

## Caracterização fisiológica, morfológica, cultural e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores da antracnose da Atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*)

L. M. TAKAHASHI, D. D. ROSA, M. A. BASSETO, E. L. FURTADO

A antracnose da Atemoia, causada por *Colletotrichum* spp. É uma grave doença nas regiões produtoras da fruta, seus sintomas variam de antracnose foliar, abortamento de flores, queima de ponta de ramos e lesões necróticas nos frutos. Apesar da importância da cultura, pouco se sabe sobre o agente causal. Características morfo-culturais, enzimáticas e patogenicidade cruzada a outras plantas são importantes informações que podem auxiliar no controle da doença. O teste de patogenicidade e a inoculação cruzada dos isolados em diferentes frutos foi efetuada utilizando-se discos de 5 mm de diâmetro de BDA contendo micélio de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* e *Colletotrichum* spp. e procedendo-se com a utilização de diferentes frutas tropicais e subtropicais. Foram também realizadas a caracterização enzimática, onde avaliou-se a produção das enzimas proteases, celulasas, amilases e lipases através da mensuração do diâmetro do halo formado em torno das colônias, comparou-se a morfologia das colônias e largura de confídios, sua forma. Culturalmente estudou-se a coloração das colônias, assim como a taxa de crescimento a diferentes temperaturas e o crescimento em meio suplementado com o fungicida Benomyl. Após a realização de todos os ensaios, foi constatada a ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* causando antracnose nos frutos jovens, ramos, folhas e flores nas plantas de atemoia.

L. M. TAKAHASHI. Engenheira Agrônoma, Mestrando em Proteção de Plantas do curso de Pós-graduação em Agronomia UNESP- FCA, P.Box. 237, Botucatu, SP, Brasil.  
D. D. ROSA, M. A. BASSETO. Engenheiro Agrônomo, Doutorando, ddrosa@gmail.com.  
E. L. FURTADO. Professor, Doutor, UNESP – FCA, Botucatu, SP, Brasil.

**Palavra chave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, identificação.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o consumo por alimentos saudáveis vem aumentando, acarretando a elevação na produção de frutas em todo o mundo. Entre essas, pode-se citar a família Annonaceae com muitos representantes, que apresenta um franco crescimento nos últimos anos (RAMOS *et al.*, 2001). Esta família possui cerca de 40 gêneros e mais de 2.000 espécies, a maioria de regiões de clima tropical ou subtropical (KAVATI, 1992). As anonáceas têm como característica o sabor adocicado pro-

nunciado e perfume bem característico dos frutos, sendo seu uso voltado para o consumo *in natura* ou na forma de polpas processadas pela indústria (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

As principais espécies encontradas no comércio são a *Annona squamosa* L., conhecida como fruta do conde; a *Annona muricata* L., conhecida como graviola e o híbrido *Annona cherimola* x *Annona squamosa*, conhecida como atemoia. As duas primeiras preferencialmente de clima tropical e a última adaptada ao clima subtropical (KAVATI, 1992).

No Estado de São Paulo, no Brasil, são cultivados a fruta-do-conde (*A. squamosa* L.), a fruta-da-condessa (*A. reticulata*), a graviola (*A. muricata* L.) e a atemóia (*A. cherimola* x *A. squamosa*). (AGRIANUAL, 2007). Dentre essas frutas, a atemóia vem se destacando, possivelmente por seu alto valor econômico, podendo chegar a US\$ 2,00 a fruta, sendo que essa cultura foi responsável por uma movimentação de US\$ 3 milhões no ano 2007, com um volume produzido de aproximadamente de 2 mil toneladas, sendo que a região de Botucatu, no estado de São Paulo, responsável por 5% do total (AGRIANUAL, 2007).

Neste contexto, o estudo mais aprofundado dos principais fatores que interferem na produção, como as doenças, fazem-se necessário, principalmente o estudo da principal doença da cultura, a antracnose.

A antracnose da atemoia é causada pelo fungo *Colletotrichum* sp. e é responsável por quase 5% do custo de produção da cultura. Ela ocasiona danos em várias partes da planta e em frutos jovens, e também na pós-colheita (MELLO *et al.*, 2004).

No Brasil, apenas o *C. gloeosporioides* foi identificado como causador de antracnose em anonáceas, mais precisamente em plantas de Fruta-do-conde (FREIRE *et al.* 1997), assim como em outros locais da América do Sul, onde há plantações comerciais de plantas da mesma família (ÁLVAREZ *et al.*, 2004 e VILLANUEVA-ARCE *et al.*, 2005), porém, segundo VILLANUEVA-ARCE *et al.* (2005), foram encontrados isolados de *C. fragariae* e *C. acutatum* em frutos de cherimóia em plantações no México

A presença de várias espécies de *Colletotrichum* em um mesmo cultivo é freqüente, por exemplo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em goiaba (PERES *et al.*, 2005), abacate, mamão (SIMMONDS, 1965), maçã (SHI *et al.*, 1996), pêssego, noz pecã (BERSTEIN *et al.*, 1995) e uva (KUMMUANG *et al.*, 1996). Além que associações de dois ou mais agentes etiológicos causando sintomas de antracnose já foi observado, como o verificado em frutos de graviola na Colômbia (ÁLVAREZ *et al.* 2004). Com base nestas observações este tra-

balho teve como objetivo identificar e caracterizar isolados de *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose da atemóia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum* spp. foram coletados de frutos, ramos, flores e folhas de plantas de Atemoia, apresentando sintomas de antracnose, em propriedades da região produtora da fruta, nas proximidades da cidade de Botucatu (22°53'09"S - 48°26'42"O), no estado de São Paulo, Brasil. Os isolados referenciais, provenientes de outras frutíferas, foram fornecidos pelo Prof. Dr. Nelson S. Massola Jr., da Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", sendo esses isolados já caracterizados e com a confirmação de espécie pelo mesmo pesquisador (Quadro 1). Todos os isolados foram depositados junto à micoteca do DPV/ FCA/ UNESP-Botucatu-SP.

Para o isolamento, a partir de lesões típicas no material vegetativo, vários cortes foram realizados na região de transição entre tecido com sintoma e sem sintoma. Esses fragmentos passaram por desinfestação superficial em solução de álcool 70% por 15 segundos, seguido da colocação em solução de hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto. Após duas lavagens em água esterilizada, os tecidos foram transferidos para placa com meio BDA (Batata-dextrose-ágar) (Acumedia Manuf. Inc. Michigan) contendo oxitetraciclina (5 mg/L), sendo em seguida mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD (Biological Oxygen Demand) à temperatura de 30°C, sem fotoperíodo, até o início do crescimento micelial. Após o crescimento inicial, fragmentos do micélio foram então transferidos para placa contendo somente BDA, quando foram utilizados para a realização dos demais experimentos.

### Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial

Avaliou-se o efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de todos os isolados, sendo efetuado a medição do crescimento do micélio em placas de petri com meio BDA,

Quadro 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. estudados.

Isolados	Espécie	Hospedeiro	Tecido	Local
1	<i>Colletotrichum musae</i> <sup>1</sup>	<i>Musa</i> sp.	Fruto	Botucatu
2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <sup>1</sup>	<i>Citrus sinensis</i>	Fruto	Piracicaba
3	<i>Colletotrichum acutatum</i> <sup>1</sup>	<i>Psidium guayaba</i>	Fruto	Piracicaba
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <sup>1</sup>	<i>Carica papaya</i>	Fruto	Piracicaba
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <sup>1</sup>	<i>Mangifera indica</i>	Fruto	Piracicaba
6	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
7	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
8	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Flor	Botucatu
9	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
10	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Ramo	Botucatu
11	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
12	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
13	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
14	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Fruto	Botucatu
15	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
16	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu
17	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Flor	Botucatu
18	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>	Folha	Botucatu

<sup>1</sup> – Isolados referenciais.

com um disco de micélio de 5 mm de diâmetro. Avaliou-se nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C, sem fotoperíodo, o crescimento, a cada 24 horas. Para cada isolado e temperatura utilizou-se cinco repetições. Mediu-se o crescimento da colônia até a borda de placa. Os dados permitiram calcular a velocidade média de crescimento micelial (VMCM – cm/dia) e também a temperatura ótima de crescimento de cada isolado. Posteriormente, ajustou-se o modelo que melhor representa o crescimento dos isolados de atemóia, optando-se pelo modelo que atendia os critérios: a) coeficiente de determinação mais significativo ( $R^2$ ); significância do coeficiente da variável independente; c) distribuição dos resíduos normalizados (CAMPBELL e MADDEN, 1990). No sétimo dia de crescimento efetuou-se a avaliação da coloração das colônias de cada isolado.

### Caracterização morfológica

Cultivou-se os isolados em placas de Petri, contendo meio BDA, por um período

de 10 dias, a 25°C, sobre fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 de escuro. Avaliou-se 50 conídios de cada isolado, medindo-se comprimento, largura e a relação entre comprimento/largura dos conídios e registrando-se o formato dos conídios, de acordo com GUNNEL e GUBLER, (1995).

### Sensibilidade ao fungicida Benomyl

Os isolados provenientes de atemóia foram avaliados de acordo com o crescimento, ou sua ausência, em meio contendo fungicida benomyl (10 µg i.a.ml<sup>-1</sup>). Para tal, discos de micélio de 5 mm foram colocados no centro de placas contendo meio de cultura BDA acrescido do fungicida. O meio foi preparado através da mistura de meio BDA, recém autoclavado, e resfriado até aproximadamente 45°C, ao qual foi acrescido o fungicida, em Erlenmeyer, e posteriormente misturado vigorosamente e depositado nas placas de Petri. Avaliou-se medindo o crescimento micelial no sétimo dia de incubação.

### Caracterização enzimática

Para os teste de produção de enzima extracelular utilizou-se colônias crescidas em meio BDA, por 8 dias, a 25°C, na ausência de luz. A detecção das atividades enzimáticas foi realizada pelo método de difusão em ágar, onde a enzima amilase foi determinada no meio nutriente-ágar (Difco) contendo 0,3% de amido solúvel (Merck) como descrita por COON *et al.* (1957). A atividade celulolítica foi avaliada utilizando-se meios minerais-ágar (TUTE, 1969) suplementado com 2 g·l<sup>-1</sup> de carboximetilcelulose para a enzima carboximetilcelulase, e celulose Whatman nº1 para enzima celulase (LEWIS, 1988).

Já a atividade pectolítica foi determinada utilizando-se meio BDA suplementado com 2,5 g·l<sup>-1</sup> de pectina cítrica para detectar a pectinase, e suplementado com 1% com ácido poligalactorônico para detectar a atividade da pectiliase (HANKIN *et al.*, 1971). Lipases foram avaliadas utilizando-se meio BDA suplementado com Tween 80 e 0,001% de Rodamina B (SIERRA, 1957). A atividade proteolítica foi verificada em meio contendo 1% de caseína como fonte de carbono. Após 96 h de incubação, adicionou-se às placas 5,0 ml de uma solução de ácido acético a 5% (STAMFORD, 1998), cujo precipitado torna o ágar mais opaco e acentua as zonas claras ao redor das colônias, caracterizando a hidrólise da caseína.

Para verificar-se a capacidade de degradação de lignina, utilizou-se meio BDA suplementado com 2% de ácido tânico, para terminação da atividade da enzima tanase, e ácido gálico a 0,2% para a enzima lacase. A atividade da urease foi avaliada utilizando-se meio BDA suplementado com 1,5 g·l<sup>-1</sup> de uréia e 0,15 g·l<sup>-1</sup> de vermelho de cresol (SEELIGER, 1956). Verificou-se a atividade da gelatinase utilizando meio nutriente suplementado com 150 g·l<sup>-1</sup> de gelatina. Testou-se todos isolados também para a produção de peroxidase utilizando peróxido de hidrogênio a 3%.

Todos os testes foram conduzidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro con-

tendo 15 ml do meio teste. No centro de cada placa foi depositado um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, retirado de colônias dos isolados e, em seguida, todas as placas foram incubadas a 25°C, na ausência de luz. Como testemunhas, foram usadas placas apenas com discos de meio de cultura sem os fungos.

Avaliou-se a produção das enzimas proteases, celulasas, amilases e lipases através da mensuração do diâmetro do halo formado em torno das colônias (BASTOS, 2005). As enzimas urease, peroxidase, pectinase, gelatinase, lacase e tanase foram avaliados por meio de símbolos que representam uma estimativa subjetiva da produção das enzimas, baseada na intensidade da coloração formada no meio ou aspecto do meio de cultura: +++ intensa; ++ moderada; + fraca; e – ausência. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

### Caracterização patogênica

Frutos sadios de banana- cv. Nanica; de Goiaba; de Manga- cv. Tommy Atkins; de mamão- cv. 'Sunrise Solo'; de laranja, cv. Pêra e de Atemóia, cv. 'African Pride', em fase intermediária de maturação, foram lavados com água corrente e sabão, seguido de desinfestação em solução de álcool 70%, por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, por 2 min. Após isto, os frutos foram lavados por duas vezes em água destilada esterilizada e secos em papel toalha e, em seguida, mantidos em temperatura ambiente.

Para inoculação utilizou-se colônias dos isolados, com cinco dias de incubação, retirando-se discos da colônia, de 5 mm de diâmetro. Procederam-se as inoculações dos frutos com os isolados de *Colletotrichum* spp., onde cada fruto foi inoculado com os isolados das demais hospedeiras, efetuando uma inoculação cruzada. Os frutos foram previamente feridos com um per-

furador flambado, e sobre a superfície foram depositados discos contendo estruturas do patógeno. Em seguida, os frutos foram colocados em câmara úmida, constituída de um saco plástico e um chumaço de algodão umedecido em água destilada estilizada, por 48 h, a 22°C. A testemunha absoluta foi composta por um disco de BDA sobre o fermento sem conter as estruturas do patógeno. As avaliações foram feitas aos sete dias após a inoculação, medindo-se o diâmetro das lesões em dois sentidos diametralmente opostos. Foi realizado o reisolamento e a comparação dos isolados. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 19 tratamentos e 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e a comparação das médias foi feita por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial

Todos os isolados estudados apresentaram o crescimento micelial em todas as temperaturas testadas, sendo que a maior velocidade de crescimento foi observada entre as faixas de temperatura de 20°C a 25°C, sendo que os isolados de Atemóia e os isolados referenciais 2, 4 e 5 apresentaram uma velocidade média de crescimento, a 25°C, maior que os isolados 1 e 3, sendo esses *C. musae* e *C. acutatum*, respectivamente (Quadro 2).

A análise das velocidades de crescimento médio dos isolados, nas diversas temperaturas, verificou-se que os isolados de Atemóia apresentam um comportamento de crescimento muito similar aos isolados referenciais 2, 4 e 5, todos *C. gloeosporioides*,

Quadro 2. Velocidade média de crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp., a 25°C, coloração da cultura em meio BDA e crescimento em meio BDA acrescido do fungicida Benomyl (10 mg.l<sup>-1</sup>).

Isolados	VMCM (à 25°C) (mm/dia)*	Coloração		Crescimento em Benomyl - 10 mg.l <sup>-1</sup>
		Micélio	Funda da placa	
1	0,65 c	Laranja	Salmão	+
2	1,13 a	Cinza	Cinza	-
3	0,92 b	Cinza escura	Laranja	+
4	1,13 a	Cinza clara	Cinza	-
5	1,16 a	Creme	Cinza	-
6	1,16 a	Cinza escura	Cinza	-
7	1,15 a	Cinza	Cinza	-
8	1,19 a	Cinza	Cinza	-
9	1,20 a	Cinza	Cinza	-
10	1,16 a	Cinza	Cinza	-
11	1,15 a	Cinza	Cinza	-
12	1,16 a	Cinza	Cinza	-
13	1,18 a	Cinza	Cinza	-
14	1,19 a	Cinza	Cinza	-
15	1,21 a	Cinza	Cinza	-
16	1,16 a	Cinza	Cinza	-
17	1,16 a	Cinza	Cinza	-
18	1,16 a	Cinza	Cinza	-
CV(%)	4,75			

\* Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente no teste Tukey a 5% de probabilidade.

sendo que a curva de regressão de melhor ajuste para todos os isolados foi a de polinomial de segundo grau (Figura 1), onde foi possível juntar todos os isolados de Atemóia na mesma regressão para comparação com os isolados referenciais, verificando-se com isso a grande similaridade das curvas dos isolados de Atemóia e os isolados referenciais de *C.gloeosporioides*, sendo a curva representada pela equação abaixo:

$$Y = 0,207 T^2 - 1,1113 T + 0,4474$$

Y = Velocidade média de crescimento micelial (mm/dia)

T = Temperatura em °C

De posse da equação foi possível calcular a temperatura ótima para maior velocidade de crescimento, resultando em 24,2°C para os isolados de Atemóia.

Pode-se observar que os isolados de Atemóia apresentam uma velocidade de crescimento médio do micélio maior que os isolados referenciais 1 e 3, *C. musae* e *C. acutatum*, na temperatura de 30°C, verificando-se que a velocidade de crescimento dos isolados de Atemóia se aproxima muito dos isolados referenciais, 2, 4 e 5, *C. gloeosporioides*. Esta observação indica uma proximidade cultural dos isolados de Atemóia e os isolados de *C. gloeosporioides*, como já observado por outros autores (SMITH e BLACK, 1990; SHI *et al.*, 1996).

OLIVEIRA *et al.* (2005) verificaram que isolados de *C. acutatum*, de oliveiras, também apresentam esse comportamento, sendo que a temperatura ótima de crescimento para esses isolados ficou entorno de 21°C, pouco abaixo das 24,2°C encontrados para os isolados *C. gloeosporioides* de referencia e os de Atemóia. A velocidade maior de crescimento em temperaturas maiores para *C. gloeosporioides* pode estar aliado que este patógeno apresenta uma maior especialização em fruteiras de clima tropical e por isso aclimatizados a temperaturas mais altas, como observado em manga (HOWARD *et al.*, 1992), abacate (FREEMAN, 2000) e outras.

As colônias dos isolados de Atemóia apresentaram características culturais semelhantes, com coloração variando de cinza a cinza escura no micélio e de coloração cinza no funda da placa (Quadro 2). Verificando-se um escurecimento das colônias mais rapidamente, com 3 dias, a medida de que se aumenta a temperatura de incubação.

Na análise do crescimento dos isolados junto ao fungicida benomyl, sabe-se que o fungicida atua na inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* em flores de laranja, mas não possui a capacidade de inibir a germinação dos conídios, ou de matar o fungo (PERES *et al.* 2002.). No caso de *C. gloeosporioides*, sabe-se que esse é menos sensível a mancozebe e captafol que *C. capsici* (THIND; JHOOTY, 1990), ao passo que *C. acutatum* é menos sensível a benomyl, captana e propiconazol e mais sensível a moclbutanil e tebuconazol do que *C. gloeosporioides* (BERNSTEIN *et al.*, 1995; ADASKEVEG e HARTIN, 1997; VINNERE, 2004), sendo portanto um bom indicativo de diferenciação das espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Verificou-se que os isolados referenciais 2, 4 e 5, *C. gloeosporioides*, juntamente com todos os isolados de Atemóia não apresentaram crescimento micelial em meio de cultura BDA acrescido de 10 mg·l<sup>-1</sup> do fungicida benomyl, crescimento esse observado para os isolados de referencia 1 e 3, *C. musae* e *C. acutatum*, respectivamente (Quadro 2).

### Caracterização morfológica

Em relação às características morfológicas não houve grande variação entre os isolados de Atemóia, sendo que os conídios se apresentaram, em média, 68,3% com formato cilíndrico com ápices arredondados (Quadro 3), sendo que este formato corresponde ao tipo morfológico de *C. gloeosporioides*, fato esse observado com os isolados referenciais 2, 4 e 5. Todos os isolados apresentaram produção de conídios mistos, tendo 30,7% de conídios fusiformes com ápices afilados. Já os isolados 8, 13, 16 e 17 apresentaram, em média, 3% de conídios clavados (Tabela 3).

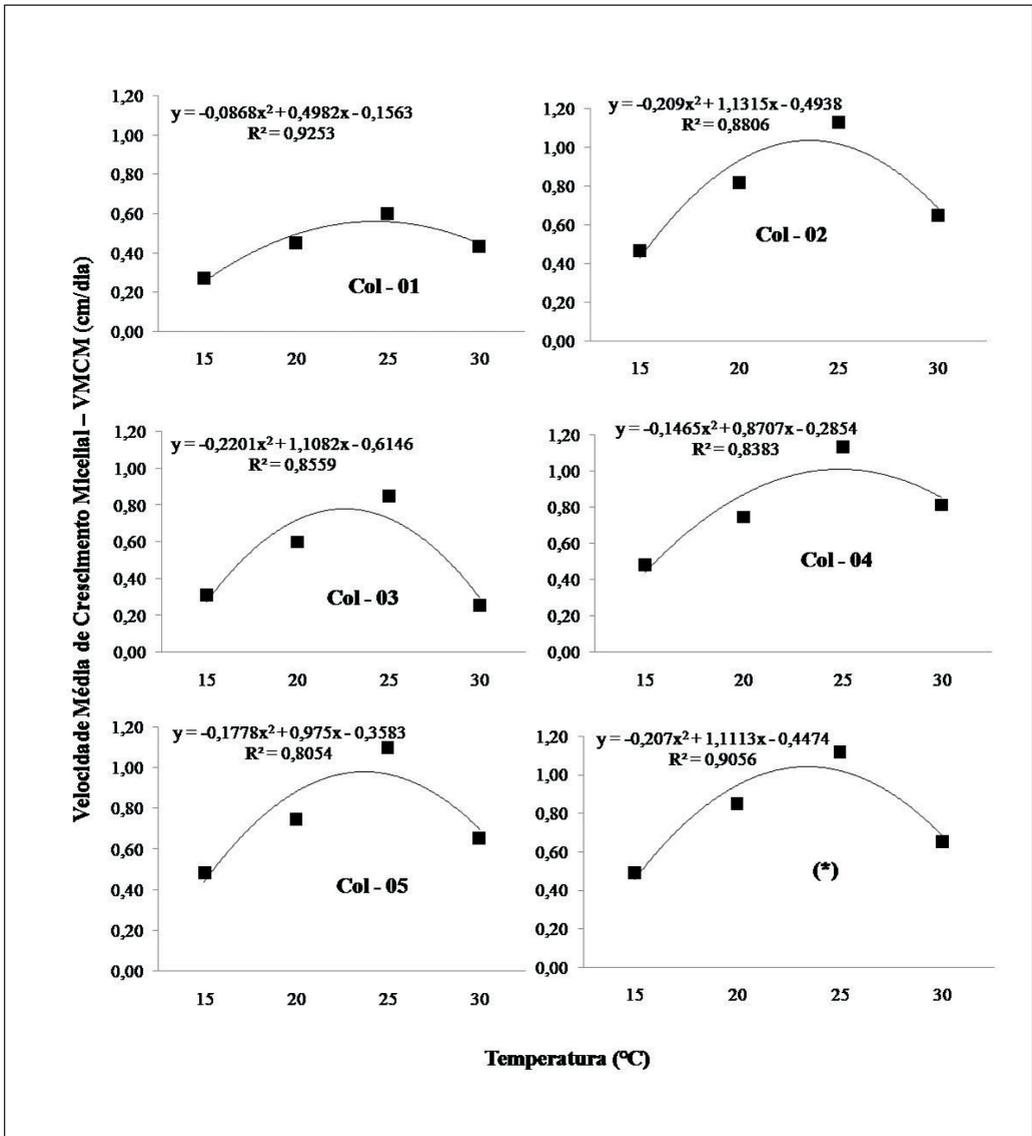


Figura 1. Velocidade média de crescimento micelial (cm/dia) dos isolados de *Colletotrichum* spp. durante 10 dias de incubação em meio BDA a diferentes temperaturas. \* Curva ajustadas para os 13 isolados de Atemóia, excluindo os isolados referenciais.

Os isolados de Atemóia apresentaram conídios variando de  $16,6 \pm 1,94$  a  $14,1 \pm 1,44 \mu\text{m}$  em comprimento, para os isolados 7 e 17, respectivamente, e  $5,2 \pm 0,32$  a  $4,0 \pm 0,32 \mu\text{m}$  de largura para os isolados 9 e 11,

respectivamente. Sendo esses valores superiores para os que foram verificados para os isolados de referência 1, *C.musae*,  $12,0 \pm 1,81 \mu\text{m}$  de comprimento por  $3,0 \pm 0,34 \mu\text{m}$  de largura, e isolado de referência 3, *C. acu-*

Quadro 3. Formatos e dimensões dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolados	Formato dos conídios (%)			Dimensões (µm)		
	Cilíndrico com ápices arredondados	Fusifforme com ápices afilados	Clavados	Comprimento	Largura	Compr/Larg
1	54	26	20	12,0 ± 1,81	3,0 ± 0,34	4,1 ± 0,35
2	67	33	0	14,4 ± 1,09	4,3 ± 0,37	3,3 ± 0,27
3	15	85	0	12,6 ± 1,41	3,0 ± 0,42	4,2 ± 0,38
4	61	37	2	15,8 ± 0,86	4,7 ± 0,23	3,3 ± 0,54
5	70	30	0	15,4 ± 0,73	4,8 ± 0,23	3,2 ± 0,48
6	68	32	0	16,4 ± 1,94	4,8 ± 0,32	3,6 ± 0,40
7	64	36	0	16,6 ± 1,94	4,7 ± 0,32	3,5 ± 0,37
8	71	27	2	15,3 ± 1,75	4,9 ± 0,32	3,1 ± 0,28
9	74	26	0	15,5 ± 1,75	5,2 ± 0,32	2,9 ± 0,67
10	65	35	0	15,1 ± 1,32	4,4 ± 0,47	3,4 ± 0,51
11	62	38	0	14,6 ± 1,44	4,0 ± 0,32	3,6 ± 0,34
12	73	27	0	15,0 ± 1,32	4,2 ± 0,47	3,5 ± 0,42
13	61	35	4	14,4 ± 1,44	4,8 ± 0,32	3,0 ± 0,64
14	77	23	0	14,8 ± 1,32	5,1 ± 0,47	2,9 ± 0,62
15	69	31	0	14,3 ± 1,44	4,7 ± 0,31	3,0 ± 0,25
16	70	28	2	14,7 ± 1,32	4,9 ± 0,45	3,0 ± 0,45
17	63	32	5	14,1 ± 1,44	4,5 ± 0,30	3,1 ± 0,24
18	71	29	0	14,5 ± 1,32	4,8 ± 0,40	3,0 ± 0,36
Média <sup>1</sup>				14,7 ± 1,21	3,2 ± 0,41	3,5 ± 0,45
LSD <sup>1</sup> <sub>0,05</sub>				0,62	0,17	0,18
Média <sup>2</sup>				15,2 ± 1,13	4,7 ± 0,42	3,2 ± 0,38
LSD <sup>2</sup> <sub>0,05</sub>				0,55	0,14	0,16

<sup>1</sup> Média e Diferença mínima significativa (LSD; P=0,05) dos 18 isolados de *Colletotrichum* spp. estudados.

<sup>2</sup> Média e Diferença mínima significativa (LSD; P=0,05) dos 13 isolados de *Colletotrichum* spp. de Atemóia estudados.

*tatum*, que variou de 12,6 ± 1,41 µm de comprimento, por 3,0 ± 0,42 µm de largura (Quadro 3).

SUTTON (1992) relata que o formato das extremidades dos conídios é um dos principais caracteres morfológicos utilizado para a separação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, assim como o tamanho dos conídios. Esses caracteres compõem a base da diferenciação, sendo que os conídios de *C. gloeosporioides* tendem a ser cilíndricos com ápices arredondados, variando de 14 a 16 µm de comprimento e 4,0 a 5 µm de largura, com uma relação variando de 2,9 a 3,5, entre comprimento e largura dos conídios. Na análise de variância verifica-se diferença signifi-

cativa nas dimensões dos conídios estudados, separando os isolados de Atemóia dos isolados 1 e 3.

### Caracterização enzimática

PASCHOLATI (1995) cita que para um patógeno infectar uma planta é preciso que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do seu hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta. Para isso, o patógeno utiliza-se de mecanismos de ataque tais como enzimas, toxinas e hormônios.

Alguns pesquisadores têm utilizado a atividade enzimática das espécies para auxiliar

Quadro 4. Caracterização enzimática dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Amilase*	Carboxi- metilcelulose*	Celulase*	Lipase*	Caseinase	Tânase**	Lacase**	Pectinase**	Uréase**	Gelatinase**	Peroxidase**
1	9,7	2,7	3,3	5,3	11,0	++	+	+	++	+	+
2	12,7	12,0	8,3	8,0	13,0	+	++	+	++	+	+
3	14,3	10,3	10,7	7,3	14,3	++	++	+	++	+	+
4	24,0	13,3	8,0	11,7	12,3	++	++	+	++	+	+
5	19,3	13,7	12,3	8,3	13,0	+	++	+	++	+	+
6	31,7	12,3	8,7	7,7	5,0	+	+	-	+	+	+
7	29,3	12,3	9,3	11,3	6,3	++	++	+	++	+	+
8	27,3	18,7	12,0	13,3	8,0	++	++	+	++	+	+
9	29,7	12,3	10,7	12,0	9,7	++	++	++	++	+	+
10	28,5	14,5	13,0	9,5	11,0	++	++	+	++	+	+
11	22,7	13,0	14,0	12,3	11,7	+++	++	+	++	+	+
12	30,3	10,7	13,7	13,7	12,3	++	++	+	++	+	+
13	35,0	13,3	13,0	12,3	16,3	++	++	+	++	+	+
14	31,3	12,7	15,3	14,0	11,3	++	++	+	++	+	+
15	28,3	12,7	13,3	12,3	9,0	++	++	+	++	+	+
16	24,7	13,0	18,7	11,0	12,0	++	++	+	++	+	+
17	23,7	15,0	13,0	9,7	14,0	++	++	+	++	+	+
18	25,0	13,0	17,3	11,7	12,7	++	++	+	++	+	+

\* A produção de Amilase, Carboximetilcelulase, Celulase, Lipase e Caseinase foram avaliadas pela média (três repetições) do diâmetro do halo formado em torno das colônias.

\*\* A produção de peroxidases, pectinases, Tânase, Lacase, ureases e gelatinase baseou-se na intensidade da cor resultante no meio ou aspecto do meio de cultura, onde: coloração intensa +++; coloração moderada ++; coloração fraca + e ausência de coloração.

Quadro 5. Quadro da análise de variância da atividade enzimática (Amilase, Carboximetilcelulase, Celulase, Lipase, Caseinase) produzida pelos isolados de *Colletotrichum* spp., de Atemóia, em meios sólidos

FV	GL	SQ	QM	F
Isolados	17	7.748,24	1.937,06	42,77*
Enzimas	4	1.261,45	74,20	1,64*
Isolados*Enzimas	68	3.079,85	45,29	19,77*
Tratamentos	89	12.089,54	37,27	
Resíduo	180	389,37	2,28	
Média Geral	14,25			
Coefficiente de variação (%)	8,76			

\* Significativo a 5% de probabilidade, no teste de Tukey.

na caracterização dos isolados, sendo este método, portanto de grande valia na tarefa. De acordo com COUTO *et al.* (2002), a produção de enzimas extracelulares (com atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica), em meio sólido, permitiu a distinção entre isolados de *C. musae* (Berk & Curtis) von Arx, em banana, assim como LIMA e CHAVES (1992) em *C. gossypii* em algodão.

A caracterização enzimática possibilita a diferenciação por meio da DETERMINAÇÃO da produção de enzimas (difusão em substrato sólido, no caso, meio BDA) (NEIROT & AZEVEDO, 1988), uma vez que os fungos apresentam diferenças quanto à quantidade de enzimas produzidas (no caso lipase, protease, amilase, celulase, pectinase, protease, urease, peroxidase, gelatinase e lacase (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

Verificou-se que o isolado de referência 1, *C. musae*, diferenciou-se dos demais por apresentar menor produção das enzimas amilase, carboximetilcelulose, celulase e lipase e, de forma geral, apresentou a menor produção das demais enzimas (Quadro 4). Entre os isolados referenciais 2, 3, 4 e 5, verifica-se que os isolados 2 e 3 apresentaram uma baixa produção de exoenzimas em relação aos isolados 4 e 5 (Quadro 4)

Uma diferença significativa pode ser observada nos isolados coletados de atemóia, sendo que essas diferenças são observadas em relação aos isolados, as enzimas e a interação isolados X enzimas (Quadro 5).

verificando-se que os isolados de Atemóia produziram mais enzimas, de modo geral, que os isolados referenciais (Quadro 6). Caracterizados como *Colletotrichum* spp., se diferenciaram por apresentar uma maior produção da enzima amilase, fato que pode ser observado pela média maior do halo formado no meio de cultura contendo amido, de acordo com a Quadro 4. Com relação às demais enzimas, não observa-se nenhuma diferenciação, ficando sua média próxima às demais.

### Caracterização patogênica

A caracterização patogênica também é um método interessante e utilizado por diversos pesquisadores, pois, assim como diversos casos de especificidade são relatados, nos quais diversas espécies estão relacionadas para um mesmo hospedeiro (SMITH e BLACK, 1990), o contrário também ocorre, sugerindo a patogenicidade cruzada como um método complementar de diferenciação dos isolados, segundo DEYONES & BAUDRY (1995); MUNIZ *et al.* (1998); FURTADO *et al.* (1999) e PERES *et al.* (2002).

Nos isolados de *Colletotrichum* estudados verificou-se a não ocorrência de especificada patogênica, quando utiliza-se de 5% de significância para a estatística, mas quando utiliza-se de análise menos restrigente, aumentando a significância para 10%, verifica-se a existência de diferença estatística para a análise em relação aos hospedeiros, indicando a uma possível especialização patogênica, esta

**Quadro 6. Atividade enzimática dos isolados de *Colletotrichum* spp., de Atemóia, em meio sólido**

Isolados	Atividade enzimática
13	18,34 <sup>1</sup> a <sup>2</sup>
14	16,93 ab
12	16,13 ab
18	15,93 ab
8	15,87 ab
16	15,87 ab
10	15,40 ab
15	15,13 ab
17	15,07 ab
9	14,87 ab
11	14,73 ab
4	14,33 ab
7	13,83 b
5	13,33 b
6	13,07 b
3	11,40 c
2	10,80 c
1	6,40 d

<sup>1</sup> Média de três repetições de toda enzima extracelular produzida (amilase, celulase, lipase, caseinase e lacase) pelos isolados de *Colletotrichum* spp.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente, segundo teste de Tukey a 5%.

possível significância possivelmente esta relacionada a patogenicidade de *C. musae*, o qual foi mais patogênico a banana, demonstrando uma possível especialização e um resultado já esperado (Quadro 7).

Em relação à severidade média dos isolados, nos seis hospedeiros estudados, quando analisados conjuntamente, verificou-se que todos os isolados foram patogênicos, sendo que esses foram divididos em quatro grupos distintos, indo dos mais agressivos, os isolados 13 e 5, aos menos agressivos, os isolados 6, 7, 8, 9, 10, 12, 17 e 18 (Quadro 8).

As lesões causadas pelos isolados de atemóia, nos frutos de atemóia, variam muito em relação a tamanho, indo de isolados que não causaram lesões, isolado 6, até isolados mais agressivos, como isolados 14 e 15 (Quadro 9).

Observa-se que os isolados 1 e 3 também causam lesão em atemóia, se mostrando intermediários em severidade, esse fato também pode ser observado para os isolados 2, 4 e 5, padrões de *C. gloeosporioides* provenientes de outros hospedeiros (Quadro 9)

Pode-se concluir que os isolados de *Colletotrichum* spp., causadores de antracnose em Atemóia no estado de São Paulo, no Brasil, apresentam caracteres morfológicos e culturais próximo a espécies *C. gloeosporioides*, fornecendo um forte indicio que esta espécie é a responsável pela doença nas plantas no Brasil. E que informações relacionadas a patogenicidade e produção enzimática não foram capazes de separar as espécies de referencia estudadas conjuntamente com os isolados de *Colletotrichum* sp. de Atemóia, demonstrando que esses caracteres não são indicados para a separação das espécies.

**Quadro 7. Quadro da análise de variância da severidade média, em goiaba, laranja, manga, banana, atemóia e mamão, produzida pelos isolados de *Colletotrichum* sp., estudados.**

FV	GL	SQ	QM	F
Isolados	18	16,15	3,23	2,87*
Hospedeiros	5	10,96	0,61	0,32**
Isolados*Hospedeiros	90	101,44	1,13	36,70*
Tratamentos	113	18,13	2,27	
Resíduo	318	6,63	0,03	
Média Geral	1,40			
Coefficiente de variação (%)	9,78			

\* Significativo a 5% de probabilidade, no teste de Tukey.

\*\* Significativo a 10% de probabilidade, no teste de Tukey.

Quadro 8. Severidade média em relação a todos os hospedeiros, baseado na análise conjunta dos valores totais de severidade dos isolados de *Colletotrichum* sp. estudados.

Isolados	Severidade Média	Isolados	Severidade Média
13	2,13 e	15	1,32 bc
5	2,06 e	10	1,30 b
3	1,66 d	9	1,28 b
2	1,60 cd	8	1,27 b
14	1,50 c	6	1,24 b
16	1,49 c	12	1,21 b
11	1,43 c	17	1,21 b
4	1,40 c	7	1,20 b
1	1,34 bc	18	1,16 b
		19 (Controle)	0,86 a

<sup>1</sup> Média de três repetições de todos os ensaios de severidades, em todos os hospedeiros testados, pelos isolados de *Colletotrichum* sp.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente, segundo teste de Tukey a 5%.

Quadro 9. Valores médios de severidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em frutos de goiaba, laranja, manga, banana, atemóia e mamão.

Tratamento	Goiaba*	Laranja*	Manga*	Banana*	Atemóia*	Mamão
1	1,20 ab	1,83 abc	0,73 ab	2,25 c	1,20 abcd	0,80 ab
2	2,31 e	1,83 abc	1,58 def	0,98 ab	1,10 abc	1,76 defgh
3	2,78 f	1,70 abc	1,4 bcde	0,76 a	1,20 abcd	2,11 fghij
4	1,01 ab	2,05 c	0,85 abc	0,70 a	1,26 abcd	2,50 ij
5	1,66 cd	1,93 bc	4,81 g	0,75 a	1,00 a	2,20 ghij
6	1,66 cd	1,46 abc	1,23 abcd	0,78 a	0,98 a	1,31 bcde
7	1,21 ab	1,41 abc	1,18 abcd	0,85 a	1,35 bcde	1,18 abcd
8	1,16 ab	1,63 abc	1,15 abcd	1,43 b	1,11 abc	1,13 abc
9	1,35 bcd	1,83 abc	1,03 abcd	0,93 ab	0,96 a	1,56 cdef
10	1,20 ab	1,33 ab	1,53 cdef	0,81 a	1,20 abcd	1,70 cdef
11	1,68 d	1,55 abc	2,18 f	0,91 a	1,38 cde	0,85 ab
12	1,23 ab	1,43 abc	1,11 abcd	1,05 ab	1,33 bcde	1,11 abc
13	2,15 e	1,43 abc	4,25 g	0,93 ab	1,45 de	2,53 j
14	1,15 ab	1,33 ab	1,66 def	1,10 ab	1,98 f	1,76 defgh
15	1,06 ab	1,45 abc	0,75 ab	1,16 ab	1,58 e	1,91 efghi
16	1,00 a	1,30 ab	2,10 ef	0,81 a	1,38 cde	2,35 hij
17	1,33 abc	1,28 ab	0,96 abcd	1,06 ab	1,21 abcd	1,36 bcde
18	1,18 ab	1,20 a	1,36 abcd	0,93 ab	1,05 ab	1,25 bcd
Controle	1,00 a	1,23 a	0,68 a	0,68 a	0,98 a	0,60 a
<b>C.V%</b>	<b>7,68</b>	<b>14,12</b>	<b>14,30</b>	<b>16,69</b>	<b>7,88</b>	<b>12,46</b>

\*Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente no teste Tukey a 5% de probabilidade.

Verificou-se também que outras espécies, neste caso *C. musae* e *C. acutatum* também podem causar lesões em frutos de atemóia,

podendo ocorrer infecção conjunta de mais de uma espécie em atemóia em condições de campo.

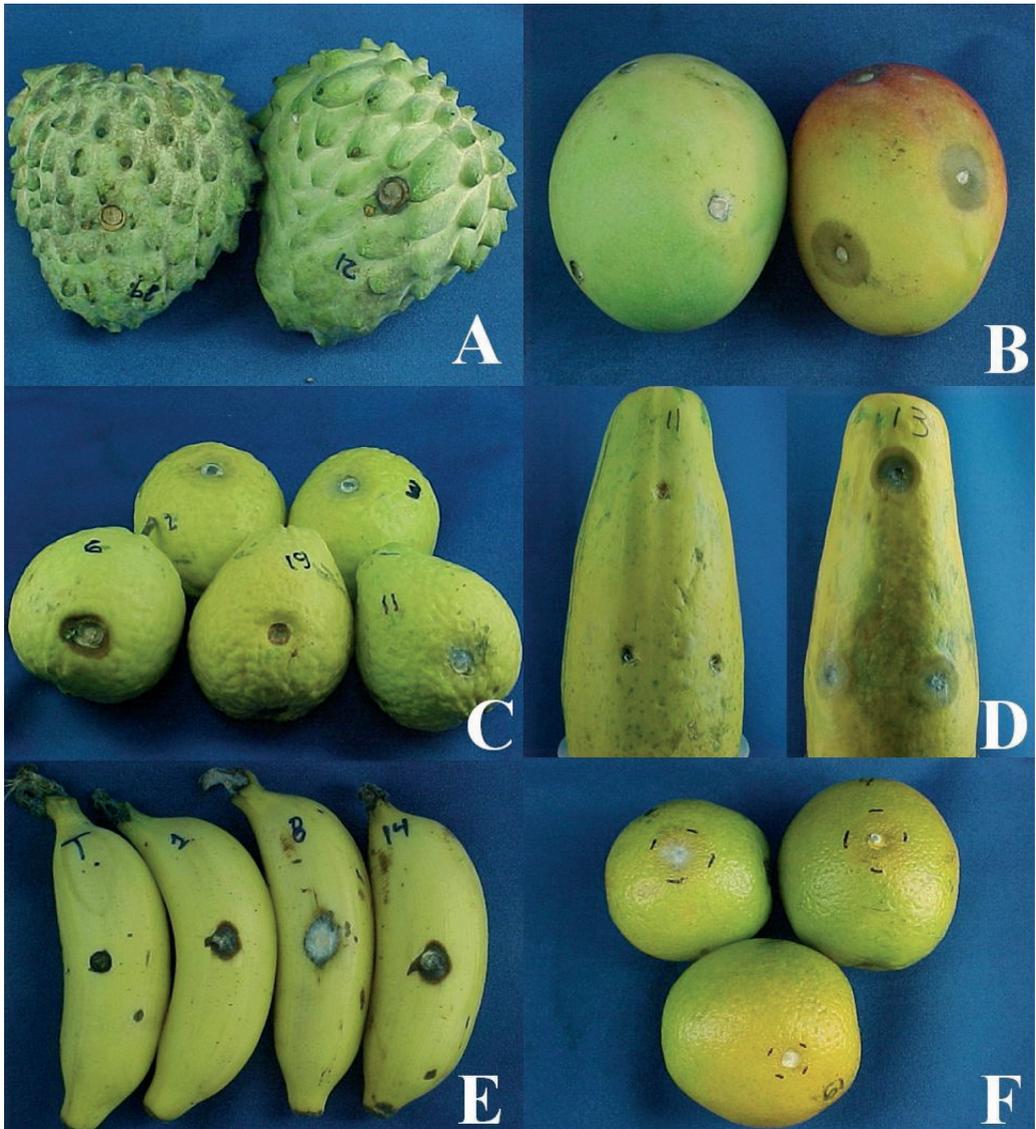


Figura 2. Frutas inoculadas para teste de patogenicidade cruzada dos isolados de *Colletotrichum* spp. em Atemóia (A), Manga (B), Goiaba (C), Mamão (D), Banana (E) e Laranja (F).

#### RESUMEN

TAKAHASHI, L. M., D. D. ROSA, M. A. BASSETO, E. L. FURTADO. Caracterización fisiológica, morfología, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del chirimoyo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 35: 115-130.

La antracnosis del chirimoyo, causada por *Colletotrichum* spp., es una grave enfermedad en numerosas regiones productoras de la fruta, sus síntomas van desde de man-

chas necróticas las hojas, el aborto de flores, el secado de la punta de las ramas y lesiones necróticas en los frutos. A pesar de la importancia del cultivo, se tienen pocos conocimientos sobre el agente causal de la antracnose. La caracterización morfológicas, cultural, enzimática y patogénica de aislados son importantes por la información que pueden aportar para el control de la enfermedad. Las pruebas de patogenicidad de los aislados se realizaron en diferentes frutas, utilizando discos de un medio agarizado de 5 mm de diámetro con el cuerpo vegetativo de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* y *Colletotrichum* spp. sobre diversos frutos tropicales y subtropicales. La caracterización enzimática se centró en la producción de proteasas, celulasas, amilasas y lipasas. La morfología de los aislados se estudió en base al aspecto de las colonias en PDA y la forma y dimensiones de los conidios. Como complemento a la identificación se utilizaron las temperaturas de crecimiento en PDA y el desarrollo de éstas en medio de cultivo conteniendo 10 ppm de benomilo. Los resultados pusieron en evidencia que los 13 aislados procedentes de hojas, flores, ramas y frutos de chirimoyo se aproximaron a la especie *C. gloeosporioides* tomada como referencia y tuvieron menos similitud con *C. musae* y *C. acutatum*.

**Palabras clave:** *Colletotrichum gloeosporioides*, identificación.

#### ABSTRACT

TAKAHASHI, L. M., D. D. ROSA, M. A. BASSETO, E. L. FURTADO. Physiological, morphological, cultural and pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose in the Atemoya (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). *Bol. San. Veg. Plagas*, **35**: 115-130.

Atemoya anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. It is a serious disease in producing regions of the fruit, its symptoms vary from leaf anthracnose, flowers abortion, burning and ramos-edge of necrotic lesions on fruit. Despite the importance of culture, little is known about the causal agent. Morphological and cultural and cross the enzymic pathogenic and other plants are important information that may assist in controlling the disease. The pathogenicity test and cross-inoculation of the isolates in different host was done using the BDA disks, 5 mm in diameter, containing mycelium of *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* and *Colletotrichum* spp. isolated from atemoya. Were also performed to characterize enzyme, which focuses on the production of protease enzymes, cellulases, amylase and lipase by measuring the diameter of the circle formed around the colonies, compared the morphology of the colonies and width of conidia, its form. Culturally studied is the color of the colonies as well as the growth rate at different temperatures and growth in medium supplemented with the fungicide Benomyl. Upon completion of all tests, it was found the occurrence of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose in young fruits, branches, leaves and flowers in plants of atemoya.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, identification.

#### REFERÊNCIAS

- ADASKEVEG, JE, HARTIN, RJ. 1997 Characterization Of *Colletotrichum Acutatum* Isolates Causing Anthracnose Of Almond And Peach In California. *Phytopathology*, **87**: 979-987.
- AGRIANUAL: ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Fnp, 2006, 521 F.
- ÁLVAREZ, E., OSPINA, C. A., MEJÍA, J. F., LLANO, G. A. 2004. Caracterización Morfológica, Patogénica Y Genética Del Agente Causal De La Antracnosis (*Colletotrichum Gloeosporioides*) En Guanábana (*Annona Muricata*) En El Valle Del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, **28**: 1-8.
- BASTOS, C. N. 2005. Produção De Enzimas Extracelulares Por *Crinipellis Perniciosa*. *Fitopatologia Brasileira*, **30**: 286-288.
- BERNSTEIN, B., ZEHR, E. I., DEAN, R. A., SHABI, E. 1995. Characteristics Of *Colletotrichum* From Peach, Apple, Pecan, And Other Hosts. *Plant Disease*, **79**: 478-482.
- CAMPBELL, C. L., MADDEN, L. V. 1990. *Introduction To Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons. New York. 532 Pp.

- COON, H. J., JENNISON, M. W., WEEK, O. B. 1957. Routine Tests For The Identification Of Bacteria. In: Manual Of Microbiological Methods (Ed. Society Of American Bacteriologists). Mcgraw-Hal, New York. P.239-262.
- COUTO, E. F., MENEZES, M., COELHO, R. S. B. 2002. Avaliação Da Patogenicidade E Diferenciação De Isolados De Colletotrichum Musae. Summa Phytopathologica **28**: 260-266.
- DENOYES, B., BAUDRY, A. 1995. Species Identification And Pathogenicity Study Of French Colletotrichum Strains Isolated From Strawberry Using Morphological And Cultural Characteristics. Phytopathology, **85**: 53-57.
- FREEMAN, S. 2000. Genetic Diversity And Host Specificity Of Colletotrichum Species On Various Fruits. In: Prusky, D., Freeman, S., Dickman, M. B. (Eds), Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, And Host-Pathogen Interaction, P. 131-144. The American Phytopathological Society, St. Paul Mn.
- FREIRE, F. C. O., CARDOSO, J. E. 1997. Doenças Das Anonáceas. Anonáceas: Produção E Mercado, P.196-213.
- FURTADO, E. L., BACH, E. B., KIMATI, H., MENTEN, J. O. M., SILVEIRA, A. P. 1999. Caracterização Morfológica, Patogênica E Isoenzimática De Isolados De Colletotrichum Gloeosporioides De Seringueira. Summa Phytopathologica, **25**: 222-227.
- GUNNEL, P. S., GUBLER, W. D. 1992. Taxonomy And Morphology Of Colletotrichum Species Pathogenic To Strawberry. Mycologia, **84**: 157-165.
- HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. 1975. The Use Of Solid Media For Detection Of Enzyme Production By Fungi. Mycologia, **67**: 597-607.
- HOWARD, C. M., MAAS, J. L., CHANDLER, C. K., ALBREGTS, E. E. 1992. Anthracnose Of Strawberry Caused By Colletotrichum Complex In Florida. Plant Dis., **76**: 796-981.
- KAVATI, R. O. 1992. Cultivo Da Atemoya. Fruticultura Tropical, P. 39-70.
- KUMMUANG, N., SMITH, B. J., DIEHL, S. V., GRAVES JR., C. H. 1996. Muscadine Grape Berry Rot Diseases In Mississippi: Disease Identification And Incidence. Plant Disease, **80**: 145-156.
- LEWIS, K. J. 1988. Biological Control Mechanism Of The Mycoparasite Phytium Oligandum Dreschler. Phd Thesis. Sheffield. University Of Sheffield.
- LIMA, E. F., CHAVES, G.M. 1992. Variabilidade De Colletotrichum Gossypii Var. Cephalosporioides. Fitopatologia Brasileira **17**: 61-66.
- MELO, M. R., POMMER, C. V., KAVATI, R., TOKUNAGA, T. 2002. Polinização Naturel Artificial Da Cherimóia (Annona Cherimola Mill.) No Estado De São Paulo. Revista Brasileira De Fruticultura, **24**: 631-633.
- MUNIZ, M. DE F. S., SANTOS, R. DE C. R. DOS, BARBOSA, G. V. DE S. 1998. Patogenicidade De Isolados De Colletotrichum Gloeosporioides Sobre Algumas Plantas Frutíferas. Summa Phytopathologica, **24**: 177-179.
- NEIROTTI, E., AZEVEDO, J. L. 1988. Técnica Semiquantitativa De Avaliação De Produção De Celulases Em Humicola Sp. Revista De Microbiologia **19**: 78-81.
- NOGUEIRA, E. A., MELLO, N. T. C., MAIA, M. L. 2005. Produção E Comercialização De Anonáceas Em São Paulo E Brasil. Informações Econômicas, **35**: 51-54.
- OLIVEIRA, R., MORAL, J., BOUHMDI, K., TRAPERO, A. 2005. Caracterización Morfológica Y Cultural De Aislados De Colletotrichum Spp. Causantes De La Antracnosis Del Olivo. Bol. San. Veg. Plagas, **31**: 531-548.
- PASCHOLATI, S.F. 1995. Fitopatógenos: Arsenal Enzimático. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Ed.). Manual De Fitopatologia. 3.Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 635 Pp.
- PERES, N. A. R., SOUZA, N. L., ZITKO, S. E., TIMMER, L. W. 2002. Activity Of Benomyl For Control Of Post-bloom Fruit Drop Of Citrus Caused By Colletotrichum Acutatum. Plant Disease, **86**: 620-624.
- PERES, N. A., TIMMER, L. W., ADASKAVEG, J. E., CORREL, J. C. 2005. Lifestyles Of Colletotrichum Acutatum. Plant Disease, **89**: 784-796.
- RAMOS, V. H. V.; PINTO, A. C. DE Q.; RODRIGUES, A. A. 2001. Introdução E Importância Socioeconômica. In: Pinto, A. C. De Q.; Rodrigues, A. A.; Silva, E. M. Da; Andrade, G. A. Da; Icuma, I. M.; Aguiar, J. L. P. De; Oliveira, M. A. S.; Junqueira, N. T. V.; Alves, R. T.; Ramos, V. H. V. Graviola: Produção: Aspectos Técnicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 45 Pp.
- SEELIGER, H.P.R. 1956. Use Of A Urease Test For The Screening And Identification Of Cryptococci. Journal Of Bacteriology **72**:127-131.
- SHI, Y., CORREL, J. C., GUERBER, J. C., ROM, C. R. 1996. Frequency Of Colletotrichum Species Causing Bitter Rot Of Apple In Southeastern United States. Plant Disease, **80**: 692-696.
- SIERRA, S.A. 1957. Simple Method For Detection Of Lipolytic Activity Of Microorganisms And Some Observations On The Influence Of The Contact Between Cells And Fatty Substrates. Antonie Van Leeuwenhoek, **23**: 15-22.
- SIMMONDS, J. H. 1965. A Study Of The Species Of Colletotrichum Causing Ripe Fruit Rots In Queensland. Queensl. J. Agric. Anim. Sci., **22**: 437-459.
- SMITH, B. J., BLACK, L. L. 1990. Morphological, Cultural And Pathogenic Variation Among Colletotrichum Species Isolated From Strawberry. Plant Disease, **74**: 69-76.
- STAMFORD, T. L. M., ARAUJO, J. M., STAMFORD, M. P. 1998. Atividade Enzimática De Microrganismos Isolados Do Jacatupé (Pachyrhizus Erosus L. Urban). Ciência E Tecnologia De Alimentos, **18**: 382-385.
- SUTTON, B. C. 1992. The Genus Glomerella And Its Anamorph Colletotrichum. In: Colletotrichum: Biology, Pathology And Control. J.A. Bailey Y M.J. Jeger, Eds. Cab International, Wallingford. Pp. 1-27
- THIND, T. S., JHOOTY, J. S. 1990. Studies On Variability In Two Colletotrichum Species Causing Anthracnose And Fruit Rot Of Chillies In Punjab. Indian Phytopathol, **43**: 53-58.
- TUITE, J. Plant Pathological Methods: Fungi And Bacteria. Minneapolis. Burgess Publishing Company. 1969.
- VILLANUEVA-ARCE, R., HERNÁNDEZ-ANGUIANO, A. M., YÁÑEZ-MORALES, M., TÉLIZ-ORTÍZ, D., MORA-AGUILERA, A.; CÁRDENAS-SORIANO, E., CASTAÑEDA-VIL-

DÓZOLA, A. 2005. Caracterización E Identificación De Colletotrichum Fragariae En Frutos De Chirimoya. *Agrociencia*, **39**: 93-106.

VINNERE, O. Approaches To Species Delineation In Anamorphic (Mitosporic) Fungi: A Study On Two

Extreme Cases. Faculty Of Science And Technology, 2004, 72p.

(Recepción: 6 Noviembre 2008)  
(Aceptación: 16 Enero 2009)