



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
DOUTORADO EM FITOTECNIA

KÉZIA FERREIRA ALVES

**DIVERSIDADE DE *Colletotrichum* spp. AGENTE ETIOLÓGICO DA SECA DOS
FRUTOS DE AÇAIZEIRO NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

MOSSORÓ
Março/2017

KÉZIA FERREIRA ALVES

**DIVERSIDADE DE *Colletotrichum* spp. AGENTE ETIOLÓGICO DA SECA DOS
FRUTOS DE AÇAIZEIRO NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Tese apresentada Programa de Pós-Graduação
em Fitotecnia da Universidade Federal Rural
do Semi-Árido como parte das exigências para
obtenção do grau de Doutor em Ciências:
Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de Plantas

Orientador: Prof. Dr. Rui Sales Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Eudes de Arruda
Carvalho

MOSSORÓ

Março/2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

F474d Ferreira Alves, Kezia.
Diversidade de Colletotrichum spp. agente etiológico da seca dos frutos de açaizeiro no estado do Pará, Brasil. / Kezia Ferreira Alves. - 2017.
70 f.: il.

Orientador: Rui Sales Júnior.
Coorientador: Eudes de Arruda Carvalho.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, 2017.

1. Etiologia. 2. Seca dos Frutos. 3. Filogenia. 4. Euterpe oleracea. 5. Isolados Colletotrichum. I. Sales Júnior, Rui , orient. II. de Arruda Carvalho, Eudes, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

KÉZIA FERREIRA ALVES

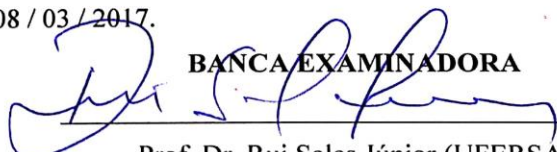
**DIVERSIDADE DE *Colletotrichum* spp. AGENTE ETIOLÓGICO DA SECA DOS
FRUTOS DE AÇAIZEIRO NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Tese apresentada Programa de Pós-Graduação
em Fitotecnia da Universidade Federal Rural
do Semi-Árido como parte das exigências para
obtenção do grau de Doutor em Ciências:
Fitotecnia.

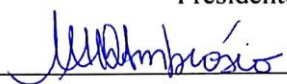
Linha de Pesquisa: Proteção de Plantas

Defendida em: 08 / 03 / 2017.

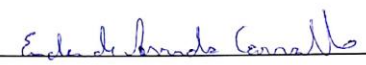
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Rui Sales Júnior (UFERSA)
Presidente



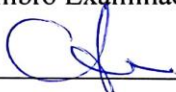
Prof. Dra. Marcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Eudes de Arruda Carvalho (Embrapa)
Membro Examinador



Prof. Dra Kenny Bonfim de Arruda Carvalho (Embrapa)
Membro Examinador



Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)
Membro Examinador

À querida e amada sogra Artenis Oliveira Lima, que durante seu breve tempo me presenteou com seus infinitos saberes terrenos e espirituais acerca da vida abundante em Cristo Jesus (In Memoriam).

DEDICO.

Aos pais, Luiz, Eny e “paidrasto” José Carlos,
meu alicerce, onde tenho um refúgio eterno
dos meus sonhos.

Aos irmãos Eder Daniel e Kédma,
espelhos de inteligência infinita desde a minha infância.

Ao meu companheiro de vida, Wesley Rafael,
pelo amor incondicional.

OFEREÇO.

“...porque nEle foram criadas todas as coisas que há nos céus e na terra, visíveis e invisíveis....tudo foi criado por Ele e para Ele. Ele é antes de todas as coisas, e todas as coisas subsistem por Ele.”(Colossenses 1:16,17)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, soberano e autor da minha vida.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará-Castanhal (IFPA), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Oriental (Embrapa) e a CAPES, por possibilitarem um DINTER e, assim qualificar-me profissionalmente por meio desta obra.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos durante o doutorado.

Aos meus colegas de turma que me instigaram a desenvolver o projeto de tese com a cultura do açaí. Em especial Lícia e Gilberta que sempre tinham uma palavra de incentivo durante a jornada. Minha gratidão e amizade.

Ao orientador Prof. Dr. Rui Sales Júnior por confiar no desenvolvimento deste projeto e proporcionar total liberdade para o meu amadurecimento científico.

Ao co-orientador, pesquisador Dr. Eudes de Arruda Carvalho, por dar credibilidade a este projeto e despertar um olhar mais amplo a respeito do patossistema *Colletotrichum* x açaí e, disponibilizar o seu tempo, recursos e pessoal para a continuidade deste projeto. Meu total respeito e admiração por sua dedicação, orientação, tranquilidade e confiança.

À Dra. Kenny Bonfim, pesquisadora que contribuiu nos primeiros passos para realização das análises moleculares nas dependências da Embrapa Amazônia Oriental (Belém) e Embrapa Recursos genéticos (Brasília). Minha gratidão e respeito.

À Dra. Alessandra Keiko Nakasone, pesquisadora que acolheu meu projeto de pesquisa e acrescentou muito na minha formação profissional e possibilitou a continuidade das análises moleculares e morfológicas em tempo hábil nas delimitações do laboratório da Embrapa Amazônia Oriental.

À equipe de técnicos Ida, Manoel Aline e Leonária, dos Laboratórios de Fitopatologia e Genética da Embrapa Amazônia Oriental por todo auxílio e presteza ao longo das análises moleculares.

À direção e a minha chefia imediata do IFPA-Campus Castanhal que foram favoráveis no processo de afastamento para dedicação exclusiva a esta obra.

Aos servidores, Edinaldo Meirelles e Sávio, sempre dispostos a ajudar no deslocamento e coleta de frutos nas áreas de produção.

À coordenação do setor de Agroindústria que disponibilizou o Laboratório de Microbiologia de Alimentos para a etapa de catalogação dos isolados fúngicos e caracterização morfológica e cultural.

À Prof^a. Carla da UFPA, setor de zoonoses, que disponibilizou o uso de equipamentos para esterilização e descarte de material.

À Prof^a. Juliana Simões do IFPA-Campus Castanhal que disponibilizou a utilização das BODs para os experimentos fisiológicos.

Aos produtores de açaí que abriram as portas de suas propriedades permitindo a coleta de frutos sem nenhum tipo de resistência.

Aos estagiários que passaram por este projeto, colaborando na manutenção da coleção de isolados e nos experimentos, destacando Silviane Messias, Kelly Borges e Miciane Araújo.

As estagiárias da Embrapa Rayanne, Silvia, Valéria, Sandra e Kátia que além de colaborar nas análises, proporcionaram um ambiente agradável para a realização dos trabalhos por meio dos laços da amizade.

Agradeço em especial a Valéria Dias, que contribuiu com seu tempo e paciência repassando de forma clara as instruções nas análises moleculares deste projeto.

Aos doutorandos Caio (UFRA) e Izael (UFAL) que me auxiliaram na interpretação das análises RFLP e Filogenia. Meu apreço por tamanha disposição.

À amiga Marzane, antropóloga que prestava sua solidariedade com palavras de força e incentivo quando mais precisava.

Ao meu cunhado Daniel Hamelberg, responsável pelo abstract deste manuscrito. Minha gratidão por tamanha dedicação.

A minha mãe Eny, irmã Kédma, cunhada Nádia, amiga Simone Hashimoto e Wesley Rafael pela companhia e colaboração durante as análises morfológicas e culturais, realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos do IFPA-Campus Castanhal.

Agradeço em especial a minha família e ao meu companheiro Wesley Rafael, pelo companheiro que foi no início ao fim desta jornada, pela paciência que teve com minhas emoções afloradas, pelas palavras de incentivo, pela compreensão nos dias sem fim nos laboratórios da Embrapa e do IFPA e pelo seu amor incondicional revelado nessas atitudes. Minha admiração, respeito, carinho e amor.

Ao apoio espiritual e palavras de otimismo do meu pai Luiz Alves, paidrasto Carlos e meu irmão Eder Daniel.

“N3o te tornais bom em desculpas, sê tu bom em resultados” (Autor desconhecido).

RESUMO

O açazeiro (*Euterpe oleracea*) é uma espécie da família Arecaceae e ocorre espontaneamente na Amazônia brasileira. Apresenta grande importância socioeconômica para a região. A Seca dos Frutos é uma doença da cultura do açazeiro que afeta o rendimento de polpa. Este trabalho objetiva estudar a diversidade do fungo *Colletotrichum* spp. por meio de caracterizações morfológicas, culturais, fisiológicas e genéticas. Sendo assim, foram coletados frutos com sintoma de seca em 7 municípios produtores de açaí, no Estado do Pará. Após os procedimentos laboratoriais, 20 amostras do fungo foram submetidas a testes de patogenicidade, caracterização morfológica e cultural; avaliações fisiológicas e sequenciamento genético. Todas as amostras do fungo cumpriram os Postulados de Koch. Foi possível evidenciar na caracterização morfocultural 3 tipos de conídios, alterações na coloração das colônias e massa conidial alaranjada na maioria das amostras do fungo. As temperaturas entre 24,05 e 27,89 °C determinaram os maiores índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos testados. O resultado do sequenciamento genético das regiões ITS5.8S e β -tubulina, concordou com a caracterização morfológica do fungo, apresentando sequências similares para o complexo *C. gloeosporioides*. Já o produto de PCR-ITS evidenciou diferentes padrões para as enzimas AluI, HhaI, MspI e RsaI, demonstrando especificidade destas enzimas para o *Colletotrichum* do açaí. Assim, foi possível comprovar que há variabilidade genética entre as amostras catalogadas para fungos do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da seca dos frutos do açazeiro no Estado do Pará.

Palavras-chave: Etiologia. Seca dos Frutos. Filogenia. Enzimas de restrição.

ABSTRACT

The açazeiro (*Euterpe oleracea*) is a species of the family Arecaceae and occurs spontaneously in the Brazilian Amazon. This plant has great socioeconomic importance for the region. Drought Fruits is a disease of the açai crop that affects the yield of pulp. This work aims to study the diversity of the fungus *Colletotrichum* spp. by means of morphological, cultural, physiological and genetic characterizations. After the laboratory procedures, 20 samples of the fungus were submitted to pathogenicity tests, morphological and cultural characterization; physiological assessments and genetic sequencing. All fungus samples fulfilled Postulates of Koch. With this, it was possible to show in the morpho-cultural characterization 3 types of conidia, changes in colony coloration and orange conidial mass in most fungus samples. Temperatures between 24.05°C and 27.89°C determined the highest rates of mycelial growth rate (IVCM) of the fungi tested. The results of the genetic sequencing of the ITS5.8S and β -tubulin regions agreed with the morphological characterization of the fungus and presented similar sequences for the *C. gloeosporioides* complex. The PCR-ITS product evidenced different patterns for the enzymes AluI, HhaI, MspI and RsaI demonstrating the specificity of these enzymes for açai *Colletotrichum*. Thus, it was possible to prove that there is genetic variability among the samples cataloged for fungi of the complex *Colletotrichum gloeosporioides*, etiological agent of the drought of açazeiro fruits in the State of Pará.

Key words: Etiology, Fruit Drought, Phylogeny, Restriction Enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A	–	Árvore filogenética concatenada da região ITS-5.8S e β -tubulina rDNA dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	37
Figura 2A		Eletroforese de PCR-ITS de isolados de <i>Colletotrichum</i> . Enzima de restrição HhaI.	
Figura 3A	–	Dendograma PCR-RFLP de 20 isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	42
Figura 1B	–	Localização dos municípios de coleta de frutos de açaí no Estado do Pará.....	52
Figura 2B	–	Teste de Patogenicidade com ferimentos.....	55
Figura 3B	–	Tipos de conídios produzidos por isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	56
Figura 4	–	Aspecto cultural de 20 isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	59
Figura 5	–	Regressão da média de crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. sob diferentes temperaturas.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A	–	Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de frutos com sintomas de seca dos frutos em açazeiro.....	31
Tabela 2A	–	Componentes da reação de amplificação do DNA dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	33
Tabela 3	–	Componentes do protocolo para digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição.....	35
Tabela 1B	–	Características morfológicas de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de frutos de açazeiro no Estado do Pará.....	57
Tabela 2B	–	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e características culturais de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	61

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

β	Beta
mA	MiliAmpers
pb	Pares de bases
kb	Quilobyte
®	Marca registrada
mL	Mililitros
rpm	Rotação por minuto
μ L	Microlitro
ng	Nanograma
rDNA	DNA ribossômico
mM	Milimolar
°C	Grau celsius
mg	Miligrama
g/L	Gramas por litro
IVCM	Índice de velocidade de crescimento micelial
ADE	Água destilada estéril
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
TBE	Tris – Borato - EDTA
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ITS	Espaço Interno Transcrito
Bt	Beta tubulina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
BDA	Batata - dextrose – ágar
BOD	Biological oxygen demand

SUMÁRIO

CAPÍTULO I- Introdução Geral	15
1.1 Origem e classificação botânica	15
1.2 Importância econômica	16
1.3 Seca dos frutos do açaizeiro	17
1.4 Aspectos biológicos e taxonômicos do gênero <i>Colletotrichum</i>	18
1.5 Variabilidade genética de <i>Colletotrichum</i> spp.	20
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II- Variabilidade genética de <i>Colletotrichum</i> spp., isolados de frutos de açaizeiro	
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4 CONCLUSÃO.....	44
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO III- Patogenicidade, caracterização morfocultural e fisiológica de <i>Colletotrichum</i> spp., isolados de frutos de açaizeiro	
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4 CONCLUSÃO.....	55
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Origem e Classificação Botânica

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da região amazônica brasileira, tendo o Estado do Pará como o principal centro de dispersão dessa palmeira (OLIVEIRA et al., 2000).

Populações espontâneas de açazeiros são encontradas nos Estados do Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins e em países da América do Sul (Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana) e da América Central (Panamá). Entretanto, a maior ocupação territorial da espécie é na Amazônia Oriental, mais precisamente no estuário do Rio Amazonas, nos arredores de Óbidos - PA, onde é considerado seu centro de origem. Neste, encontram-se densas e diversificadas populações da palmeira, ocupando uma área de aproximadamente 1.000.000 hectares (CALZAVARA, 1972; CAVALCANTE, 1991), adaptadas às condições climáticas, tais como, elevadas temperaturas, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (HOMMA et al., 2005).

Botanicamente, o açazeiro classifica-se como pertencente à divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Liliopsida Principes, família Arecaeae (Palmae), subfamília Ceroxylineae estando inserido no gênero *Euterpe*, sendo que o número de espécies varia entre 30 a 50 (HENDERSON, 2000; OLIVEIRA et al., 2002). Desse total, cinco são nativas do Brasil, sendo duas de forte expressão econômica, o açazeiro (*E. oleracea* Mart.) e a juçara (*E. edulis* Mart.) que se destacam como produtoras de frutos e palmito, respectivamente.

O gênero *Euterpe* é uma homenagem à musa da poesia lírica na mitologia grega, pelo magnífico aspecto destas palmeiras, enquanto o epíteto *oleracea* significa “que se assemelha ao vinho”, devido à cor e ao aroma da polpa. Já o nome comum “açai” vem do vocabulário tupi *iwasa'i*, e significa “fruto que chora”, ou seja, fruta que expele água (OLIVEIRA; MOCHIUTTI; NETO, 2009).

A palmeira de açai possui caule do tipo estipe, caracteriza-se pela abundante emissão de perfilhos na fase adulta, podendo atingir 25 estipes por touceira com até 30 m de altura (LORENZI, 1992; OLIVEIRA et al., 2002), todos com o mesmo genótipo, possibilitando a sua exploração contínua, desde que racionalmente manejada. Ao longo do estipe, são encontradas cicatrizes deixadas pelas folhas, que senescem e caem, formando nós e entrenós. As raízes são fasciculadas densas e superficiais, providas de lenticelas e aerêquimas, formando um agregado na base do estipe (HENDERSON, 2000).

No Pará, a floração do açaizeiro concentra-se na época mais chuvosa (janeiro a maio) e a frutificação nos períodos mais secos (setembro a dezembro) (OLIVEIRA, 1993; NASCIMENTO, 2008). O cacho é composto por centenas de frutos do tipo drupa globosas, verde brilhante, quando imaturos, e violáceo ou verde opaco quando maduros. A colheita pode ser realizada aproximadamente cinco a seis meses após a fecundação das flores (OLIVEIRA, 2002).

As sementes (caroços) do açaizeiro são aproveitadas no artesanato, adubo orgânico e empregado para a geração de energia térmica e elétrica (HOMMA, 2005; PADILHA, CANTO; RENDEIRO, 2006). As suas folhas são utilizadas para cobertura de casas dos habitantes do interior do Pará, confecção de artesanato e em construções rústicas. Além de tudo isto, a extração do palmito do estipe, possui excelente aceitação em todo o mercado nacional (LORENZI 1992; HOMMA, 2009).

1.2 Importância econômica

A partir da década 1990, os produtos florestais não madeireiros ganharam importância com o aumento da pressão internacional para a preservação da Amazônia (HOMMA, 2009). O extrativismo do açaí, atividade predominantemente da agricultura familiar, é demandante de mão-de-obra e exige, sobremaneira nos maciços dos igarapés, muita habilidade para o manejo e colheita dos frutos, destacando-se como a principal fonte de renda dos agricultores familiares paraenses (SOUZA, 2002).

No agronegócio brasileiro, a produção de açaí vem apresentando significativa participação dinâmica, sendo fortemente influenciado pela preferência dos consumidores que também têm redirecionado a produção para crescentes aumentos na dimensão territorial utilizada no processo produtivo desta palmeira (SANTANA, CARVALHO; MENDES, 2006).

O grande potencial socioeconômico do açaizeiro decorre, portanto, do aproveitamento da polpa dos frutos macerados de onde se extrai um suco denominado “açaí”, muito consumido pelas comunidades ribeirinhas e pela população paraense e, atualmente comercializada como polpa congelada, pasteurizada e na forma de mix (ROGEZ, 2000).

O consumo de açaí ultrapassa a necessidade alimentar, pois atrela questões culturais e, recentemente, os aspectos da estética e saúde, por ser rico em fibras, vitaminas e antocianina, que atraem consumidores seletivos e exigentes em nível mundial (BOBBIO et al., 2000; TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008).

De acordo com dados da CONAB, no ano de 2014 a produção do açaí nativo, proveniente do extrativismo, apresentou um aumento em valor, da ordem de 2,92%, em

relação ao ano anterior, auferindo R\$ 422.064 mil reais, enquanto o volume de produção caiu 2% em relação a 2013, saindo de 202,2 mil toneladas produzidas para 198,1 mil toneladas (CONAB, 2016).

Na mesorregião do Pará, Nordeste Paraense, os produtores vêm incorporando a tecnologia da irrigação no plantio de açaizeiros, objetivando maximizar a produção de açaí fora da época de safra, registrando-se em 2006, 74.730 ha de açaí plantados (NOGUEIRA, SANTANA; GARCIA, 2013). Entretanto, uma parceria entre instituições de pesquisa e a Secretaria de Agricultura do Pará (Sedap) visa expandir a área de produção em 50 mil ha até 2024 permitindo um incremento de até 360 mil t e reduzindo a sazonalidade do fruto (PORTAL BRASIL, 2016).

O Pará é responsável por 54,% da produção de açaí, seguidos do Amazonas 33,6%, Maranhão 7,0%, Acre 2,0%, Amapá 1,1%, Rondônia e Roraima com 0,9% de participação (CONAB, 2016). No Estado do Pará, os municípios Igarapé-Miri e Cametá se destacam na produção regional. A produção de polpa e mix de açaí vem se consolidando na cidade de Castanhal (nordeste paraense) como grande pólo de beneficiamento dessa fruta, sobretudo pela atuação da Petruz Fruit® (TAVARES; HOMMA, 2015).

No Brasil, grande parte dessa produção é comercializada para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Em 2014, as exportações atingiram a cifra de US\$ 22,523 milhões, o que corresponde a 84% do total da pauta de exportação de sucos do Estado do Pará com a participação americana de 48,77%, japonesa com 41,66% e europeia com 9,57% (TAVARES; HOMMA, 2015).

1.3 Seca dos frutos do açaizeiro

O cultivo do açaizeiro no Estado do Pará foi sendo expandido com o uso de sementes de origem genética desconhecida, perpetuando plantios desuniformes quanto à produtividade e qualidade dos frutos, haja vista que até pouco tempo, não existia campo de produção de sementes/mudas de matrizes selecionadas de açaizeiro, segundo os padrões técnicos, (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Da mesma forma, as técnicas de cultivo e produção carecem de aperfeiçoamento e pesquisas constantes. Há relatos de poucas doenças incidentes no açaizeiro, dentre elas a seca dos frutos é um exemplo de doença da cultura do açaizeiro, que vem incidindo em intensidades crescentes a cada ano nos períodos de safra e entressafra (CARVALHO, et al., 2015). Doenças endêmicas, ou seja, aquelas que ocorrem em baixas intensidades em áreas nativas poderão ocasionar prejuízos aos agricultores com a expansão da área cultivada, seja

em consorciação ou monocultivo. Isto é particularmente importante por se tratar de uma cultura em fase de domesticação (CLEMENT, 2001).

O primeiro relato de antracnose em palmeiras do gênero *Euterpe*, com associação ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc., foi registrado por Bovi et al., (1977). Estes autores relataram a ocorrência de manchas necróticas deprimidas na haste, no colo e na ráquis das folhas de mudas de diferentes espécies de *Euterpe*.

Da mesma forma, Batista et al. (2007) citaram a doença causando manchas necróticas em frutos verdes e maduros de açaí, coletados no município de Muaná-PA. Mais tarde, diversos autores Santos et al. (2012), Carvalho et al. (2015), Rocha et al. (2015); diagnosticaram a doença seca dos frutos com o típico sintoma de pontuações de coloração marrom a negra, que progride para a seca de frutos podendo cair ou ficar aderidos ao cacho de açaí, nos municípios de Abaetetuba, Belém, Igarapé-Miri e Tomé-Açu no Pará.

Embora *C. gloeosporioides* seja citado como agente etiológico da Antracnose/Seca em frutos de açaizeiro, não há relatos de estudos mais aprofundados de caracterização da sua variabilidade fenotípica e genotípica de espécies de *Colletotrichum* patogênicos ao açaizeiro. Excetuando-se Poltronieri et al. (2013), o qual confirmaram *C. gloeosporioides* com marcadores específicos da região ITS em isolados de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) na Mata atlântica-RJ e inoculados em frutos de açaizeiro (*E. oleracea*).

Os trabalhos encontrados na literatura acerca de patologias do açaizeiro referem-se, principalmente, ao relato de ocorrência das doenças, não havendo estudos sobre etiologia, epidemiologia e controle das doenças. Assim, torna-se necessário examinar se no patossistema *Colletotrichum* x açaizeiro x seca dos frutos há mais de uma espécie associada, pois em outros patossistemas, envolvendo frutíferas, há relatos de ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associadas com sintomas de antracnose (PENG et al., 2013; UDAYANGA et al., 2013; PARDO DE LA HOZ et al., 2016).

1.4 Aspectos biológicos e taxonômicos do gênero *Colletotrichum*

Taxonomicamente, *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo: *Glomerella cingulata*) pertence ao domínio Eukariota, reino Fungi, subreino Dikarya, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetos, ordem Phyllachorales e família Phyllachoraceae (SUTTON, 1992; HIBBETT et al. 2007).

As características morfológicas que o identificam são a conidiomata acervular, frequentemente com setas, as quais apresentam hifas estéreis de coloração escura, não ramificada e com parede espessa; a formação do apressório através do aumento do volume

das paredes na extremidade do tubo da hifa ou do *peg* de penetração, para unir o fungo à superfície do hospedeiro. A reprodução sexual é via esporos endógenos (ascósporos), originados no interior de ascas e, assexuadamente por esporos formados sobre ramificações do micélio (conidióforos) ou no interior de corpos frutíferos denominados acérvulos. Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz mucilaginosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, que os protegem da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (PERFECT et al., 1999).

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos gêneros fúngicos de maior importância econômica do ponto de vista fitopatológico, em regiões tropicais e subtropicais, são responsáveis por doenças economicamente importantes, comumente denominadas de antracnose, que ocorrem em extensa gama de hospedeiros (MENEZES, 2006; HYDE et al., 2009). Pesquisas recentes apontaram *Colletotrichum* spp. em oitavo lugar dentre os patógenos de relevante importância científica e econômica nas principais culturas no mundo (DEAN et al., 2012).

As plantas estão sujeitas a essa doença em todas as fases de desenvolvimento, e o patógeno pode ser dispersado de uma planta para outra por insetos polinizadores, vento e respingos d'água (MENEZES, 2006). Para invadir o tecido hospedeiro, as espécies de *Colletotrichum* utilizam estratégias de parasitismo hemibiotróficos intracelular a necrotróficos subcuticular, podendo ocorrer a penetração do tecido cuticularizado através de apressórios ou não. Também pode ocorrer penetração direta por hifas não diferenciadas através de células, estômatos e ferimentos (LOPEZ, 2001).

Os frutos infectados por *Colletotrichum* geralmente apresentam umidade na superfície, fato este que garante a germinação dos conídios, proporcionando o aparecimento de pequenas manchas redondas que podem aumentar em tamanho e o centro desta tornar-se enegrecido e desenvolveram massas de esporos gelatinosos que variam de rosa a alaranjado (WALLER et al. 1992; AGRIOS 2005; NELSON 2008).

Segundo as estimativas encontradas na literatura, o número de espécies de *Colletotrichum* varia bastante. O reconhecimento de espécies de *Colletotrichum* é motivado pela grande variação de caracteres morfológicos, por uma extensa gama de hospedeiros, assim como, a ampla variabilidade na patogenicidade dos isolados (THAUNG, 2008).

Por outro lado, a espécie *C. gloeosporioides* também possui uma denominação ampla, sendo inclusive considerada por alguns taxonomistas como um complexo de espécies (CAI et al., 2009; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

1.5 Variabilidade genética de *Colletotrichum* spp.

Tradicionalmente, as características morfológicas e culturais como tamanho e forma de conídios, presença de setas, e do teleomorfo, formato de apressórios, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento, são utilizadas para taxonomia de *Colletotrichum* para diferenciar complexos morfolologicamente próximos, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* Simmonds (SUTTON, 1992; ANDRADE et al., 2007).

Entretanto, as características morfológicas geram desconfiança em torno da sistemática de *Colletotrichum*. Desta forma, tem-se utilizado, além do estudo morfológico, dados de sequência do DNA, fisiologia, metabólitos secundários e patogenicidade, como parte preliminar durante a abordagem polifásica para a identificação de espécies (CANNON et al. 2000; PRIHASTUTI et al. 2009).

Baseado nestas informações, estudos mais detalhados do fungo *Colletotrichum* spp. em açazeiro devem ser explorados, tanto em áreas nativas como em plantios de terra firme, pois inexistem estudos mais aprofundados sobre a variabilidade morfológica e genética deste agente etiológico no Estado do Pará. Assim, a identificação correta e o conhecimento da variabilidade fenotípica e genotípica de espécies de *Colletotrichum* são aspectos essenciais para diagnose correta das doenças causadas por este patógeno (LOPEZ, 2001).

Nos últimos anos, diferentes técnicas moleculares baseadas no DNA vêm sendo aplicadas para diferenciar espécies do gênero *Colletotrichum* (DAMM et al., 2013), sendo também consideradas viáveis para uso rotineiro devido a sua rapidez e simplicidade na detecção de variabilidade genética em fungos e não sofrerem influência dos fatores que afetam a expressão gênica (TEIXEIRA; VIEIRA; MACHADO, 2004). Como as análises por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA ribossomal (rDNA) e mitocondrial (mDNA), sequenciamento de regiões conservadas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Internal Spacer Region*) do rDNA, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites (ARMESTO, 2013).

A análise filogenética, baseada em sequências da região ITS5.8S do rDNA, tem sido considerada uma abordagem extremamente útil, pois possui maior número de sequências depositadas para a identificação preliminar de espécie de *Colletotrichum* ou para colocá-lo em um complexo de espécie (CAI et al., 2009; SCHOCH et al., 2012).

Contudo, em muitas situações, o sequenciamento de outras regiões genômicas é requerido, especialmente quando se trata de *C. gloeosporioides* (WEIR et al., 2012). Tais

abordagens mudaram a visão de que essa é uma espécie monofilética e que era a única ou a principal causadora de antracnose em várias fruteiras tropicais (TARNOWSKI; PLOETZ, 2010; KAMEI et al., 2014; TOZZE Jr. et al., 2014).

Recentemente, várias regiões do genoma do gênero *Colletotrichum* têm sido analisadas em conjunto com a região conservada ITS, entre as quais a β -tubulina (TUB), Calmodulina (CAL), Glutamina sintetase (GS), Actina (ACT) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (PRIHASTUTI et al., 2009). Dessa forma, Weir, Johnston e Damm (2012) designaram 22 espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides* utilizando a filogenia multilocus e a partir deste acontecimento várias outras espécies foram descritas por diversos autores em diferentes hospedeiros (LIU et al., 2013; PENG et al., 2013; UDAYANGA et al., 2013).

Pardo De La Hoz et al. (2016), caracterizaram filogeneticamente espécies de *Colletotrichum* por meio dos três sintomas em manga (*Mangifera indica* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.), o sequenciamento da região ITS e GAPDH definiu os grupos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense* Moriwaki, Sato e Tsukib., para 91 isolados de diferentes localidades na Colômbia.

Yan et al. (2015), estudando a antracnose em uvas (*Vitis vinifera* L.), selecionaram 34 isolados obtidos de vinhedos doentes em seis províncias da China, por meio da análise multi-gene (ACT, ITS, GAPDH, TUB2 e CHS), juntamente com a morfologia demonstraram que *C. aenigma* Weir e Johnst, *C. hebeiense* Li, Wang, Hyde, Jayawardena e Yan, sp. nov. e *C. viniferum* Peng, Cai, Hyde e Ying foram associados com a antracnose da videira na China.

Até o presente momento, apenas *C. gloeosporioides* é citado como agente etiológico da antracnose/seca em frutos de açaizeiro no Estado do Pará. Entretanto, é comum mais de uma espécie deste patógeno causar antracnose em um mesmo hospedeiro, a exemplo do que ocorre com o maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims.) no Brasil, onde *C. gloeosporioides* e *C. capsici* (Syd. e P. Syd.) E. J. Butler e Bisby são relatados (TOZZE JÚNIOR et al., 2008). A ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro, pode dificultar o controle da antracnose, tornando-a uma doença ainda mais importante (FIRMINO et al., 2014).

Estudos indicaram que há variabilidade entre isolados de *Colletotrichum* numa diversidade de espécies frutíferas, sugerindo a existência de grupos de especialização patogênica (MUNIZ et al., 1998), e pode auxiliar na distinção de diferentes populações através de marcadores moleculares (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Estudos de diversidade de populações e as relações entre muitos fungos patogênicos de plantas, como as espécies de *Colletotrichum* (RAMDEEN; RAMPERSAD, 2013) têm sido executados por meio da técnica RFLP com o uso de endonucleases de restrição específicas e capazes de digerir fragmentos de DNA amplificados por PCR (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999; GANG et al., 2015).

No entanto, de acordo com Ribeiro et al. (2009), a técnica de PCR–RFLP deve ser utilizada atrelada ao sequenciamento, para se obter maior veracidade dos resultados em estudos de filogenia de microrganismos.

Desta forma, a correta identificação e caracterização da variabilidade das espécies de *Colletotrichum*, patogênicas ao açaí, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias para o adequado manejo, além de propiciar melhor entendimento da epidemiologia da doença, em áreas de monocultivo ou de consórcio com outras frutíferas.

2-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plant pathology. Academic press, New York, 5th ed., p. 483-500, 2005.
- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 021-031, 2007.
- ARMESTO, C. **Variabilidade morfológica e molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* em cafeeiros**. 2013. 99f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, MG.
- BATISTA, T. F. C. et al. Ocorrência de Antracnose em Frutos de Açaí, *Euterpe oleracea*, em Muaná, Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 360, 2007.
- BOBBIO, F. O. et al. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. **Ciência Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 20, n. 3, 2000.
- BOVI, M. L. A. et al. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Von Arx) sobre mudas de diferentes espécies de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart., *Euterpe oleraceae* Mart. e *Euterpe badiocarpa* Barb. Rodr.). In: GASPAROTTO, L.; BENTES, J. L. da S.; PEREIRA, J. C. R. (Eds). **Doenças de espécies florestais arbóreas nativas e exóticas na Amazônia: Doenças das palmeiras**. Embrapa, Brasília. p.145-163, 2014.
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 183-204, 2009.
- CALZAVARA, B. B. G. As possibilidades do açaizeiro no Estuário Amazônico. **Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará**, Belém, v. 5, p.1-103, 1972.
- CANNON, P. F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). **Colletotrichum host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Saint Paul: APS Press, p.1-20, 2000.
- CARVALHO, E. de A. et al. Seca dos frutos do açaizeiro em Abaetetuba, Belém e Igarapé-Miri. **VII Seminário de Iniciação Científica, Tecnológica e Inovação**. Conceição do Araguaia, PA. Anais N° 62855/ISBN, p. 50, 2015.
- CAVALCANTE, P. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: CEJUP, 271 p. 1991.
- CLEMENT, C. R. Melhoramento de espécies nativas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; INGLIS, M. C. V. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. p. 423-442, 2001.

- CONAB, 2016. Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura mensal. Elizabeth Turini. Acesso em 05 de Janeiro de 2017.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, p.29–59, 2013.
- DEAN, R. et al. Review The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, n. 4, p.414–430, 2012.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p. 1998.
- FIRMINO, A. C. et al. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose em plantas de atemóia e colonização do fungo nos frutos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 4, p.323-328, 2014.
- HENDERSON, A. 2000. The genus *Euterpe* in Brazil. In: **Domesticação e melhoramento de espécies amazônicas**. Ed. BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. Viçosa, p. 209-211. 2009.
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 509-547, 2007.
- HOMMA, A. K. O. et al. Sistema de Produção: Açaí. Belém: EMBRAPA, 137p. 2005.
- HOMMA, A. K. O. et al. Custo Operacional de Açaizeiro Irrigado com Microaspersão no Município de Tomé-Açu. **Comunicado Técnico 219**, Belém, 2009.
- HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* — names in current use. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, n. 1, p. 147–183, 2009.
- LOPEZ, A. M. Q. **Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum***. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, v. 9, p. 291-337, 2001.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Editora Plantarum, Nova Odessa. 1992.
- LIU F. et al. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of Proteaceae. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, p. 89–105, 2013.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v.3, p.170-179, 2006.
- MUNIZ, M. de F. S.; SANTOS, R. de C. R. dos; BARBOSA, G. V. de S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p.177-179, 1998.

- NASCIMENTO, W. M. O. Açaí: *Euterpe Oleracea*. Informativo Técnico. **Rede de Sementes**, Manaus, n. 18, 2008.
- NELSON S. C. Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), University of Hawaii at Mānoa, Honolulu, Hawaii. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 48, 2008.
- NOGUEIRA, A. K. M.; SANTANA, S. C. de.; GARCIA, W. S. A dinâmica do mercado de açaí fruto no Estado do Pará: de 1994 a 2009. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.3, p. 324-331, 2013.
- OLIVEIRA, M. do S. P. de.; CARVALHO, J. E. U. de; NASCIMENTO, W. M. O. do. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Embrapa Jaboticabal: FUNEP, Série Frutas Nativas, n.7, 52p. 2000.
- OLIVEIRA, M. S. P. de. Biologia floral do açaizeiro nas condições de Belém, PA. Embrapa. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Belém**, n. 8, 19p. mar. 2002.
- OLIVEIRA, M. S. P.; NETO, J. T. F. Cultivar BRS-Pará: Açaizeiro para produção de frutos em terra firme. **Comunicado técnico**, Belém, dez. 2004.
- OLIVEIRA, M. S. P.; MOCHIUTTI, S.; NETO, J. T. F. Domesticação e melhoramento do açaizeiro. In: **Domesticação e melhoramento de espécies amazônicas**. Ed. BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. Viçosa. cap.11, p. 209-211. 2009.
- PADILHA, J. L.; CANTO, S. A. E.; RENDEIRO, G. Avaliação do potencial dos caroços de açaí para a geração de energia. 11th Brazilian Congress of Thermal Sciences and Engineering - ENCIT 2006. Braz. Soc. of Mechanical Sciences and Engineering - ABCM, Curitiba, p.5-8, 2006.
- PARDO DE LA HOZ, C. J. et al. Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. **Plant Pathology**, Bari, n. 65, p.227–237, 2016.
- PENG, LI-JAN. et al. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Mycoscience**, Tokyo, v.54, p. 29-41, 2013.
- PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, New York, v. 27, n. 1, p. 186-198, 1999.
- POLTRONIERI, T. P. S.; AZEVEDO, L. A. S.; SILVA, D. E. M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 281-285, 2013.

PORTAL BRASIL, 2016. Pará ganha programa para ampliar produção de açaí. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2016/01/para-ganha-programa-para-ampliar-producao-de-acai>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 39, p. 89-109, 2009.

RAMDEEN, S.; RAMPERSAD, S. N. Intraspecific differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato based on in silico multilocus PCR-RFLP fingerprinting. **Molecular Biotechnonology**, Suíça, v. 53, p. 170-181, 2013.

RIBEIRO, D. C. et al. Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.8, n.1, p. 43-52, 2009. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/rca/article/view/35222/0>. Acesso em: 10 jun. 2016.

ROCHA, S. M. et al. Ocorrência de *Colletotrichum* spp. em frutos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) In: VI Seminário de iniciação científica, tecnológica e inovação,. **Anais...nº62855/ISBN**, v.1, p.120, Conceição do Araguaia. 2015.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA, 313p. 2000.

SANTANA, A. C.; CARVALHO, D. F.; MENDES, F. A. T. Organização e competitividade das empresas de polpas de frutas do Estado do Pará: 1995 a 2004. Unama, 2006.

SANTOS, T. P. F. et al. *Colletotrichum* spp. associado a frutos de açaizeiro em Tomé-Açu no Estado do Pará. In: 45º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2012, Manaus. **Anais...** Manaus: Suplemento, 2012. v. 37.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington DC, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SOUZA, L. A. de. Insetos Pragas em Acessos de Açaizeiro em Viveiro. Embrapa, **Comunicado Técnico**, Belém, n. 75, 2002.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, p.1-26, 1992.

TAVARES, G. S. dos.; HOMMA, A. K. O. Comercialização do açaí no estado do Pará: alguns comentários. Revista Observatório de la economia latino-americana. **Revista eumednet**, Espanha, 2015.

- TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 651-655, 2004.
- TEIXEIRA L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. de. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, Viçosa, v.55, p.297-304, 2008.
- THAUNG, M. M. et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, Bari, v.57, p.562–572, 2008.
- TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose do maracujazeiro-amarelo no Estado de São Paulo. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 5 p. 2008.
- UDAYANGA, D. et al. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, p.165–179, 2013.
- WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, n.73, p.115–180, 2012.
- YAN, J. et al. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. **Fungal Diversity**, Kunming, v.71, n. p.233–246, 2015.

CAPÍTULO II

Variabilidade genética de *Colletotrichum* spp., isolados de frutos de açaizeiro

Genetic variability of *Colletotrichum* spp., isolated from açaizeiro fruits

Kézia Ferreira Alves^I, Rui Sales Júnior^I, Kenny Bonfim de Arruda Carvalho^{II}, Valéria Dias Conceição^{III}, Eudes de Arruda Carvalho^{IV}

RESUMO

O açaizeiro (*Euterpe oleracea*) é uma espécie da família Arecaceae que ocorre espontaneamente na Amazônia brasileira e encontra-se em processo de domesticação para a exploração intensiva. Assim sendo, o conhecimento sobre doenças incidentes na cultura é limitado. A Seca dos Frutos é um exemplo de doença que foi relatada na cultura que vem incidindo em intensidades crescentes e variáveis a cada ano em plantios nos períodos de safra e entressafra. Desta forma, objetivou-se com este trabalho caracterizar a variabilidade genética *Colletotrichum* spp. agente etiológico da Seca dos Frutos do açaizeiro. O DNA genômico total foi extraído das 20 amostras para a realização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e posterior sequenciamento genético das regiões ITS5.8S e β -tubulina. O resultado da análise genética apresentou sequências similares para o complexo *C. gloeosporioides*. O produto de PCR-ITS foi digerido com as endonucleases de restrição AluI, EcoRI, HhaI, HpaII, MspI, RsaI, e TaqI, por meio da técnica de RFLP. O resultado dos produtos de PCR-ITS evidenciou diferentes padrões em AluI, HhaI, MspI e RsaI, demonstrando especificidade destas enzimas para este grupo de *Colletotrichum*. Assim, foi possível comprovar que há variabilidade genética entre os isolados do complexo *C. gloeosporioides*, agente etiológico da Seca dos Frutos do açaizeiro no Estado do Pará.

Palavras-chave: PCR. Similaridade genética. Enzimas de restrição. *Colletotrichum gloeosporioides*.

ABSTRACT

The açazeiro (*Euterpe oleracea*) is a species of the Arecaceae family that occurs spontaneously in the Brazilian Amazon and is in the process of domestication for intensive exploration. Therefore, knowledge about diseases incidental to the culture is limited. The fruit drought is an example of a disease that has been reported in the crop that has been affecting growing and variable intensities each year in plantations during the harvest and off-season periods. In this way, this work aimed to characterize the genetic variability *Colletotrichum* spp. etiological agent of the Fruit Seed of Açazeiro. The total genomic DNA was extracted from the 20 samples to perform the Polymerase Chain Reaction (PCR) and subsequent genetic sequencing of the ITS5.8S and β -tubulin regions. The result of the genetic analysis showed similar sequences for the *Colletotrichum gloeosporioides* complex. The PCR-ITS product was digested with the restriction endonucleases AluI, EcoRI, HhaI, HpaII, MspI, RsaI, and TaqI, by the RFLP technique. The results of the PCR-ITS products showed different patterns in AluI, HhaI, MspI and RsaI, demonstrating the specificity of these enzymes for this group of *Colletotrichum*. Thus, it was possible to verify that there is genetic variability among the isolates of the *C. gloeosporioides* complex, etiological agent of the fruit drought of açazeiro in the State of Pará.

Key words: PCR. Similarity genetic. Restriction enzymes. *Colletotrichum gloeosporioides*.

1 - INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira típica de produção de frutos e ocorre naturalmente no estuário amazônico, sendo a sua área de exploração extrativista estimada em mais de um milhão de hectares (NOGUEIRA; HOMMA, 2014). Com o crescimento do mercado, estas áreas de ocorrência natural estão sendo manejadas visando o aumento da sua densidade, transformando as florestas de várzeas heterogêneas em florestas oligárquicas dominadas pelos açazeiros. Também vem se observando um aumento de áreas de plantios em terra firme, em áreas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) abandonadas, bem como, de novos plantios de açazeiro consorciados com outras espécies frutíferas (HOMMA et al., 2006; FREITAS et al., 2015).

A baixa produtividade de 4,2 t/ha, em áreas de exploração extrativista, pode chegar a 15t/ha em sistema irrigado, em terra firme. Grande parte da produção é comercializada no país para os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais ou exportados para os Estados Unidos, Japão e países da Europa (TAVARES; HOMMA, 2015).

De acordo com Gasparotto, Santos e Pereira (2014), a antracnose, cujo agente etiológico é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc. , foi relatada pela primeira vez por Bovi et al. (1977), apresentando manchas necróticas na haste, colo e ráquis das folhas de mudas de diferentes espécies de *Euterpe*. Posteriormente, a doença foi diagnosticada por Batista et al. (2007) causando manchas necróticas em frutos verdes e maduros de açaí no município de Muaná - PA. Recentemente, Santos et al. (2012) e Carvalho et al. (2015) diagnosticaram frutos de açaí com sintoma de Seca dos Frutos, coletados nos municípios de Tomé-Açu; Abaetetuba, Belém, Igarapé-Miri no estado do Pará, respectivamente, e por meio de caracterização morfológica associaram os sintomas ao fungo *Colletotrichum* spp.

A Seca dos Frutos poderá se tornar uma importante doença para a cultura, com a expansão da área cultivada, uma vez que incide sobre o principal produto comercializado, reduzindo o número de frutos por cachos e o rendimento de polpa (Carvalho et al., 2015).

O gênero *Colletotrichum*, notoriamente, apresenta uma grande variação morfológica, o que reflete na ampla variabilidade genética que ocorre entre e dentro das espécies deste gênero (SUTTON, 1992; MENEZES, 2006). A classificação morfológica de isolados de *Colletotrichum*, fungo polífago e cosmopolita, foram utilizados na diagnose da seca dos frutos em palmeiras de açaí nas áreas de produção da região Norte. Mas, alguns autores, não

descreveram a espécie do fungo associado à seca dos frutos devido à ampla variabilidade de caracteres morfológicos, limitando-se ao taxa gênero (SANTOS et al., 2012; CARVALHO et al., 2015).

A variabilidade sugere a existência de grupos de especialização patogênica, ou mesmo a possibilidade de mais de uma espécie de *Colletotrichum* estar associada à seca dos frutos do açaizeiro. Desta forma, os estudos com a integração de métodos moleculares tornam-se essenciais para a identificação do agente etiológico numa gama de isolados patogênicos (CAI et al. 2009).

Dessa forma, o presente estudo, objetiva avaliar a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* spp. nas áreas de produção, por meio da técnica RFLP e sequenciamento genético.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises de diversidade genética dos isolados de *Colletotrichum* spp. foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia e Genética da Embrapa – Amazônia Oriental, localizados em Belém – PA.

Foram avaliados 20 isolados monospóricos obtidos de frutos de açaí com sintoma de seca, procedentes de sete municípios do Nordeste Paraense: Abaetetuba (CAB) e Castanhal (CCT, CIF e CFS) com 3 isolados cada, Acará (CAC), Santa Bárbara (CSB) e Tucuruí (CTC) com 1 isolado cada, Inhangapi (CIN) com 5 isolados e Igarapé-Miri (CIM) com 6 isolados (Tabela 1A).

Todos os isolados monospóricos foram submetidos à análise filogenética por meio da PCR - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) e sequenciamento das regiões ITS-5.8S rDNA e gene β -tubulina.

Tabela 1A – Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos com sintomas de Seca dos Frutos em açaizeiro [Castanhal, 2017].

Número/ amostra	Denominação	Ano/ Coleta	Coordenada geográfica	Procedência	Município
1	CIN2.1	2015	S 1° 20' 54'' - W 47° 54' 38''	Nativo/Várzea	Inhangapi
2	CIN8	2015	S 1° 20' 54'' - W 47° 54' 38''	Nativo/Várzea	Inhangapi
3	CIN10	2015	S 1° 20' 54'' - W 47° 54' 38''	Nativo/Várzea	Inhangapi
4	CCT	2014	S 07° 20' 53'' -	BRS-PA/TF ¹	Castanhal

5	CIM3.1	2014	W 50° 23' 45" S 01° 57' 28,8" – W 48° 54' 00,6"	BRS-PA/TF	Igarapé-Miri
6	CIM5	2014	S 01° 57' 27,6" – W 48° 53' 59,7"	BRS-PA/TF	Igarapé-Miri
7	CIF1	2015	S 01° 17' 53,2" – W 47° 57' 02,1"	Nativo/TF	Castanhal
8	CSB1.1	2015	S 01° 09' 33,3" – W 48° 16' 10,8"	BRS-PA/TF	Santa Bárbara
9	CFS2	2014	S 01° 17' 39,9" – W 48° 00' 36,3"	BRS-PA/TF	Castanhal
10	CTC6	2015	S 3° 46' 10" – W 49° 40' 27"	BRS-PA/TF	Tucuruí
11	CIM9	2014	S 01° 52' 47,8" – W 48° 58' 33,2"	Nativo/Várzea	Igarapé-Miri
12	CIN1	2015	S 1° 20' 54" – W 47° 54' 38"	Nativo/Várzea	Inhangapi
13	CAC3	2015	S 1° 57' 37" – W 48° 11' 47"	Nativo/Várzea	Acará
14	CAB1	2015	S 01° 43' 03" – W 48° 52' 58"	Nativo/Várzea	Abaetetuba
15	CAB2	2015	S 01° 43' 03" – W 48° 52' 58"	Nativo/Várzea	Abaetetuba
16	CAB3	2015	S 01° 43' 03" – W 48° 52' 58"	Nativo/Várzea	Abaetetuba
17	CIM7	2014	S 01° 52' 47,2" – W 48° 58' 36,2"	Nativo/Várzea	Igarapé-Miri
18	CIM8	2014	S 01° 52' 48,3" – W 48° 58' 30,9"	Nativo/Várzea	Igarapé-Miri
19	CIM15	2014	S 01° 52' 47,2" – W 48° 58' 36,2"	Nativo/Várzea	Igarapé-Miri
20	CIN3	2015	S 1° 20' 54" – W 47° 54' 38"	Nativo/Várzea	Inhangapi

¹Plantio de açaí em terra firme.

2.1 Extração DNA genômico, amplificação de fragmentos e sequenciamento

Culturas monospóricas dos 20 isolados de *Colletotrichum* foram cultivadas em meio BDA por 10 dias. Para a extração do DNA, o micélio de cada isolado foi raspado com cerca de 500 mg e submetido à extração do DNA genômico, utilizou-se a metodologia de extração de DNA descrita por Doyle et al. (1987) modificada. As concentrações de DNA foram mensuradas utilizando o programa Nanodrop® - ND 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e padronizadas para 10 ng/μl. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o *kit* Promega GoTaq® Flexi DNA Polimerase no termociclador Thermal Cyclers da Amplitherm® e o conjunto de primers foi utilizado para a reação de sequenciamento (Tabela 2A).

O fragmento do gene Espaço Interno Transcrito (ITS)-5.8S rDNA, foi amplificado utilizando-se os *primers* ITS 1 (*forward*; 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3') e ITS 4(*reverse*; 5'- TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3') (WHITE et al., 1990; RIBEIRO et al., 2009). A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 45 segundos, 72 °C por 90 segundos, finalizando-se o processo com 72 °C por 10 minutos (TEJESVI et al., 2009). A região do gene β -tubulina (TUB2) foi amplificada utilizando-se *primers* Bt2A (*forward*; 5'-TTC CCC CGT CTC CAC TTC TTCATG-3') e Bt2B (*reverse*; 5'- GAC GAC ATC GTT CAT GTT GAA CTC -3') (GLASS e DONALDSON, 1995; O'DONNELL e CIGELNIK, 1997), utilizando as seguintes condições de ciclo (1) desnaturação, por 4 minutos, a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturação, a 94 °C, por 40 segundos; (2) anelamento, por 30 segundos, a 59 °C; (3) extensão, a 72 °C, por 1 minuto e, (4) extensão final, a 72 °C durante 7 minutos (MAHMODI et al., 2014). Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit Gen Elute PCR Clean – Up Sigma® Aldrich seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras de DNA amplificadas para as regiões ITS e TUB2 foram enviadas para ACTGene Análises Moleculares (Alvorada-RS) para sequenciamento.

Tabela 2A - Componentes da reação de amplificação do DNA dos isolados de *Colletotrichum* spp. e respectivas concentrações utilizadas em reação de ITS, GAPDH e β -tubulina.

Componentes da reação	Concentração Estoque	Concentração final	Volume para 1 reação (μ L)
Água Milli-Q	-	-	29,7 μ L
Tampão de amplificação	5X	1X	10 μ L
dNTPs	10mM	0,2mM	1 μ L
MgCl ₂	50mM	6 μ M	6 μ L
Primer	10 μ M	1 μ M	0,5 μ L
Primer	10 μ M	1 μ M	0,5 μ L
Taq polimerase	5U/ μ L	1,5U/ μ L	0,3 μ L
DNA	-	-	2,0 μ L
Total			50 μL

Fonte: Autor

2.2 Análise das sequências

As sequências obtidas foram editadas, usando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005), concatenadas com o auxílio do programa Mega 6.0 e alinhadas pelo Clustal W. As sequências editadas foram utilizadas para procurar sequências similares usando o software *BlastN* do NCBI. A construção da árvore filogenética dos isolados de *Colletotrichum* spp. foi construída pelo programa Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013), utilizando na construção da matriz de distâncias, utilizou-se o método de caracteres Neighbornni Jhoining (TAMURA e NEI, 1993). A consistência dos agrupamentos foi verificada com *bootstrap* de 1000 replicações. Sequências de isolados pertencentes a diferentes espécies de *Colletotrichum* foram obtidas do GenBank (NCBI) e utilizadas na análise.

2.7 Análise por PCR - RFLP

O produto de PCR-ITS foi digerido com as endonucleases de restrição *Rsa* I, *Alu* I, *Msp* I, *Hpa* II, *Hha* I, *Eco* RI e *Taq* I (Thermo Scientific), seguindo as recomendações para cada enzima (Tabela 3). Os fragmentos de restrição foram separados electroforeticamente em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE 0,5X durante 4 h a 90 V e eletroforese DYY-6CBA Power Supply, juntamente com o padrão 1kb Plus DNA/Ladder, INVITROGEN®.

Tabela 3 - Componentes do protocolo para digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição.

Componentes	Concentração estoque	Volume para 1 reação
Água miliQ	-	3,5 µL
Tampão	1,0-2,0 µL	1,0 µL
Enzima	0,5-2,0 µL	0,5 µL
PCR-ITS	10 µL	5,0 µL
Total		10 µL

Fonte: Autor

2.8 Construção do Dendograma

A matriz resultante da análise de PCR-RFLP foi utilizada para a relação entre as espécies, estimada através da construção do dendograma baseado no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), para determinar a distância genética entre os isolados (NEI e LI, 1979). As análises foram realizadas com o programa NTSYS-pc versão 2.1.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização molecular por Sequenciamento

A Análise de DNA dos isolados foi comparada com a base de dados do GenBank através do *BlastN*, onde houve variação de 99 a 100% de similaridade genética para o gênero *Colletotrichum*.

Uma árvore filogenética (Figura 1A) foi construída a partir das sequências obtidas, e por meio do método de Neighbor Joining, os isolados separaram-se por similaridade genética. A análise filogenética das sequências nucleotídicas concatenadas das regiões ITS e β -tubulina revelou que os isolados avaliados apresentam similaridades variáveis nas regiões do DNA, estudadas com espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*, sugerindo possíveis espécies de *C. fructicola* Prihastuti, Cai e Hyde, *C. aenigma* Weir e Johnst., e *C. theobromicola* Brooks.

No presente estudo, foi possível observar a formação de dois agrupamentos, estando o primeiro com 100% de suporte e o segundo com baixo percentual de suporte dentre os isolados agrupados. Os isolados 13 e 08 sugere-se que estes possam estar relacionados com o clado de *C. fructicola*. Observou-se neste primeiro agrupamento que o isolado 10 agrupou no clado de *C. aenigma*; sugere-se ainda que os isolados 2, 3, 11, 5 e 9, estão relacionados com *C. theobromicola*, sendo que esta espécie foi reclassificada, sendo anteriormente designada como *C. fragariae* (WEIR, JHONSTON e DAMM, 2012).

Sabendo-se que os isolados agruparam-se mais entre si do que efetivamente com os acessos do Genbank, no segundo clado, é possível observar um agrupamento entre os isolados 6 e 7 com *C. gloeosporioides*. Os isolados 1,12 e 4 não agruparam com nenhuma das sequências obtidas das espécies estudadas, formando clados separados dentro dos agrupamentos principais, fato este que pode indicar distinção entre as espécies avaliadas neste trabalho.

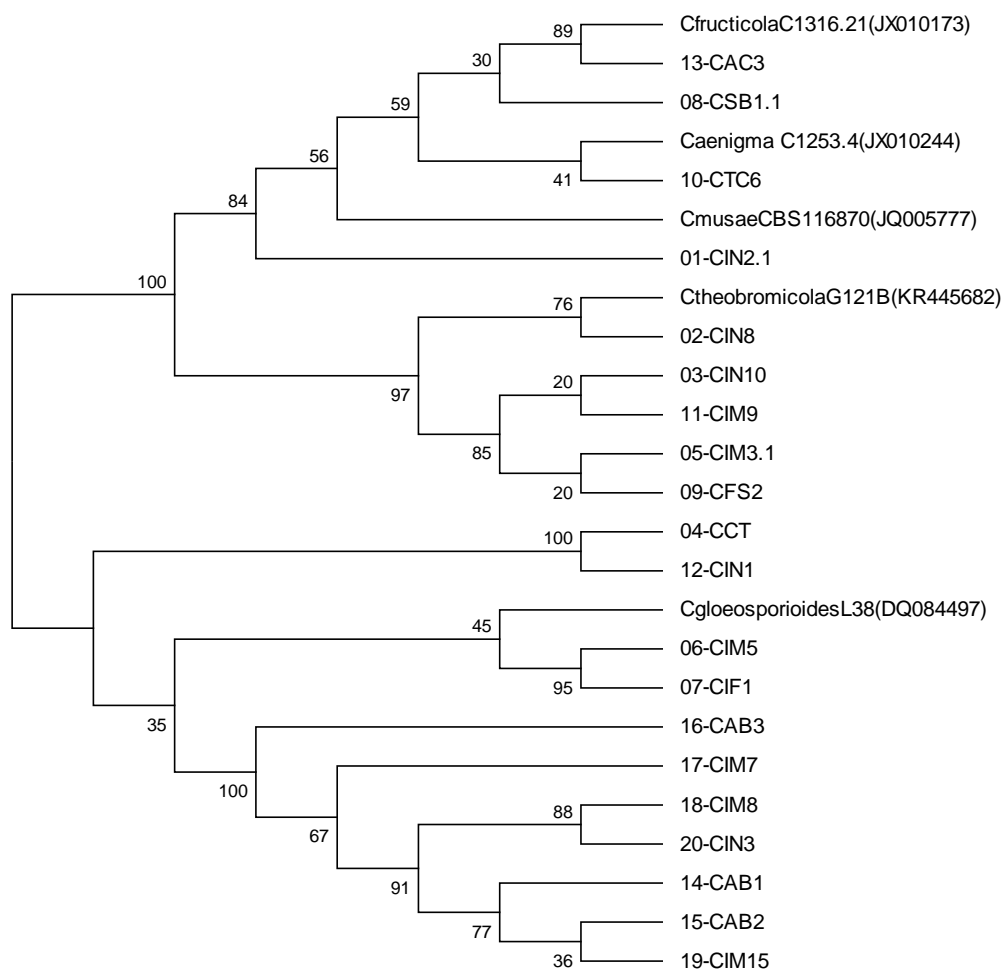


Figura 1A- Árvore filogenética construída pelo método *Neighbor-Joining* com sequências concatenadas de genes das regiões ITS-5.8S rDNA e β -tubulina de isolados de *Colletotrichum* spp (bootstrap com 1000 replicações).

O marcador ITS 5.8S rDNA vem sendo utilizado como parte inicial dos estudos filogenéticos de microrganismos, mostrando um polimorfismo específico e uma variabilidade específica (MARTIN e RYGIEWICZ, 2005). Entretanto, Weir, Jhonston e Damm (2012) relataram que embora a região ITS seja considerada uma região altamente conservada dos fungos, ele sozinho não resolve as relações existentes dentro do complexo *C. gloeosporioides*; porém, algumas espécies dentro deste complexo podem ser distinguidas apenas com a região ITS.

A exemplo deste registro, Cannon et al. (2012) compararam uma árvore filogenética de espécies de *Colletotrichum* derivadas de sequências sozinhas de ITS e uma gerada, a partir

de multilocus, confirmando que ITS pode definir clados principais, a exemplo dos clados formados com espécies do complexo *C. gloeosporioides* no presente estudo.

No Pará, somente *C. gloeosporioides* foi relatado como agente etiológico da seca dos frutos (BATISTA et al. 2007; CARVALHO et al. 2015; ROCHA et al. 2015). Este complexo foi reportado no Amazonas, Pará e nos Estados de Minas Gerais e Paraná, infectando folhas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e causando nos frutos lesões necróticas, irregulares a arredondadas, deprimidas e cobertas por uma massa mucilaginosa alaranjada, levando ao apodrecimento e queda prematura de frutos, sintoma típico da antracnose (MOTA e GASPAROTTO, 1995; VIDA et al., 2006; VERZIGNASSI; POLTRONIERI e BENCHIMOL, 2008). Entretanto, a análise filogenética concatenada das regiões ITS-5.8S rDNA e β -tubulina indicaram que, no Estado do Pará, outras espécies podem estar relacionadas a Seca dos Frutos do açaizeiro, dentro do complexo *C. gloeosporioides*.

Relacionando as possibilidades de mais de uma espécie estar ocasionando sintoma de seca nos frutos de açaí, Kamei et al. (2014) estudaram as características morfológicas de diversos isolados de *Colletotrichum* em anonáceas, associando ao sequenciamento da região ITS do rDNA, resultando na identificação de quatro espécies distintas deste taxa, *C. gloeosporioides*, *C. boninense* Moriwaki, Sato e Tsukib, *C. fragariae* e *C. magna* Jenkins e Winstead.

Fato similar foi descrito por Firmino et al. (2014), analisando 15 isolados de *Colletotrichum* procedentes de Atemóia (*Annona atemoya* L.) por meio da filogenia, das regiões ITS, β -tubulina e alfa elongase, encontrou agrupamentos com *C. acutatum* e *C. boninense*. Similarmente, Tozze Jr. et al. (2015) encontraram uma diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas a diferentes frutíferas, quando analisaram o concatenado das regiões ITS e β -tubulina do rDNA.

Entretanto, devido à existência de outras regiões específicas para elucidação e definição de espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides*, há a necessidade de investigar de forma minuciosa estas relações genéticas com as possíveis subespécies neste complexo já descrito por Weir, Jhonston e Damm (2012) e Cannon et al.(2012). É importante ressaltar que há possibilidade de novas espécies, neste grupo de isolados, para a cultura do açaizeiro no Estado do Pará, tendo em vista a diversidade biológica dos ambientes em que foram realizadas as coletas, centro de dispersão do açaizeiro.

Salustiano et al. (2014), ao trabalhar com 21 isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides* (Costa e Fraga Jr.), responsável pela ramulose do algodão, sequências

das regiões ITS e TUB2, formaram uma linhagem altamente suportada dentro do clado de *C. theobromicola*, e posteriormente por meio da inferência bayesiana com a região GAPDH, confirmaram a existência dentro do complexo *C. gloeosporioides* o clado monofilético de *C. theobromicola*. Exemplo deste fato está registrado nos trabalhos realizados por Yan-Ji-Ye et al. (2015), em análise multilocus de isolados de *Colletotrichum* proveniente de diferentes províncias da China, reportou três diferentes espécies associadas a antracnose em uva (*Vitis vinifera* L.).

Cannon et al. (2012) chamaram atenção para uma investigação minuciosa do DNA de fungos desse ex-epítipo *Colletotrichum*, não como apenas um isolado de uma coleção e sim mediante a um organismo completo e a sua interação com o ambiente em que está inserido, pois estudar o genoma completo torna-se uma ferramenta indispensável para definição de espécies deste complexo.

Os isolados de *Colletotrichum* do açaí, proveniente de áreas nativa e terra firme, apontam para uma diversidade morfológica e cultural já relatada. Fato comprovado por outros autores que registraram mais de uma espécie de *Colletotrichum* como agente etiológico de uma única doença em diferentes fruteiras (FIRMINO et al., 2014; KAMEI et al., 2014; TOZZE JÚNIOR et al., 2015; YAN JI-YE et al., 2015).

Há que se relacionar também o abandono de especificidade de uma espécie a um único hospedeiro (LIU et al., 2007), pois muitos estudos sobre *Colletotrichum* estão restritas a estirpes que afetam uma única espécie vegetal, reduzindo significativamente a extensão da carga genética amostrados (CANNON et al., 2012).

Em relação a este fato, novas descobertas pertinentes ao patossistema *Colletotrichum* x açaí x Seca dos Frutos estão por vir a partir da investigação das populações de patógenos e suas relações com o hospedeiro. Os resultados deste trabalho demonstram a existência de variabilidade genética entre isolados responsáveis pelo sintoma de seca dos frutos do açaizeiro no Estado do Pará. A ampliação e o aprofundamento dos estudos da etiologia abrangendo outras regiões específicas do fungo *Colletotrichum* spp., poderão dar subsídios as explicações da epidemiologia lógicas de doença e ao controle, seja químico, genético ou cultural. Ainda não há técnicas de controle para o manejo desta doença do açaizeiro. Essa constatação é útil para subsidiar o desenvolvimento e adoção de medidas de controle específicas para as espécies associadas à Seca dos Frutos no Estado do Pará.

3.2 Análise por PCR-RFLP

Os produtos de PCR-RFLP obtidos na amplificação para os 20 isolados de *Colletotrichum* apresentaram um padrão de 540 pares de base (pb). Esse padrão de fragmento obtido está dentro de 570pb encontrado por Kamei et al. (2014), quando trabalhou na filogenia de 51 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de pinheira e gravioleira provenientes do Estado de Alagoas. A amplificação da região ITS e a restrição por meio de endonucleases é uma importante ferramenta para descrever a variabilidade genética de fungos patogênicos de plantas, a exemplo do fungo *Colletotrichum* spp. (FREEMAN et al., 2001; SAHA, et al., 2002; CULEBRAS-MARTÍNEZ, 2003; FIGUEIREDO, 2012).

Observaram-se fragmentação do DNA entre 100 e 400 pb polimórficas na digestão utilizando as endonucleases AluI, HhaI, MspI, RsaI e TaqI. Não foi observado fragmentação do DNA com as enzimas HpaII e EcoRI. Segundo Ribeiro et al. (2009), a inespecificidade das enzimas pode explicar este fato; porém, é válido ressaltar que esta enzima não foi eficiente como marcador das regiões dos isolados do presente estudo, dando-se ênfase à utilização das enzimas AluI, RsaI, MspI e HhaI que conseguiram definir um padrão de clivagem na maioria dos isolados de *Colletotrichum* do açazeiro (Figura 2A).

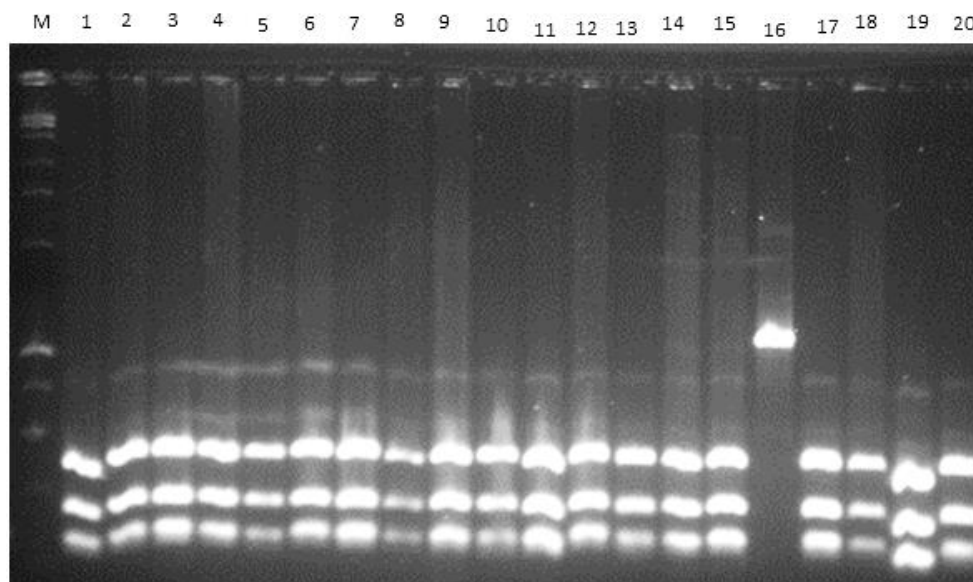


Figura 2A: Eletroforese de PCR-ITS de isolados de *Colletotrichum*. Enzima de restrição HhaI.

As enzimas AluI e RsaI gerou duas bandas polimórficas no sítio de restrição (400pb e 100pb), enquanto que a enzima HhaI-ITS digeriu e produziu três bandas (300pb, 100pb e

50pb) em todos os isolados, exceto no isolado 16. Entretanto, metade dos isolados, sendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 15 clivaram com MspI gerando duas bandas polimórficas no sítio de restrição (400 pb e 100pb), agrupando os isolados das diferentes localidades, porém com mesma origem de plantio-terra firme num mesmo grupo. Nos demais isolados não ocorreu clivagem para a enzima MspI.

Figueiredo et al. (2012) estudando a diversidade patogênica e genética de isolados de *C. gloeosporioides* do cajueiro no Estado de Pernambuco, por meio da técnica RFLP constataram que a enzima MspI apresentou polimorfismo e 65% de similaridade entre os isolados testados, alocando-os segundo a localidade de coleta.

Gang et al. (2015) estudando a variabilidade genética por meio da PCR-RFLP em diferentes regiões do genoma para 157 isolados de *Colletotrichum* de caqui (*Diospyros kaki* L.) doce em dois sistemas de produção orgânico e convencional, encontraram valores semelhantes para AluI e TaqI, referindo-se aos isolados deste estudo. Neste mesmo estudo, foi possível evidenciar que os isolados dos pomares orgânicos de caqui, apresentaram padrões mais diversos no nível genético do que os isolados dos pomares convencionais, não conseguindo distinguir a origem do patógeno. Fato este semelhante aos observados com os isolados de açaizeiro proveniente de diferentes localidades e natureza de produção.

Bernstein, Zehr e Dean (1995), estudando o polimorfismo intrínseco à coloração das colônias de *Colletotrichum* de maçã (*Malus domestica* Borkh.), pêra (*Pyrus communis* L.), pecan (*Carya illinoensis* K.) e outros hospedeiros com a enzima EcoRI, verificaram a digestão do DNA dos isolados de *C. acutatum* Simmonds (vermelhos) produzindo duas bandas de 510 pb e 210 pb, enquanto para os isolados de *C. gloeosporioides* (cinzentos) produziu bandas de 540 pb e 320 pb. Contrastando com Giaretta et al. (2010), trabalhando a filogenia em isolados patogênicos de *Colletotrichum* spp. de maçã e goiabeira (*Psidium guajava* L.) serrana, conseguiram fragmentar o DNA em pelo menos duas bandas polimórficas para as enzimas HpaII e EcoRI.

O dendograma construído a partir dos dados da matriz resultante da análise de PCR-RFLP permitiu a visualização de dois grupos (Figura 3A).

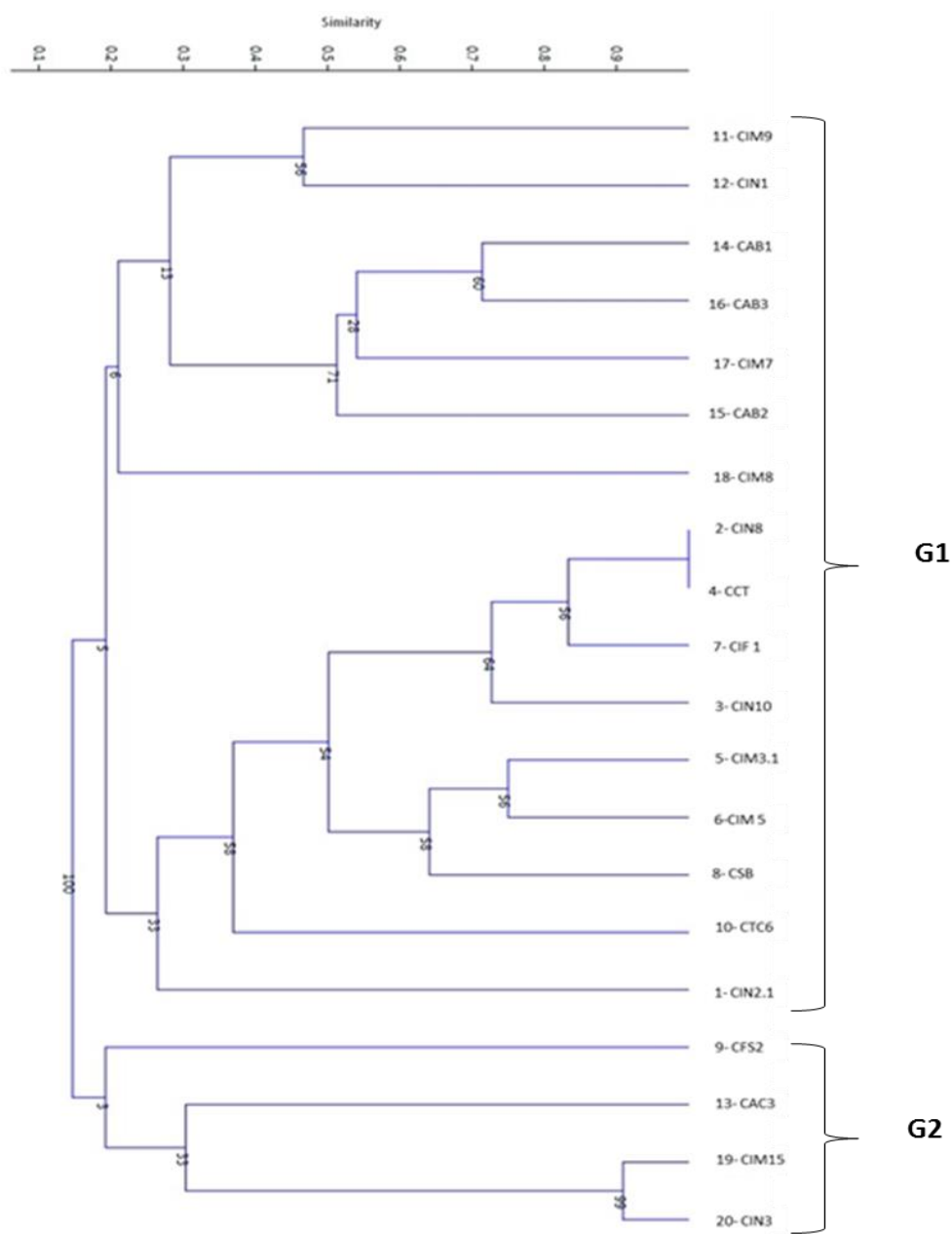


Figura 3A- Dendrograma PCR-RFLP de 20 isolados de *Colletotrichum* spp. baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

O primeiro grupo agrupou 16 dos 20 isolados com similaridade variáveis, proveniente dos municípios selecionados. Este grupo se subdividiu em 12 subgrupos, sendo o grau de confiabilidade de 100% entre si para os isolados 2 e 4, correlacionando com 56% de distância genética com o isolado 7. A maior distância genética refere-se ao isolado 18, enquanto que o sequenciamento genético demonstrou agrupamento com o isolado 20, demonstrando 88% de similaridade.

O clado formado com os isolados 14 e 16 se subdividiram com 60% de similaridade no clado e estão próximos geograficamente ao isolado 15 e 17, ratificando o agrupamento genético.

O segundo grupo subdividiu em três cladogramas, sendo que o clado apresentou o maior valor de similaridade genética (99%) entre os isolados 19 e 20 e 19, enquanto que o isolado 9 apresentou a maior distância genética, seguida do isolado 13.

A técnica da PCR - RFLP do rDNA foi utilizada para agrupar os isolados de *Colletotrichum* spp. e revelou heterogeneidade dentro dos grupos formados por meio dos padrões testados. Diferentemente do que foi observado em espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* em morangueiro (*Fragaria vesca* L.), onde nas análises não foi observado polimorfismo entre isolados de *C. gloeosporioides*, enquanto que os isolados de *C. fragariae* Brooks foram divididos em dois grupos com padrões distintos de restrição e houve heterogeneidade para *C. acutatum* (SCREENIVASAPRASAD; BROWN; MILLS, 1992).

Saha et al. (2002), por meio das ferramentas moleculares RAPD e PCR-RFLP, conseguiram discriminar 25 isolados de *C. gloeosporioides* associados a três diferentes sintomas em seringueira (*Hevea brasiliensis* L.) na Índia. As abordagens moleculares sugeriram que havia duas espécies de *Colletotrichum* associadas com a seringueira, incitando-a ao desenvolvimento de três sintomas diferentes. Fato este que pode sugerir a existência de mais de uma espécie de *Colletotrichum*, proporcionando o sintoma da Seca dos frutos do açaí.

4-CONCLUSÃO

O estudo de variabilidade genética de isolados patogênicos de *Colletotrichum* spp. confirmou a diversidade genética do agente etiológico da seca dos frutos, onde foi possível registrar espécies próximas ao complexo de *C.gloeosporioides*.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, T. F. C. et al. Ocorrência de fungos e nematóides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari (AM) **Revista de Ciências Agrárias**, n. 47, p. 163-171, jan/jun. 2007.
- BERNSTEIN, B. et al. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. **Plant Disease**, v. 79, p. 478-482, 1995.
- BOVI, M. L. A. et al. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Von Arx) sobre mudas de diferentes espécies de palmeiro (*Euterpe edulis* Mart., *Euterpe oleraceae* Mart. e *Euterpe badiocarpa* Barb. Rodr.). In: GASPAROTTO, L.; BENTES, J. L. da S.; PEREIRA, J. C. R. (Eds). **Doenças de espécies florestais arbóreas nativas e exóticas na Amazônia: Doenças das palmeiras**. Embrapa, Brasília. p.145-163, 2014.
- CARVALHO, E. de A. et al. Seca dos frutos do açaizeiro em Abaetetuba, Belém e Igarapé-miri. VII Seminário de Iniciação Científica, Tecnológica e Inovação. Conceição do Araguaia, PA. Anais Nº 62855/ISBN, p. 50, 2015.
- CANNON et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012.
- CULEBRAS-MARTÍNEZ, P. V. M. et al. Phylogenetic Relationships Among *Colletotrichum* Pathogens of Strawberry and Design of PCR Primers for their Identification. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 151, p. 135-143, 2003.
- DOYLE, J. J. et al. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. 1987. In: **Protocolo para extração de Dna genômico de *Anacardium giganteum***. W. HANCOCK EX ENGL. (ANACARDIACEAE). SILVA, B. M. L. et al. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19, p. 2401, 2014.
- FIGUEIREDO, L. C. et al. Genetic and pathogenic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of cashew anthracnose. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 2, n.1, Jan-Mar, p.250- 259, 2012.
- FIRMINO, A. C. et al. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose em plantas de atemóia e colonização do fungo nos frutos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.40, n.4, p.323-328, 2014.
- FREEMAN, S. et al. Genetic Diversity Within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, p. 586-592, 2001.

- FREITAS, M. A. B. et al. Floristic impoverishment of Amazonian floodplain forests managed for açai fruit production. **Forest Ecology and Management**, Arizona, n. 351, p.20–27, 2015.
- GANG, G. et al. Analysis of Fungicide Sensitivity and Genetic Diversity among *Colletotrichum* Species in Sweet Persimmon. **Journal Plant Pathology**, Bari, v. 31, n. 2, p. 115-122, 2015.
- GASPAROTTO, L. et al. **Doenças de espécies florestais arbóreas nativas e exóticas na Amazônia: Doenças das Palmeiras**. Eds. Embrapa, Brasília, cap. 7, p.156, 2014.
- GIARETTA, D. R. et al. ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp. causal agent of apple *Glomerella* leaf spot. **Ciência Rural**, v.40, n.4, p.806-812, abr, 2010.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p.1323–1330, 1995.
- HOMMA, A. K. O. et al. Custo operacional de açazeiro irrigado no Nordeste Paraense. Embrapa Amazônia Oriental, Belém. Série Documentos, n. 255, 18p. 2006.
- HOMMA, A. K. O. et al. Açai: novos desafios e tendências. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n.2, p.7-23, 2006.
- KAMEI, H. S. et al. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no Estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [online], v. 36, edição especial, p. 209-216, 2014.
- LIU B. et al. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility and host specificity. **Phytopathology**, Saint Paul, v.97, p. 1305–1314, 2007.
- MAHMUDI, F. et al. Genetic Diversity and Differentiation of *Colletotrichum* spp. Isolates Associated with Leguminosae Using Multigene Loci, RAPD and ISSR. **Journal Plant Pathology**, Bari, v. 30, n.1, p.10-24, 2014.
- MARTIN, K. J.; RYGIEWICZ, P. T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, Londres, v. 5, n.28, p. 1-11, 2005.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.3, p.170-179, 2006.
- MOTA, A. M.; GASPAROTTO, L. Dinâmica da queda precoce de frutos de pupunheira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.337, 1995.

- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **National Academy of Sciences of the United States of America Proceedings**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.
- NOGUEIRA, O. L.; HOMMA, A. K. O. Importância do manejo de recursos extrativos em aumentar a capacidade de suporte: o caso de açaizeiros (*Euterpe oleracea* Mart.) no estuário amazônico. In: HOMMA, A. K. O. (Ed.). **Extratativismo vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação**. Brasília, DF: Embrapa, p. 167-176, 2014.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 7, n. 103, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>.
- RIBEIRO, D. C. et al. Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.8, n.1, p. 43-52, 2009.
- ROCHA, S. M. et al. Ocorrência de *Colletotrichum* spp. em frutos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Conceição do Araguaia, PA, 2015. In: VI Seminário de iniciação científica, tecnológica e inovação. **Anais...Nº 62855/ISBN**, v.1, p.120.
- SAHA, T. et al. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycological Research**, v. 106 n. 2, p.215-21, 2002.
- SALUSTIANO, M. E. The etiological agent of cotton ramulosis represents a single phylogenetic lineage within the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 5, p.357-367, 2014.
- SANTOS, T. P. F. et al. *Colletotrichum* spp. associado a frutos de açaizeiro em Tomé-Açú no Estado do Pará. **Tropical Plant Pathology** v. 37 (Suplemento), p.737, agosto 2012. 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia – Manaus. Anais. ISSN 1982-5676.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A.; Jeger, M.J. (eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford. p. 1-26, 1992.
- TAMURA K.; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

- TAMURA K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.30, p. 2725-2729, 2013.
- TAVARES, G. S. dos.; HOMMA, A. K. O. Comercialização do açaí no estado do Pará: alguns comentários. Observatório de la economia latino-americana. **Revista eumednet**, Espanha, 2015.
- TEJESVI, M. V. et al. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* species from ethnopharmacologically important medicinal trees. **Fungal Diversity**, Kunming, v.38, p.167-183, 2009.
- TEMPLETON, M. D; RIKKERINK, E. H. ; SOLON, S. L.; CROWHURST, R. N. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, Madison, v. 122, p.225-230, 1992.
- TOZZE JÚNIOR, et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.41, n.4, p.270-280, 2015.
- VERZIGNASSI, J. R.; POLTRONIERI, L. S.; BENCHIMOL, R. L. Antracnose em frutos de pupunheira no Pará. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 49, p.173-175. 2008.
- VIDA, J. B. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnosis on peach palm fruits in Minas Gerais and Paraná States, Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.4, p.379-380, 2006.
- WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p.115–180, 2012.
- YAN, et al. Diverse species of **Colletotrichum** associated with grapevine anthracnose in China. **Fungal Diversity**, Kunming, v.71, p.233–246, 2015.

CAPÍTULO III

Patogenicidade, caracterização morfocultural e fisiológica de *Colletotrichum* spp., isolados de frutos de açaizeiro

Pathogenicity, morphocultural and physiological characterization of *Colletotrichum* spp. Isolates from açai fruits

**Kézia Ferreira Alves^I Rui Sales Júnior^I Silviane da Rocha Messias^{II} Miciane Araújo^{II}
Eudes de Arruda Carvalho^{III}**

RESUMO

O açaizeiro é uma espécie frutífera de grande importância socioeconômica para a região Amazônica. A seca dos frutos, cujo agente etiológico é o fungo *Colletotrichum* spp. é uma das principais doenças nesta cultura por diminuir o rendimento de polpa. O objetivo deste trabalho foi caracterizar 20 isolados de *Colletotrichum* spp. por meio de análises morfológicas, culturais e fisiológicas. As amostras do fungo foram submetidos a testes de patogenicidade, caracterização morfocultural. Além disso, houve avaliações fisiológicas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), sob as temperaturas 20, 25, 30, 35 e 40 °C, durante seis dias com fotoperíodo de 12h. Todos os isolados de açaí foram patogênicos, cumprindo os Postulados de Koch. As características morfológicas evidenciaram conídios retos oblongos com ápices arredondados; reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra e reto com constrição. Enquanto que, a coloração das colônias apresentou variações entre branca a branca acinzentada; cinza claro a branco salmão; e reverso variando entre branco castanho a castanho escuro e esverdeado; além da presença de massa conidial alaranjada. As temperaturas entre 24,05 e 27,89 °C determinaram os maiores índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Os fungos catalogados apresentaram características morfoculturais pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides*.

Palavras-chave: Patogenicidade, *Euterpe oleracea*, temperatura, isolados.

ABSTRACT

The açaizeiro is a fruitful species of great socioeconomic importance for the Amazon region. The fruit drought, whose etiological agent is the fungus *Colletotrichum* spp. is one of the major diseases in this crop by decreasing pulp yield. The objective of this work was to characterize 20 isolates of *Colletotrichum* spp. by means of morphological, cultural and physiological analyzes. The fungus samples were submitted to pathogenicity tests, morphocultural characterization. In addition, there were physiological evaluations in potato Dextrose Agar (BDA) medium, under the temperatures 20, 25, 30, 35 and 40°C, during six days with photoperiod of 12 hours. All the isolates of açai were pathogenic, fulfilling the Postulates of Koch. The morphological features showed oblong straight conidia with rounded apices; straight, nailed, tapered at one end and rounded at the other, and straight with constriction. The coloration of the colonies showed variations between white and grayish white; light gray to white salmon. It is also emphasized that there was a reversal ranging from white brown to dark brown and greenish; besides the presence of orange conidial mass. Temperatures between 24.05°C and 27.89°C determined the highest mycelial growth rate index (IVCM). The cataloged fungi showed morphocultural characteristics belonging to the *Colletotrichum gloeosporioides* complex.

Key words: Pathogenicity. *Euterpe oleracea*. Temperature. isolated.

1-INTRODUÇÃO

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma espécie da família Arecaceae que ocorre espontaneamente na Amazônia brasileira, mais precisamente na região do estuário do rio Amazonas e se apresenta em forma de maciços naturais conhecidos como açaizais, predominante em áreas de várzea (NOGUEIRA et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2009). Os frutos dessa palmeira integram o hábito alimentar da população local e das comunidades ribeirinhas do Estado do Pará (KAHN, 1991; OLIVEIRA, 2002).

O fruto de açaí, considerado como um alimento completo, transformou-o em uma mercadoria global de alta demanda, resultando em aumentos de preços, o que tem garantido a preservação das plantas para a obtenção de frutos e não mais provocando sua derrubada para a extração de palmito como acontecia até o final da década de 80 (NOGUEIRA, 1997; HOMMA, 2006). Além disto, as áreas de açaizais nativos manejados ou cultivados em terra firme, irrigados ou não, consorciados ou em monocultivo, têm crescido frente à demanda pelo fruto.

Entretanto, a expansão dos cultivos tem propiciado condições favoráveis ao desenvolvimento de algumas doenças. A seca dos frutos é um exemplo de doença que vem incidindo de forma crescente a cada ano em plantios no Estado do Pará, causando sintomas na parte aérea e nos frutos (Carvalho et al., 2015). Até o presente momento, a literatura cita apenas *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.) Penz. e Sacc. como agente etiológico da antracnose/seca dos frutos em açaizeiro. O primeiro relato de antracnose em palmeiras do gênero *Euterpe* foi registrado por Bovi et al. (1977). Da mesma forma, Batista et al. (2007) citaram a doença causando manchas necróticas em frutos verdes e maduros de açaí coletados no município de Muaná-PA.

Santos et al. (2012) isolaram o fungo *Colletotrichum* spp. de amostras de frutos secos caídos ou aderidos ao cacho, oriundos do município de Tomé-Açu, no Brasil. Em trabalho semelhante, Carvalho et al. (2015) diagnosticaram a seca dos frutos em plantios nativos e plantados em Belém e nos municípios de Igarapé-Miri, Abaetetuba, Castanhal e São Francisco do Pará e, por meio de isolamentos diretos e observações microscópicas, confirmaram a presença do gênero *Colletotrichum*. Mais recentemente, Poltronieri et al. (2014) relataram a antracnose (*C. gloeosporioides*) em frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.), espécie da mesma família do açaí, na Mata Atlântica. Não obstante, não há estudos aprofundados sobre a etiologia do patossistema *Colletotrichum* sp.-açaizeiro.

Estudos de caracterização são fundamentais para que se identifique corretamente e se conheça a amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno (TOZZE JR.; MELO; MASSOLA JR., 2006). A diversidade de isolados e a presença de mais de uma espécie de fungo concomitantemente poderão determinar quais estratégias a serem empregadas, seja para o melhoramento genético, controle químico e até o controle cultural, optando pelo consórcio ou monocultivo.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de açaí, por meio de análises morfológicas, culturais e fisiológicas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta, Identificação do Patógeno e Cultivo monospóric

Frutos de açaí, com sintoma de seca foram coletados de cachos de palmeiras de açaí nativos e de terra firme nos municípios de Abaetetuba, Acará, Castanhal, Inhangapi, Igarapé-Miri, Santa Bárbara e Tucuruí (Figura 1B).

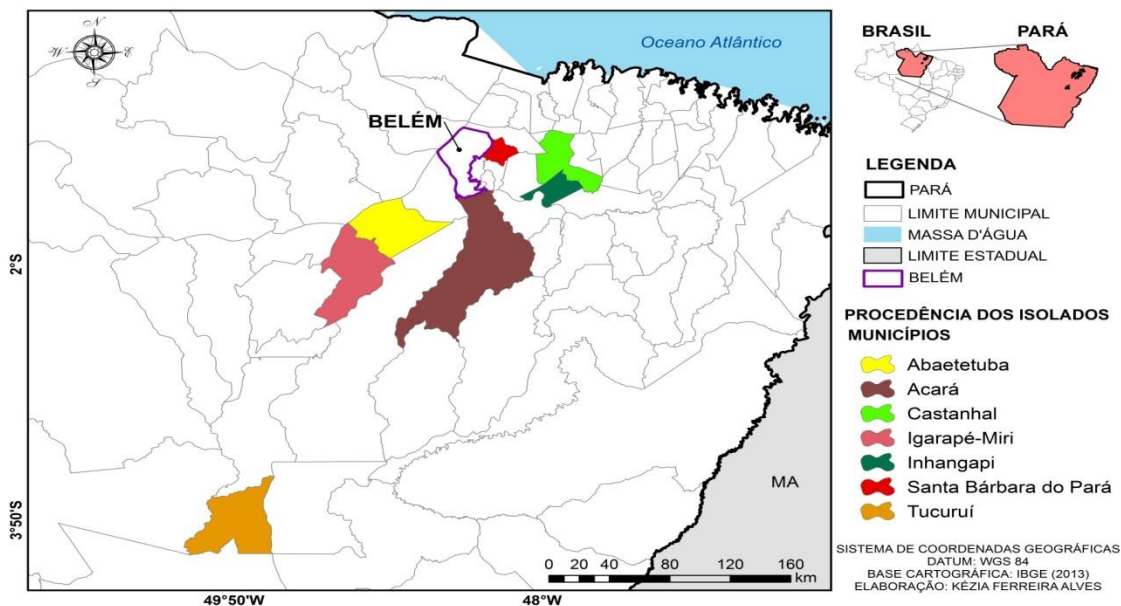


Figura 1B- Localização dos municípios de coleta de frutos de açaí no Estado do Pará.

Os frutos seguiram para análises no Laboratório de Microbiologia de Alimentos no Departamento de Agroindústria, IFPA – Campus Castanhal, onde foram incubados em caixas tipo “gerbox” sob câmara úmida, para estimular a esporulação do fungo durante 24 a 48 horas, sendo em seguida realizado o isolamento fúngico.

Massas de esporos presentes nas superfícies dos frutos foram transferidas para placas de Petri contendo meio Ágar-Água (20g ágar/1L água). Estas foram mantidas em estufa incubadora tipo BOD, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após observação do crescimento micelial, discos de micélio foram repicados para placas de Petri, contendo meio Batata – Dextrose - Ágar (BDA), marca KASVI® (39 g/L) e, posteriormente, foram mantidas em estufa incubadora tipo BOD (Biological Oxygen Demand) a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 7-10 dias.

Foram obtidas 20 culturas monospóricas de todos os isolados, conforme descrito por Serra, Coelho e Menezes (2008), sendo designado um código conforme ao município de origem (Tabela 1A). Procedendo-se à incubação durante sete dias, sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade do isolamento inicial.

2.2 Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi conduzido em frutos verdes com ferimentos e inoculação de suspensão conidial (10^6 esporos.mL⁻¹).

Após coleta do cacho com frutos verdes, selecionaram-se frutos assintomáticos, os quais foram lavados em água corrente por 60 segundos, de acordo com Sanders e Korsten, (2003); Montri, Taylor e Mongkolporn (2009). Procedeu-se a demarcação da área a ser inoculada em cada fruto com agulha estéril e foi realizado micro fermento com agulha estéril seguido da deposição de 10µL da suspensão conidial (10^6 esporos.mL⁻¹) com uma pipeta automática (THAN et al., 2008). Após a inoculação, 15 frutos foram colocados em caixas tipo gerbox, com papel toalha umedecidos e incubados sob temperatura ambiente de $\pm 28^\circ\text{C}$. A partir do segundo dia da inoculação, foram realizadas observações diárias, em intervalos de 24 h, estendendo-se até o 4º dia da inoculação. Foram considerados patogênicos os isolados que apresentaram lesões necróticas, com esporulação na área delimitada dos frutos. O teste foi conduzido com 15 repetições, sendo cada parcela constituída de um fruto inoculado em quatro pontos. Como controle, foram utilizados frutos com micro ferimentos inoculados com 10µL de água destilada esterilizada (ADE).

2.3 Caracterização morfológica e cultural

Os isolados foram cultivados em meio BDA e incubados em BOD a 25 °C. Após sete dias, foram realizadas as caracterizações morfológica e cultural. Avaliou-se as formas de 50 conídios, em quatro (4) lâminas por isolado, preparadas a partir de suspensão de inóculo, além das colorações das colônias no anverso e no reverso do verso destas. Cada formato encontrado recebeu uma numeração, a qual foi utilizada para classificação dos conídios, de acordo com a descrição de Sutton (1992) e Tozze Júnior (2015): (1) oblongo, com ápices arredondados; (2) clavado afilado em uma extremidade e oblongo na outra; (3) oblongo com constrição na região mediana. Os resultados foram transformados em porcentagens de cada formato apresentado pelo isolado. Para as mensurações do comprimento e largura foi empregada ocular micrométrica acoplada a um microscópio de luz trilocular (AX10 – LAB-A1-Zeiss) onde, também, foram registradas imagens dos conídios.

Para a caracterização fisiológica, discos de micélio de *Colletotrichum* com sete milímetros, e cinco dias de cultivo foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio de cultura. Após a repicagem, as placas foram mantidas em BODs, com temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C e fotoperíodo de 12 h. A avaliação do crescimento micelial foi realizada durante 5 dias, iniciando-se 24 horas após a repicagem. Foram tomadas as medidas do diâmetro da colônia em dois sentidos, diametralmente opostos, com um paquímetro digital para posterior cálculo do IVCN (índice de velocidade de crescimento micelial), descrita por OLIVEIRA (1991).

$$IVCM = \frac{\sum (D - Da)}{N}$$

N

Sendo:

D= diâmetro médio atual da colônia;

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada parcela experimental foi representada por uma placa. Os dados de IVCN foram submetidos à análise de variância no programa SISVAR[®], aplicando-se o teste de F, a 5% de probabilidade, a comparação entre as médias de IVCN dos isolados foi realizada pelo teste de Scott-Knott a 5% e a definição das melhores temperaturas por isolado foi realizada pelo ajuste de modelos de regressão.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se sintomas da doença a partir do 2º dia após a inoculação, caracterizados por pequenas manchas de coloração marrom, de aspecto seco e enrugado com bordo definido sobre a superfície do fruto verde. As lesões aumentaram de tamanho e, até o 4º dia após a inoculação, foi possível observar o progresso da seca dos frutos com abundante esporulação alaranjada (Figura 2B). Todos os 20 isolados monospóricos foram patogênicos em frutos verdes de açaí. Estes foram reisolados e preservados.



Figura 2B - Teste de Patogenicidade com ferimentos. (A) Testemunha; (B) Sintomas reproduzidos em frutos verdes inoculados com suspensão 10^6 conídios.mL⁻¹; Progresso da seca em frutos verdes (C) e maduros (D) de açaí coletados no campo.

A maioria dos isolados testados apresentaram no mínimo dois formatos de conídios, apenas os isolados 8 e 15, apresentaram 100% de conídios do tipo 1 com formato predominantemente reto, oblongo com ápices arredondados, unicelulares e hialinos com comprimento variando entre 5,0-10 μ m; 3,0-6,0 μ m e largura 1,5-3,0; 1,5-2,0 μ m, respectivamente (Figura 3B). Estas características assemelham-se a conídios de *C. gloeosporioides*, que são geralmente formados em massas de coloração salmão, reto e cilíndrico, com ápice obtuso e base, às vezes, truncada, medindo 12-17 μ m x 3,5-6 μ m citado por Sutton (1992) e Tozze Jr. et al., (2006).

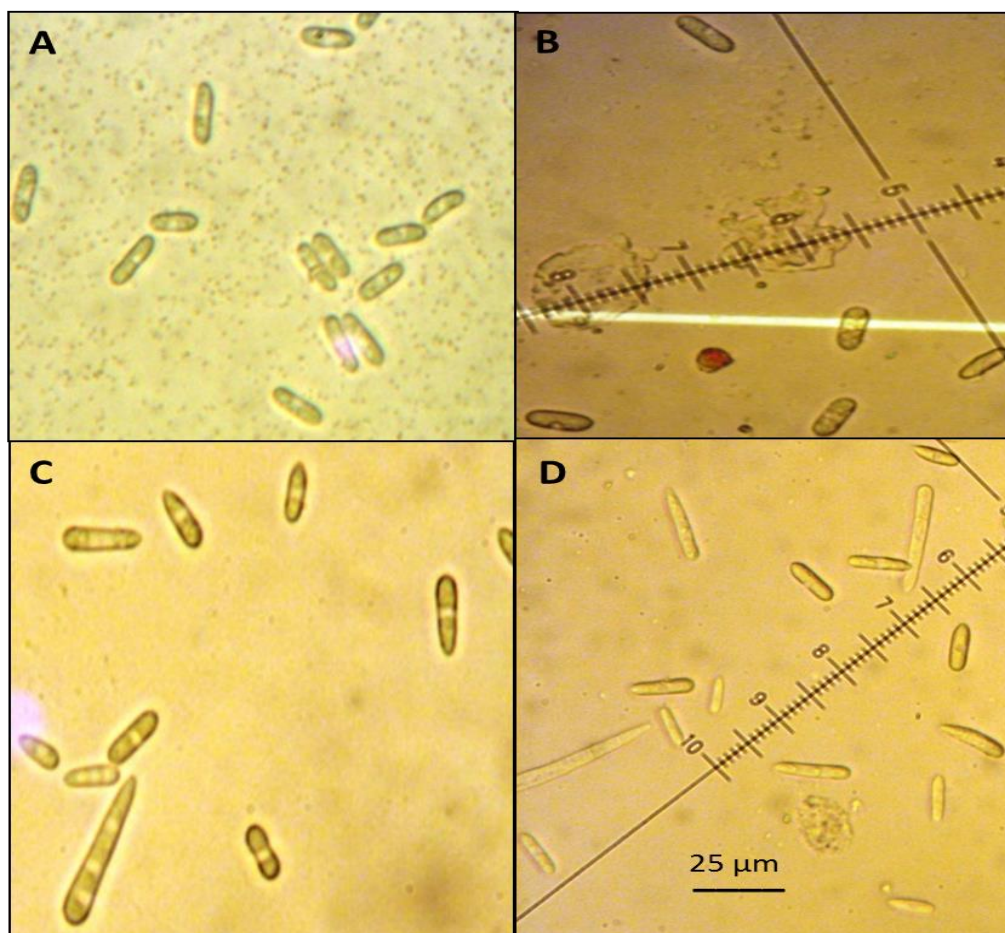


Figura 3B- Tipos de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum*. Conídios tipo 1: isolado 8 (A), isolado 15 (B). Conídios tipos 2 e 3: isolado 2 (C) e isolado 11 (D).

De acordo com Du et al. (2005), *C. fragariae*, distingue-se de *C. gloeosporioides* no formato de conídios, onde é descrito como estritamente obovado cônico para a base, enquanto *C. gloeosporioides* tem conídios retos, sem contorno.

Os isolados 1 e 3, 10 e 13 apresentaram os três tipos de formatos, pertencendo a uma população de biótipos com uma variabilidade de conídios, dificultando a definição em nível de espécie (Tabela 1B). Isto pode ocorrer devido à plasticidade fenotípica apresentada por este gênero, que revela ampla adaptação a diferentes meios de cultivo, levando, frequentemente, a resultados conflitantes e difíceis de interpretar (MENEZES, 2006).

Tabela 1B- Características morfológicas de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de açazeiro no Estado do Pará. [Castanhal, 2017].

Isolado	Comprimento mínimo - máximo (µm) (média)	Largura mínimo - máximo (µm) (média)	Formato ¹		
			Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
1CIN2.1	6,0-9,0 (7,29)	2,0-3,0 (2,33)	64	20	16
2CIN8	7-17 (11,92)	1,5-3,5 (2,45)	44	56	0
3CIN10	6-11 (7,42)	2,0-3,0 (2,85)	84	6	10
4CCT	4-12 (6,56)	2,0-3,0 (2,27)	76	24	0
5CIM3.1	6-11 (7,93)	2,0-3,0 (2,76)	52	48	0
6CIM5	4,0-9,0 (6,52)	2,0-3,0 (2,45)	56	44	0
7CIF1	4,5-8,0 (6,71)	2,0-3,0 (2,63)	62	38	0
8CSB1.1	5,0-10,0 (6,42)	1,5-3,0 (2,34)	100	0	0
9CFS2	3,0-7,5 (5,48)	1,8-3,0 (2,33)	82	18	0
10CTC6	4,0-8,9 (6,7)	1,5-3,0 (2,0)	48	48	4
11CIM9	3,0-9,0 (5,2)	1,9-2,5 (2,0)	52	48	0
12CIN1	3,5-8,0 (4,4)	2,0 (2,0)	44	56	0
13CAC3	4,0-8,5 (6,7)	2,0-3,0 (2,0)	90	8	2
14CAB1	5,0-7,0 (6,1)	2,0-2,5 (2,1)	84	16	0
15CAB2	3,0-6,0 (4,1)	1,5-2,0 (1,9)	100	0	0
16CAB3	3,0-9,0 (5,0)	1,8-2,0 (2,0)	74	26	0
17CIM7	4,0-15,0 (6,6)	2,0-3,0 (2,2)	62	38	0
18CIM8	5,0-9,0 (6,9)	2,0-3,0 (2,9)	96	4	0
19CIM15	4,0-15,0 (7,3)	2,0-3,0 (2,2)	80	20	0
20CIN3	4,5-10,0 (6,2)	2,0-2,8 (2,2)	88	8	0

¹Formato: (1) reto, oblongo, com ápices arredondados; (2) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (3) reto, com constricção

Há muitas evidências de que caracteres taxonômicos convencionais, tais como formato e tamanho de conídios, aparência cultural, aspectos fisiológicos de crescimento e a patogenicidade em hospedeiros específicos, variam em função das condições ambientais (WALLER, et al., 1992; SUTTON, 1992). Fato este recorrente pela procedência dos isolados de origem de açazais nativos de área de várzea e implantados em terra firme em sistema de cultivo solteiro.

Andrade et al. (2007), trabalhando com aspectos morfológicos com isolados de antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.), notaram a sobreposição de espécies durante a caracterização morfocultural. Segundo Cai et al. (2009), os critérios morfológicos são imprecisos para a definição de quais espécies estão presentes num dado hospedeiro, pois há evidências de formas intermediárias entre as espécies para intercalar a detecção das relações inter e intra-específicas.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. apresentaram-se bastante heterogêneos quanto à coloração e aspecto das colônias (Figura 4). Na caracterização cultural dos isolados, predominou no anverso a coloração branca e branca acinzentada, branca a castanho; com reverso branco, castanho escuro e esverdeado, respectivamente; e apenas o isolado 5 com reverso salmão.

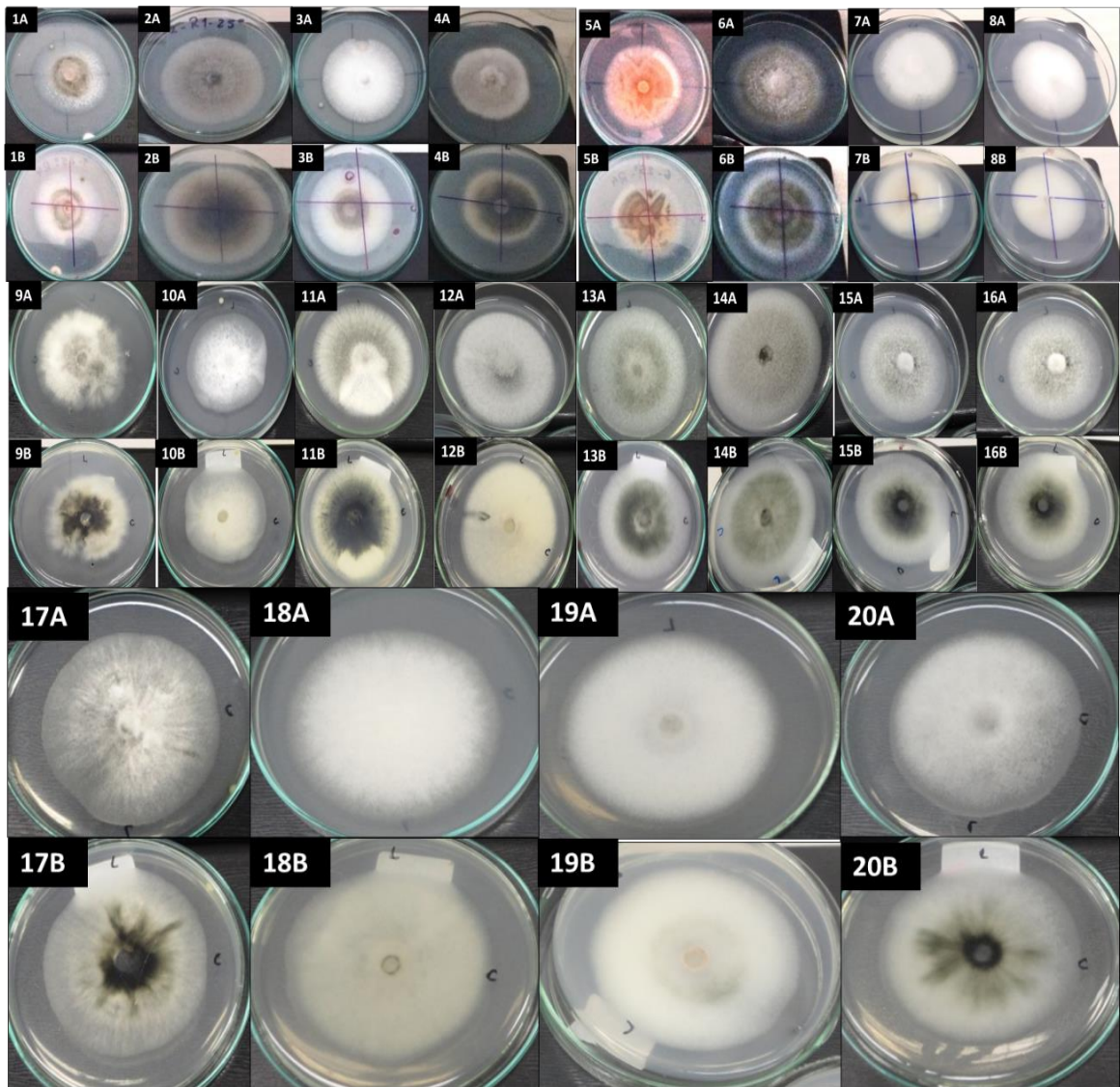


Figura 4- Aspecto cultural de 20 isolados de *Colletotrichum* spp. cultivado a 25 °C em meio BDA durante 7 dias. Face superior da colônia (A); Reverso da colônia (B). Isolados Inhangapi 1A/1B, 2A/B, 3A/3B, 12A/12B e 20A/20B; Isolados Castanhal 4A/4B, 7A/7B, 9A/9B; Isolados Igarapé-Miri 5A/5B, 6A/6B, 11A/11B, 17A/17B, 18A/18B 19A/19B; Isolado 8A/8B Santa Bárbara; Isolado Tucuruí 10A/10B; Isolado Acará 13A/13B; Isolado Abaetetuba 14A/14B, 15A/15B, 16A/16B.

Estas características culturais com os resultados apresentados por Pardo de la Hoz et al. (2016), os quais caracterizaram morfológicamente 91 isolados de *Colletotrichum* spp. de manga e tomate em áreas de produção na Colômbia, estes pesquisadores constataram variabilidade entre os isolados de *C. gloeosporioides*, com colônias exibindo as tonalidades branco, preto ou cores cinzentas e os isolados definidos como *C. acutatum*, apresentaram micélio branco a rosado com reverso rosa/salmão. Baseando-se estritamente nesta caracterização cultural, o isolado 5 destacou-se com coloração salmão no reverso da placa, quando relacionado aos demais isolados.

Neste estudo, os isolados que apresentaram massa conidial de coloração alaranjada, corroboraram com os dados obtidos por Serra, Coelho e Menezes (2008), ao estudarem isolados monospóricos e multispóricos de *C. gloeosporioides* de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e de mangueira de diferentes procedências verificaram heterogeneidade no crescimento micelial, bem como colônias de coloração alaranjada, com abundante produção de massa de conídios.

Silva-Rojas e Ávila-Quezada (2011), ao estabelecer posições taxonômicas para 31 isolados de *Colletotrichum* que causam antracnose no abacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass no México definiram colônias do grupo *C. acutatum* como aquelas que apresentaram massas rosadas de conídios sobre um micélio pálido cinzento/branco, enquanto que o micélio de *C. gloeosporioides* era verde-oliva a branco e massas de conídios rosa a laranja. Aparência similar foi constatada para os isolados 17 e 20 na face reversa das colônias com micélio esverdeado.

A presença de massa conidial alaranjada na maioria dos isolados estudados encontrava-se envolvida por uma matriz gelatinosa. Esta matriz gelatinosa, segundo Menezes (2006) é constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água e, provavelmente protege os conídios da dissecação, aumentando a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro.

Houve efeito significativo da interação entre isolados e temperaturas avaliados, ou seja, não pôde ser definida uma temperatura ótima que favoreça o crescimento de todos isolados (Tabela 2B). Observou-se grande variabilidade entre isolados, independente do município de origem.

Tabela 2B- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e características culturais de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de açaizeiro no Estado do Pará.

Isolado	¹ IVCM (mmdia ⁻¹)					Regressão			Coloração da Colônia	⁴ Massa Conidial
	20°	25°	30°	35°	40°	R ² (%)	² T °C <IVCM	³ T °C >IVCM	Superior/Inferior	
1-CIN2.1	16,75 b	18,75 c	18,0 d	9,75 a	5,0 a	97,55	44,17	24,88	Branca a castanho/ Branca a castanho	+
2-CIN8	18,0 a	22,0 b	20,0 c	6,50 b	5,25 a	95,08	38,77	24,49	Cinza claro/ Castanho	-
3-CIN10	15,0 b	21,25 b	21,75 c	5,25 b	4,75 a	89,83	32,61	24,99	Branca/Branco a castanho	-
4-CCT	16,0 b	18,0c	26,25 b	10,0 a	5,0 a	75,85	41,71	26,29	Branca acinzentada/ Branca a castanho	-
5-CIM3.1	17,0 b	20,25c	18,0d	5,0 b	5,0 a	94,58	38,77	24,05	Branca a salmão/ salmão	+
6-CIM5	16,75 b	22,75 b	29,5 a	10,25 a	5,0 a	83,20	44,74	25,98	Branca acinzentada/ Branca a castanho escuro	+
7-CIF1	18,50 a	21,25 b	24,75 b	11,0 a	5,0 a	89,7	39,11	24,71	Branca/ Branca	+
8-CSB1.1	19,25a	20,50 c	24, 75 b	11,75 a	5,0 a	88,89	61,88	26	Branca/ Branca	+
9-CFS2	15,75b	23,0 b	23,50 b	0,25 c	0,0b	89,41	39,11	24,71	Branca acinzentada/ castanho escuro	+
10-CTC6	18,50 a	23,5 a	26,75 b	3,25 b	0,0 b	87,32	40,46	25,00	Branca/ Branca	-
11-CIM9	20,25 a	26,75 a	26,0 b	0,0 c	0,0b	90,69	38,64	24,54	Branca acinzentada/ castanho escuro	+
12-CIN1	20,25 a	27,25 a	28,5 a	7,5 a	0,0 b	93,78	42,67	25,10	Branca/Branca	+
13-CAC3	19,75 a	25,75 a	26,75 b	6,0 b	0,0 b	93,02	41,36	25,08	Cinza claro/ castanho escuro	+
14-CAB1	20,0 a	26,25 a	28,75 a	3,25 b	0,0 b	88,70	40,48	24,81	Branca acinzentada/ Branca acinzentada	+
15-CAB2	19,0a	25,5 a	31,0 a	4,0 b	0,0 b	85,07	41,14	25,22	Branca acinzentada/	-

									castanho	
16-CAB3	19,0a	24,0 a	26,5 b	3,25 b	0,0 b	88,50	40,53	24,83	Branca/ castanho esverdeado	+
17-CIM7	19,25 a	25,5 a	25,25 b	0,0 c	0,0 b	90,05	38,68	24,59	Branca acinzentada/ castanho esverdeado	+
18-CIM8	19,0 a	26,5 a	26,75 b	4,0 b	0,0 b	92,53	40,30	24,86	Branca/Branca	+
19-CIM15	21,50 a	25,75 a	27,5 a	5,5 b	0,0 b	91,34	38,43	27,89	Branca/Branca	+
20-CIN3	21,75 a	26,5 a	28,25 a	3,25 b	0,0 b	89,53	40,29	24,64	Branca acinzentada/ castanho esverdeado	-

*Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade; ²Temperatura (°C) para o menor IVCM; ³Temperatura (°C) para o maior IVCM; ⁴presente (+), ausente (-)

Ajustaram-se modelos polinomiais de terceiro grau para todos os isolados, excetuando-se o isolado 8 que não se ajustou ao modelo polinomial de terceiro grau, apresentando valor de temperaturas máximas fora do padrão testado. As temperaturas ótimas, ou seja, aquelas que permitiriam o maior IVCM para os isolados procedentes dos diversos municípios situaram-se entre 24,05 °C e 27,89 °C, com R²= 0,9458 e R²= 0,9134, representado pelos isolados 5 e 19, respectivamente (Figura 5).

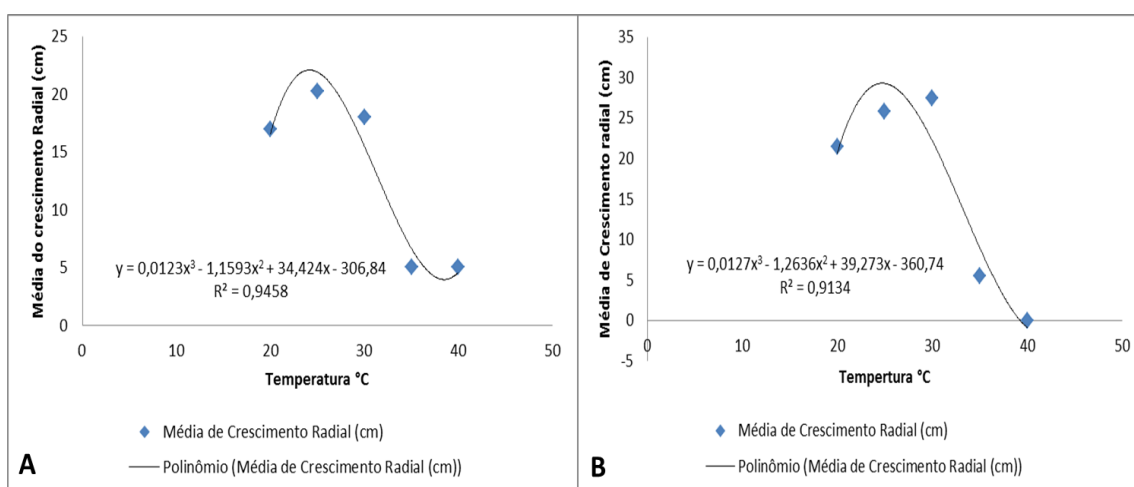


Figura 5- Regressão da média de crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. sob diferentes temperaturas. Isolado 5 (A) e Isolado 19 (B).

A temperatura pode influenciar tanto o crescimento micelial, como a esporulação, a germinação de conídios e a coloração das colônias. Podendo ser utilizada como parâmetro morfológico para diferenciação de espécies de *Colletotrichum* (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998; LOPEZ, 2001; MAIA, et al., 2011). Essas informações são essenciais e podem contribuir para definir ações de controle

Essas informações corroboram com Poltronieri, Azevedo e Silva (2013), estudando o efeito da temperatura por meio da regressão, atestaram que no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, isolados de juçara (*E. edulis* Mart.), a temperatura de 24,6 °C foi ideal para o desenvolvimento micelial dos isolados. Para isolados de diversas frutíferas, Tozze Jr. et al. (2015) constataram que a temperatura de 25 °C determinou o maior desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum*, enquanto que isolados de frutos de cafeeiro (*Coffea* sp. L.) apresentaram faixa de temperatura ótima entre 22 e 28 °C para o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Contribuindo assim para indicar que os isolados fúngicos de *Colletotrichum* obtidos de açaí apresentaram uma faixa de temperatura semelhante aos isolados de *Colletotrichum* de outras frutíferas.

Foi observado também que há isolados de mesma procedência, porém com comportamentos de crescimento afetado com o aumento de temperatura, a exemplo dos isolados 17 e 18, apresentaram temperatura ótima de crescimento entre 24,59 e 24,86 °C, enquanto o isolado 19 apresentou 27,89 °C. Os isolados 1, 2, 3, 12 e 20 provenientes de Inhangapi apresentaram temperaturas ótimas de crescimento na faixa entre 24,49 e 25,10 °C. Similarmente, os isolados 14, 15 e 16 destacaram seu melhor índice de crescimento entre 24,81 e 25,22 °C, enquanto que os isolados 9, 22 e 29 de diferentes municípios, apresentaram máximas entre 25 e 25,82 °C.

Cerca de 50% dos isolados de *Colletotrichum* dos frutos de açaí, apresentaram um comportamento de crescimento micelial em torno de 24 °C, favorecendo a doença, portanto, pode contribuir para agravar o efeito danoso sobre o hospedeiro suscetível durante o período da entressafra, quando há uma mudança no clima dos municípios estudados.

Nos locais de ocorrência natural e de cultivo de açaizeiros, na Amazônia brasileira, a espécie pode ser encontrada em áreas submetidas aos tipos climáticos Afi, Ami e Awl, (classificação de Köppen) e caracterizam-se como clima quente e úmido, com pequenas amplitudes térmicas, geralmente, com temperaturas médias e médias das mínimas e das máximas anuais em torno de 26, 22 e 31,5 °C, respectivamente, e com umidade relativa do ar variando entre 71 e 91% (CALZAVARA 1972, NASCIMENTO; HOMMA, 1984).

O clima dos municípios estudados situam-se nos tipos Af_i ou Am_i (MARTORANO et al., 1993), associando ao intervalo das temperaturas para o melhor IVCM dos isolados estudados. Isto contribui para o bom desenvolvimento do patógeno, compreendendo a faixa de temperatura dos municípios em questão.

A temperatura pode influenciar em várias fases no ciclo de vida do patógeno e pode ser determinante no período de infecção de frutos de açaí. Soares, Lourenço e Amorim (2008), estudando o potencial de germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, verificaram germinação superior a 90% sob temperatura de 25°C, após 24 horas de molhamento, enquanto que a germinação de *C. acutatum* foi afetada e não ultrapassou 50%, nas mesmas condições ambientais.

O menor desenvolvimento das colônias dos isolados estudados ocorreu quando foram incubados a 35 e 40 °C, mesmo dentre aqueles isolados com maior velocidade de crescimento. Diversos patógenos podem crescer numa ampla faixa de temperatura, presentes nas regiões tropicais e subtropicais; entretanto, temperaturas muito altas podem provocar o dessecação de propágulos, presente na fonte de inóculo ou temperaturas amenas podem levar a paralisação das atividades do patógeno e/ou mesmo sua morte (BEDENDO; AMORIM, 2011).

Este é o primeiro estudo de caracterização morfocultural e fisiológica com isolados de *Colletotrichum* associados à seca dos frutos de açaí no Brasil.

4-CONCLUSÃO

Os isolados avaliados apresentaram variabilidade nas características morfológicas e culturais, compatíveis com o complexo *Colletotrichum gloeosporioides*. As temperaturas que causaram um maior índice de velocidade de crescimento micelial nos 20 isolados de *Colletotrichum* estão entre 24,05 e 27,89 °C.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 021-031, 2007.
- BATISTA, T. F. C. et al. Ocorrência de fungos e nematóides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de coari (AM). **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 47, p. 163-171, 2007.
- BEDENDO, I. P.; AMORIM, L. Ambiente e Doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, M. A. J.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. Agronômica Ceres, Piracicaba, 4 ed., p. 143, 2011.
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Kunming, n. 39, p. 183-204, 2009.
- CARVALHO, E. de A. et al. Seca dos frutos do açaizeiro em Abaetetuba, Belém e Igarapé-Miri. **VII Seminário de Iniciação Científica, Tecnológica e Inovação**. Conceição do Araguaia, PA. Anais N° 62855/ISBN, p. 50, 2015.
- FREEMAN, S.; KATAN, T.; SABHI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 596-605, 1998.
- DU, M. et al. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 3, p. 641–658, 2005.
- HOMMA, A. K. O. et al. AÇAÍ: Novos desafios e tendências. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, Belém, v. 1, n. 2, p. 7-23, 2006.
- KAHN, F. Palms as key swamp forest resources in Amazonia. **Forest Ecology and Management**, Arizona, v. 38, p.133–142, 1991.
- LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 291-338, 2001.
- MAIA, F. G. M. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.27, n.2, p.205-210, 2011.

- MARTORANO, L. G. et al. **Estudos climáticos do Estado do Pará, classificação climática (Koppen) e deficiência hídrica (Thornthwaite, Mather)**. SUDAM-Embrapa-SNLCS, 53p. 1993.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.
- MONTRI P.; TAYLOR P. W. J.; MONGKOLPORN, O. Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose, in Thailand. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p.17-20, 2009.
- NASCIMENTO, C.; HOMMA, A. Amazônia: meio ambiente e tecnologia agrícola. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 282 p. Série Documentos, 27, 1984.
- NOGUEIRA, O. L. **Regeneração, manejo e exploração de açazais nativos de várzea do estuário amazônico**. 1997. 149f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal do Pará, Belém, PA.
- NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; MULLER, A. A. Açai - Sistemas de Produção. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, n.4, 137 p. 2005.
- OLIVEIRA, J.A. Efeito do fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- OLIVEIRA, M. S. P. de. Biologia floral do açazeiro nas condições de Belém, PA. Embrapa. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Belém, n. 8, 19p. mar. 2002.
- OLIVEIRA, M. S. P.; MOCHIUTTI, S.; NETO, J. T. F. Domesticação e melhoramento do açazeiro. In: **Domesticação e melhoramento de espécies amazônicas**. Ed. BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. Viçosa. cap.11, p. 209-211. 2009.
- POLTRONIERI, T.P.S.; AZEVEDO, L.A.S.; SILVA, D.E.M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.4, p.281-285, 2013.
- POLTRONIERI, T. P. DE S.; AZEVEDO, L. A. S. DE; VERZIGNASSI, J. R.; SILVA, D. E. M. DA. *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de juçara (*Euterpe edulis*) na Mata Atlântica, em Paraty-RJ e Ubatuba-SP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 88-89, 2014.
- SANTOS, T. P. F. et al. *Colletotrichum* spp. associado a frutos de açazeiro em Tomé Açú no

- Estado do Pará. 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia – Manaus. **Anais...**v. 37 (Suplemento), p.737, agosto 2012.
- SANDERS, G. M.; KORSTEN, L. A comparative morphological study of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Canadian Journal of Botany**, v. 8, p. 877–885. 2003.
- SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispórico de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.2, p.113-120, 2008.
- SILVA-ROJAS, H. V.; A´VILA-QUEZADA, G. D. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. **Plant Pathology**, Bari, v. 60, p. 899–908, 2011.
- SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 265-272, 2008.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A.; Jeger, M.J. (eds.) **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB International, Wallingford. 1992. p. 1-26.
- THAN P. P. et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, Bari, v.57, p. 562-572, 2008.
- TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, B. A. M.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.
- TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.41, n.4, p.270-280, 2015.
- WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: Bailey, J. A.; JEGER, M. J. (Eds). **Colletotrichum: biology pathology and control**. CAB International, Wallinford, U.K.1992, p.167-185.