19,8)	3,3 (3,3 -)	100	-	...
CM44	15,5 (13,2 - 16,5)	3,3 (3,3 -)	100	-	.
CM45	16,5 (13,2 - 19,8)	3,3 (2,6 - 3,3)	100	-	..
CM52	18,1 (16,5 - 19,8)	3,3 (2,6 - 3,3)	100	-	...
CM55	17,0 (14,8 - 19,8)	3,3 (3,3 -)	100	-	.
CM56	10,9 (9,9 - 14,8)	3,6 (3,3 - 4,9)	100	+	...
CM57	13,2 (9,9 - 14,8)	3,3 (3,3 -)	100	+	.
CM58	11,4 (6,6 - 16,5)	3,4 (3,3 - 4,9)	100	+	...

* Indica (+) presença (-) ausência de setas. Produção de apressórios (...) abundante, (..) mediana e (.) escassa.

(CM31- isolado de manga espada). Algumas culturas formaram peritécios, porém com baixa produção de conídios, enquanto que outras produziram conídios em abundância, mas não formaram peritécios. As colônias variaram também quanto à formação de micélio aéreo flocoso sem conídios aparentes, a micélio escasso e submerso, porém bem esporulado, aos sete dias de incubação, destacando-se os isolados CM1, CM3, CM4, CM5, CM10, CM12, CM23, CM31, CM39,

CM56 E CM57 Johnston & Jones (17), estudando a caracterização cultural, como aspecto de colônias, de diversos isolados de *Colletotrichum* obtidos de fruteiras, na Nova Zelândia, puderam reconhecer 16 grupos distintos. Estudos semelhantes foram realizados por outros pesquisadores, os quais classificaram isolados de espécies de *Colletotrichum* em grupos e subgrupos, em função da variação observada em cultura (1,19).

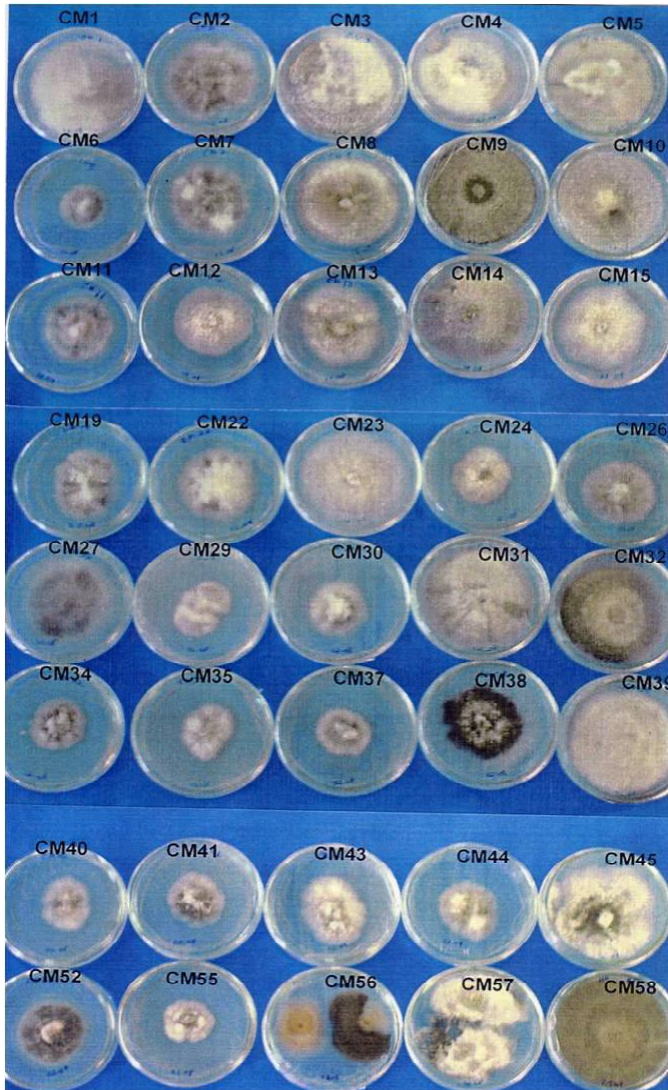


Figura 1. Aspecto cultural das colônias de 40 isolados de *Colletotrichum* obtidos de mangueira, em meio de Batata-Dextrose-água (BDA), aos sete dias de incubação.

Caracterização fisiológica e patogênica de *Colletotrichum* spp obtido de mangueira

Crescimento micelial em BDA

Os resultados obtidos para o crescimento micelial dos diferentes isolados de *Colletotrichum*, obtidos de mangueira, estão representados na Tabela 3. O confronto das médias pelo teste Scott-knott, a 5% de probabilidade, para efeito do crescimento micelial dos isolados, aos cinco dias de incubação, revelou diferenças significativas entre as médias, permitindo a classificação em sete grupos. Os 22 isolados pertencentes aos grupos 1, 2, 3, 4 e 5, tiveram crescimento compatíveis com aqueles observados para a espécie de *C. gloeosporioides*. Nos grupos 6 e 7, compreendendo 18 isolados, foram verificados os menores crescimento, destacando-se o isolado CM43, proveniente de Goiana-PE, que apresentou o menor crescimento micelial (2,69cm). Estes resultados, conforme Adaskaveg & Foster (1), podem sugerir o enquadramento dos isolados dos grupos 6 e 7 na espécie *C. acutatum* em função do crescimento reduzido. Entretanto, Freeman *et al.* (13) relatam que isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de amendoeira, tem

crescimento que não diferem de *C. acutatum*, proveniente de morangueiro. Assim o crescimento micelial não constitui caráter decisivo na determinação de espécies de *Colletotrichum*, mas pode revelar a ocorrência de variabilidade intraespecífica, visto que a condição heterozigótica ou reprodução sexuada têm possibilidades de gerar novos biótipos na população com comportamento variável.

Quanto à taxa de crescimento micelial, avaliada em mm/dia, a análise de agrupamento com base no teste de Scott-Knott possibilitou a classificação dos isolados em sete grupos (Tabela 3). A exemplo do que ocorreu em relação ao crescimento micelial, 22 isolados, pertencentes aos grupos 1, 2, 3 e 4, exibiram taxa de crescimento >10mm/dia, considerada como típica da espécie *C. gloeosporioides*, segundo Adaskaveg & Foster (1). Os isolados CM12 e CM38, do grupo 4, e os demais isolados dos grupos 5, 6 e 7, tiveram crescimento inferior a 10mm, exibindo, portanto, características de *C. acutatum*. O CM43 apresentou a menor taxa de crescimento (1,44 mm/dia), constituindo o único representante no grupo 7. Do mesmo modo que no crescimento micelial, a taxa de crescimento não deve ser considerada caráter de valor taxonômico essencial, podendo, no entanto, caracterizar variabilidade intraespecífica em *Colletotrichum* spp.

Patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum*

Todos os isolados foram patogênicos em folhas destacadas de mangueira, induzindo sintomas de antracnose na forma de manchas escuras levemente deprimidas. A avaliação da patogenicidade dos isolados, por meio do diâmetro das lesões, apresentou diferenças estatísticas significativas entre isolados (Tabela 3). Com base no teste de Scott-Knott foi possível separar os isolados em cinco grupos de acordo com a agressividade. Os grupos 1 e 2 foram os mais agressivos, no entanto, compreenderam apenas 6 isolados, conforme mostra a Figura 2. O grupo 5, contendo 15 isolados, foi o menos agressivo. O isolado CM31 apresentou o menor diâmetro de lesão, sendo considerado o menos agressivo.

A variabilidade patogênica é um parâmetro de grande importância na caracterização de isolados de *Colletotrichum* e, em função disto, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos levando em consideração esta característica (2, 16). Souza & Sobrinho (30), estudando isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de mangueira, quanto às características morfológicas e patogênicas, evidenciaram variabilidade entre os isolados. Avaliando a patogenicidade de 290 isolados de *C. gloeosporioides*, provenientes de abacateiro e mangueira, Swart (31) mostrou que houve formação de grupos baseado na agressividade dos isolados. Os obtidos de mangueira formaram três grupos, comparado com os de abacateiro que formaram quatro grupos, sendo comprovada variação na agressividade dos isolados.

Exceto pelos isolados mais agressivos, coletados em Goiana-PE (CM40, CM41 e CM43) e Cabo de Santo Agostinho-PE (CM29 e CM35), não foi possível estabelecer uma relação entre a origem geográfica e agressividade dos isolados. Resultados semelhantes foram obtidos por Assunção (4) ao não detectar agressividades diferenciadas em isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de cebola, com relação às suas origens.

A análise de Correlação de Pearson para as variáveis, crescimento micelial, taxa de crescimento e diâmetro da lesão (Tabela 3) evidenciou correlação positiva (0,9357) significativa ao nível de 1% de probabilidade, entre crescimento e taxa de crescimento e correlação negativa entre crescimento micelial e diâmetro da lesão (-0,5390) e taxa de crescimento e diâmetro da lesão (-0,5989). Na primeira correlação, de classificação de

Tabela 3 - Crescimento micelial aos cinco dias de incubação, taxa de crescimento micelial e patogenicidade dos 40 isolados de *Colletotrichum* obtidos de mangueira.

Isolados	Crescimento micelial (cm)	Taxa de crescimentomicelial (mm/dia)			Patogenicidade	
		GC	¹	GTC	Diâmetro da lesão (cm)	GA
CM14	7,13 a	1	15,84 a	1	1,07 e	5
CM5	6,77 a	1	14,16 b	2	1,26 d	4
CM9	6,73 a	1	14,16 b	2	0,97 e	5
CM39	6,67 a	1	14,88 a	1	0,87 e	5
CM57	6,89 a	1	15,84 a	1	1,61 c	3
CM4	6,56 b	2	15,60 a	1	1,00 e	5
CM30	6,45 b	2	13,44 b	2	1,09 e	5
CM8	6,32 b	2	14,16 b	2	0,98 e	5
CM1	6,30 b	2	14,40 b	2	1,07 e	5
CM56	6,12 b	2	12,96 c	3	1,78 c	3
CM10	5,96 c	3	13,92 b	2	1,15 d	4
CM31	5,92 c	3	10,10 d	4	0,74 e	5
CM3	5,88 c	3	12,96 c	3	0,95 e	5
CM58	5,64 c	3	13,44 b	2	1,42 c	3
CM24	5,44 d	4	12,96 c	3	1,49 c	3
CM13	5,16 d	4	12,00 c	3	0,83 e	5
CM11	5,12 d	4	10,80 d	4	1,05 e	5
CM7	4,84 e	5	11,04 d	4	0,91 e	5
CM2	4,66 e	5	12,24 c	3	0,84 e	5
CM12	4,51 e	5	9,84 d	4	1,47 c	3
CM15	4,49 e	5	10,56 d	4	1,52 c	3
CM23	4,45 e	5	8,16 e	5	1,21 d	4
CM34	4,10 f	6	7,44 e	5	1,37 d	4
CM22	4,07 f	6	10,80 d	4	1,29 d	4
CM38	4,07 f	6	9,84 d	4	1,01 e	5
CM41	4,05 f	6	7,68 e	5	2,15 a	1
CM26	4,01 f	6	10,10 d	4	1,17 d	4
CM35	3,97 f	6	7,92 e	5	1,86 b	2
CM6	3,95 f	6	7,20 e	5	1,66 c	3
CM52	3,89 f	6	12,24 c	3	1,98 b	2
CM29	3,60 g	7	5,52 f	6	1,89 b	2
CM19	3,52 g	7	6,96 e	5	1,24 d	4
CM45	3,52 g	7	6,00 f	6	1,13 d	4
CM32	3,40 g	7	5,76 f	6	1,34 d	4
CM37	3,36 g	7	7,92 e	5	1,65 c	3
CM55	3,25 g	7	4,80 f	6	1,47 c	3
CM40	3,24 g	7	6,00 f	6	2,17 a	1
CM44	3,16 g	7	5,28 f	6	1,69 c	3
CM27	3,12 g	7	7,20 e	5	1,44 c	3
CM43	2,69 g	7	1,44 g	7	2,22 a	1
C.V.	7,59		11,35		14,46	

* Txc = (C96-C48)/T (Lilly & Barnet, 1951). Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (no sentido vertical), pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste de Scott-Knot ao nível de 5% de probabilidade.

¹GC - grupo de crescimento micelial; GTC - grupo de taxa de crescimento; GA - grupo de agressividade.

magnitude muito alta (26), confirmou-se o resultado esperado, visto que a taxa de crescimento é calculada em função do crescimento dos isolados. Entretanto, nas demais correlações, verificaram-se, em nível de classificação substancial, que quanto menor o crescimento ou taxa de crescimento, maior a agressividade do isolado. Isto pode ser destacado em relação aos isolados CM40, CM41 e CM43 que exibiram baixas taxas de crescimento e maiores diâmetros de lesões. Este resultado sugere a possibilidade do uso do crescimento micelial em BDA para classificação e seleção de isolados mais agressivos de *Colletotrichum* em mangueira, devendo-se, porém, ser exigida correlação de maior magnitude que a observada. Em alguns fungos fitopatogênicos, correlações variáveis têm sido relatadas entre o crescimento micelial e agressividades, sendo não significativas como nos patossistemas *C. gloeosporioides* - mangueira (3) e *Fusarium udum* Butler - guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) (18) e significativas observadas nos patossistemas *Phytophthora cinnamomi* Rands -*Eucalyptus smithii* R.T. Baker (r=0,51), segundo Linde *et al.* (21) e *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & Hallet (= *Fusarium nivale*) - trigo (r= -0,80) (6).

Análise da seqüência ITS do DNA ribossomal

O DNA de 40 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de mangueira foi amplificado com os oligonucleotídeos específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt) e *C. acutatum* (CaInt2), conforme mostra a Tabela 4. Os produtos de PCR dos isolados representativos da população estão apresentados na Figura 3. Todos os isolados amplificaram com os oligonucleotídeos CgInt e o ITS4, com exceção dos isolados CM1, CM4, CM5 e CM10, que não amplificaram

produtos para nenhum dos oligonucleotídeos específicos, sendo identificados como *Colletotrichum* spp., apesar de terem sido caracterizados como *C. gloeosporioides*, com base nas características morfológicas. Resultados semelhantes foram encontrados por Afanador-Kafuri *et al.* (2) que observaram incongruência entre critérios morfológicos e moleculares para identificação de espécies de *Colletotrichum* de tamarineira, mangueira e maracujazeiro.

Os oligonucleotídeos específicos para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* tem sido bastante usados em vários estudos para identificação de populações de *Colletotrichum* que causam antracnose em vários hospedeiros. Por exemplo, Forster & Adaskaveg (12) usando os mesmos oligonucleotídeos, confirmou que *C. acutatum* é a espécie causal de antracnose em amendoeira na Califórnia. Brown *et al.* (7) confirmaram que *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* são responsáveis por antracnose em Citrus na Florida. Estudos realizados por Afanador-Kafuri *et al.* (2) demonstraram que os oligonucleotídeos CaInt2 e CgInt foram eficientes para diferenciar isolados de *Colletotrichum* obtidos de tamarineira e mangueira a nível de espécie. Baseado na análise da região ITS- rDNA, com os oligonucleotídeos específicos, os autores puderam confirmar que todos os isolados de tamarineira, foram identificados como *C. acutatum* e que os obtidos de mangueira, foram identificados como *C. gloeosporioides*.

Estudos com antracnose em mangueira demonstraram que o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes e rentáveis tem sido facilitado devido a uma determinação precisa da etiologia de doenças causadas por *Colletotrichum* e um melhor conhecimento da

Tabela 4 - Identificação espécie-específica de isolados de *Colletotrichum* obtidos de mangueira a partir da amplificação da região ITS do rDNA, usando os primers CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4^a.

Isolado	Reação dos primers		Espécies	Isolado	Reação dos primers		Espécies
	CgInt	CaInt2			CgInt	CaInt2	
CM1	-	-	<i>Colletotrichum</i> sp.	CM27	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM2	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM29	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM3	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM30	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM4	-	-	<i>Colletotrichum</i> sp.	CM31	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM5	-	-	<i>Colletotrichum</i> sp.	CM32	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM6	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM34	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM7	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM35	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM8	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM37	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM9	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM38	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM10	-	-	<i>Colletotrichum</i> sp.	CM39	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM11	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM40	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM12	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM41	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM13	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM43	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM14	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM44	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM15	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM45	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM19	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM52	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM22	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM55	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM23	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM56	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM24	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM57	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>
CM26	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>	CM58	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>

^aPrimer CgInt (*C. gloeosporioides*) e CaInt2 (*C. acutatum*) foram usados conjuntamente com o primer ITS4 para amplificação da região ITS e identificação das espécies de *Colletotrichum*. A amplificação do DNA fúngico de cada isolado foi designada (+) positiva ou (-) negativa.



Figura 2. Patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* CM40, CM41, CM43 e CM52, pertencentes aos grupos de agressividade 1 e 2, mostrando manchas escuras e levemente deprimidas.

interação patógeno-hospedeiro, que determina o sucesso na patogênese (2, 11, 31, 34). Nesse sentido os resultados obtidos no presente trabalho forneceram subsídios para o conhecimento da etiologia da antracnose em mangueira no Nordeste brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Profa. Luíza Suely Sêmen Martins pela disponibilização da infra-estrutura do Laboratório do Genoma da Universidade Federal Rural de Pernambuco para realização das análises moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adaskaveg, J.E.; Forster, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M.B. (Ed.). *Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. St. Paul: APS Press, 2000. cap.6, p.317-336.

2. 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**, St. Paul, v.93, p.579-587, 2003.
3. Assis, T. C. **Variabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose da mangueira, quanto utilização de carboidratos, patogenicidade, produção de enzimas e análise RAPD**. 2001. 138p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
4. 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. 120p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
5. Balardin, R.S.; Pastor-Corrales, M.A. Reação de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* a nove raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.15, p.269-273, 1990.
6. Brennan, J.M.; Fagan, B.; Van Maanem, A.; Cooke, B.M.; Doohan, F.M. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.109, p.577-587, 2003.
7. Brown, A.; Sreenivasaprasad, S.; Timmer, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.523-527, 1996.
8. Costa, R.V.; Casela, C.R.; Zambolim, L.; Ferreira, A.S. A antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.345-354, 2003.
9. Cunha, M. M.; Coutinho, C. C.; Junqueira, N. T. V.; Ferreira, F. R. **Manga para exportação: aspectos fitossanitários**. Brasília: EMBRAPA, 1993.104p. (FRUPEX, 3).
10. 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 cacauero com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.303-306, 2004.
11. Fitzell, R.D.; Peak, C.M. The epidemiology of anthracnose disease of mango -Inoculum sources, spore production and dispersal. **Annals of Applied Biology**, St. Paul, v.104, p.53-59, 1984.
12. Forster, H.; Adaskaveg, J.E. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p.1056-1065, 1999.

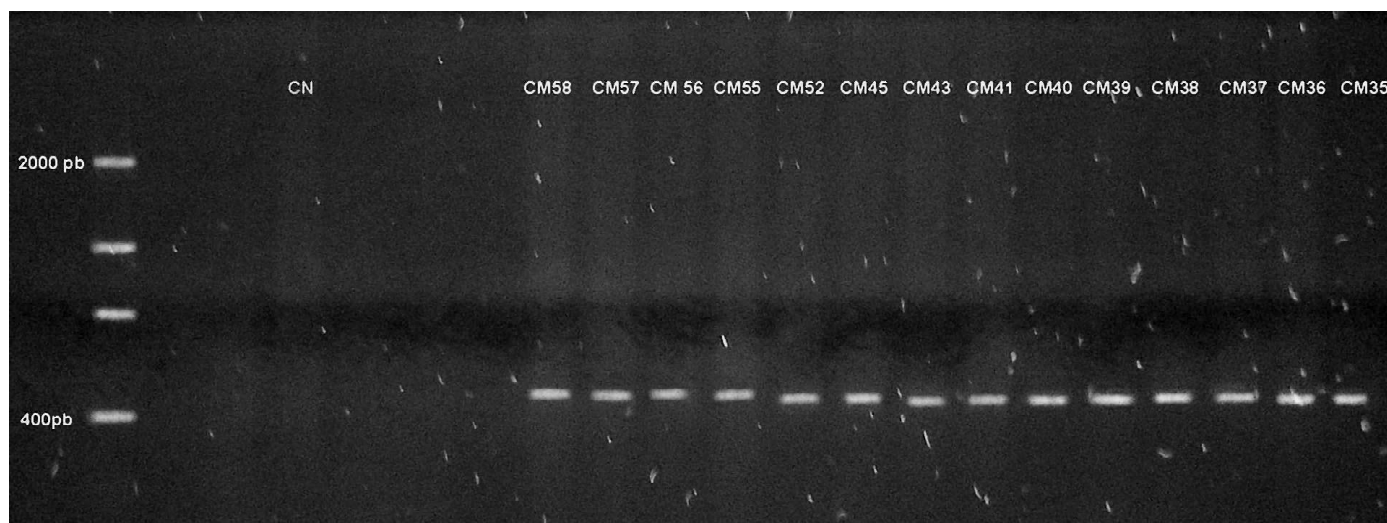


Figura 3. Amplificação da região ITS e identificação específica de isolados de *Colletotrichum*, obtidos de mangueira, usando o primer CgInt (*Colletotrichum gloeosporioides*) em combinação com ITS4.

13. Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.596-605, 1998.
14. Freeman, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M.B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. St. Paul: APS Press, 2000. p.131-143.
15. Freeman, S.; Minz, D.; Maymon, M.; Zveibil, A. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, p.586-592, 2001.
16. Freeman, S.; Shalev, Z.; Katan, T. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v.66, p.965-970, 2002.
17. Johnston, P.R.; Jones, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycological**, Cambridge, v.89, p.420-430, 1997.
18. Kiprof, E.K.; Mwang'Ombe, A.W.; Baudoin, J.P.; Kimani, P.M.; Mergeai, G. Cultural characteristic, pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium udum* isolates from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Kenya. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.108, p.147-154, 2002.
19. Latinović, J.; Vucinić, Z. Cultural characteristics, pathogenicity, and host range of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from olive plants in Montenegro. **Acta Hortiense**, Leuven, v.586, p.753-755, 2002.
20. Lilly, V.G.; Barnett, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill. 1951. 464p.
21. Linde, C.; Kemp, G.H.J.; Wingfield, M.J.; Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.105, p.231-239, 1999.
22. Menezes, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v.27, p.523-524, 2002 (suplemento).
23. Menezes, M.; Assis, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2ª.ed. Recife. UFRPE. 2004. 183p.
24. Menezes, M.; Hanlin, R.T. Apressoria of brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. causal agent of anthracnoses diseases. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.247-251, 1996a.
25. Menezes, M.; Hanlin, R.T. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from Northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.228-236, 1996b.
26. Miller, L.E. Correlations: description or inference? **Journal of Agricultural Education**, St. Paul, v.35, p.5-7, 1994.
27. Ribeiro, I.J.A. Doenças da mangueira. In: Kimati, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Editora Ceres, 2005. p.457-465.
28. Screenivasaprasad, S.; Talhinhos, P. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.6, p.361-378, 2005.
29. Serra, I.M.R.S.; Silva, G.S. Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agentes de antracnose em frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica, Japoticabal**, v.30, p.475-480, 2004.
30. Souza, C. L. C.; Almeida Sobrinho, C. Avaliação da variabilidade morfológica e patogênica do agente causal da antracnose na mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.33, p.426, 2000. (Resumo).
31. Swart, G.M. **Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango**. 1999, 156p. Thesis (PhD) - Faculty of Biological and Agriculture Sciences/ University Pretoria. Pretoria, 1999.
32. Talhinhos, P.; Screenivasaprasad, S.; Neves-Martins, J.; Oliveira, H. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied Environmental Microbiology**, St. Paul, v.71, p.2987-2998, 2005.
33. Tebeest, D. O. Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* in rice irrigation water and soil. **Plant Disease**, St. Paul, v.66, p.469-471, 1982.
34. Xiao, C.L.; Mackenzie, S.J.; Legard, D.E. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v.94, p.446-453, 2004.