



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

JORGE ALVES DA SILVA NETO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE MANGUEIRA E A ATIVIDADE INIBITÓRIA  
DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE ESTE PATÓGENO**

MOSSORÓ

2020

JORGE ALVES DA SILVA NETO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE MANGUEIRA E A ATIVIDADE INIBITÓRIA  
DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE ESTE PATÓGENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda

Coorientador: Profa. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio

MOSSORÓ

2020

© 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.

S586c Silva Neto, Jorge Alves da.  
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E  
PATOGENICA DE ISOLADOS DE Colletotrichum spp. DE  
MANGUEIRA E A ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS SOBRE ESTE PATÓGENO / Jorge Alves da  
Silva Neto. - 2020.  
58 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.  
Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz  
Ambrósio.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia, 2020.

1. Fitopatógenos. 2. Diversidade genética. 3.  
Patogenicidade. I. Holanda, Ioná Santos Araújo,  
orient. II. Ambrósio, Márcia Michelle de Queiroz,  
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.

JORGE ALVES DA SILVA NETO

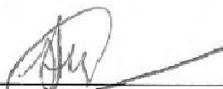
**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICA DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE MANGUEIRA E A ATIVIDADE INIBITÓRIA  
DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE ESTE PATÓGENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

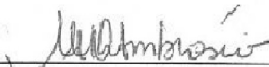
Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Defendida em: 11 / 03 / 2020.

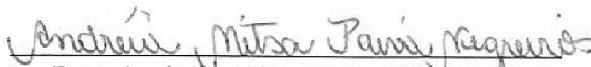
**BANCA EXAMINADORA**



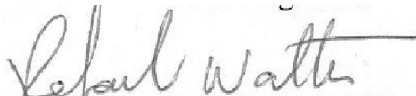
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Iona Santos Araújo Holanda  
Presidente



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Marcia Michelle de Queiros Ambrósio  
Membro Interno



\_\_\_\_\_  
Dra. Andréia Mitsa Paiva Negreiros  
Membro Externo



\_\_\_\_\_  
Dr. Rafael Walter  
Membro Externo

*À minha família, pais, irmãos e sobrinho,  
que me ajudaram e acreditaram que poderia  
crescer e me tornar tudo aquilo o que eu  
imaginasse. Sem eles nada disso seria  
possível.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de acordar todos os dias, poder sempre vencer as adversidades e pelo cumprimento de mais uma etapa importante em minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, pela oportunidade da realização do mestrado e o acesso a ensino de qualidade

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ioná Santos Araújo Holanda, pelos anos de trabalho sempre dedicada em ajudar, possibilitando meu crescimento profissional e pessoal, sendo de fundamental importância para minha formação.

À minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcia Michele de Queiroz Ambrósio, por todos os ensinamentos e disposição permanente em ajudar no trabalho.

Às técnicas Louise e Juliana, pela grande ajuda que me proporcionaram para que conseguisse a finalização desse trabalho.

Aos produtores de manga do Rio Grande do Norte, por fornecerem as amostras para a realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório da Biotecnologia Vegetal da UFERSA, Rhut, Rose, Belicia, Gilsivam, Lara, Shamyra, Talisson, Vitor, Atarissis, Pedro, Suzana, Ana, Isabelle, Fernanda, Abner, Milena e Tatiane, pelo apoio, dedicação e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos da graduação, Barbara, Talison, Regis, Rose e Rhut, por sempre estarem presentes ao longo dessa jornada.

À minha família, meus pais, Josenira e Valdemberg, irmãos – Viviane, Josemberg, Vivian, Valdemberg e Juliany – e sobrinho, Mikael, por me proporcionarem o suporte necessário para sempre conseguir lutar e vencer qualquer desafio.

E a todos os que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização desse trabalho.

## RESUMO

A mangueira (*Mangifera indica* L.) se destaca como uma das fruteiras tropicais de maior importância no mundo. A antracnose, causada pelos fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum*, é uma doença relacionada principalmente a períodos de pós-colheita, afetando diretamente esta cultura. Diante disso, esse estudo objetivou a caracterização morfológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. de mangueiras e a atividade inibitória de óleos essenciais sobre esse patógeno. Discos fúngicos de 5 mm foram dispostos em placas de Petri para avaliação da velocidade de crescimento e coloração das colônias. Foram realizados microcultivos para análises dos formatos e dimensões de conídios e apressórios. Para as análises moleculares, os isolados foram previamente identificados com primers gene específico de gênero e espécie para *C. gloeosporioides*. Nove iniciadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) e 12 iniciadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foram utilizados para identificar a diversidade genética dos 28 isolados. Na avaliação morfológica, a partir das estruturas encontradas, coloração das colônias, conídios, apressórios e velocidade de crescimento, 28 isolados foram identificados como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*, sendo posteriormente confirmados com os primers genes específicos. Os iniciadores RAPD e ISSR foram considerados satisfatórios em identificar a diversidade genética. A combinação dos iniciadores gerou variação de similaridade de 0,23 (entre os isolados 12 e 21) a 0,71 (entre os isolados 2 e 4), identificando, com isso, alto nível de variabilidade entre os fungos, onde a dissimilaridade foi superior a 75%. O dendograma gerado revelou a formação de oito grupos principais. Não foram observados agrupamentos genéticos correlacionados com o local da coleta, mostrando, assim, a grande diversidade genética mesmo entre indivíduos de mesma localidade. A patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides* foi avaliada em frutas de manga Tommy Atkins mediante introdução de discos miceliais de 7 mm. Para o teste *in vitro*, três isolados mais patogênicos foram utilizados para a avaliação de inibição com os óleos de gengibre (*Zingiber officinale*), sangue de dragão (*Croton Lenchleri*) e a combinação de ambos nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8%. Os mesmos tratamentos foram utilizados para o teste *in vivo*. Após a introdução de discos miceliais em frutos de manga, as diferentes concentrações de óleos foram espalhadas na superfície inoculada e mantidas por sete dias após a avaliação. Com base no teste de patogenicidade, a maioria dos isolados apresentou baixa virulência na cultivar Tommy Atkins. Entretanto, alguns isolados se mostraram altamente patogênicos a essa cultivar. Nos testes *in vitro*, houve diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que a maior inibição média foi de 28,5%, encontrada na combinação de 0,3% de gengibre mais 0,3% de sangue de dragão. Para os testes *in vivo*, todos os tratamentos se mostraram altamente eficazes em manga Tommy, apresentando 100% de inibição do crescimento fúngico no fruto. Os dados gerados neste trabalho permitem concluir que há variação não apenas genética, como também no nível de patogenicidade entre os isolados de *C. gloeosporioides* coletados em plantios comerciais de manga e que nem sempre medidas únicas de controle podem ser suficientes ou 100% eficazes no combate a essa enfermidade. O efeito de inibição dos óleos de gengibre e sangue de dragão nos isolados avaliados revela que este pode ser um eficaz método de controle da antracnose.

**Palavras-chave:** Fitopatógenos. Diversidade genética. Patogenicidade.

## ABSTRACT

The mango tree (*Mangifera indica* L.) stands out as one of the most important tropical fruit trees in the world. Anthracnose, caused by phytopathogenic fungi of the genus *Colletotrichum*, is a disease mainly related to post-harvest periods, directly affecting this crop. Therefore, this study aimed at the morphological, molecular and pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. of hoses and the inhibitory activity of essential oils on this pathogen. Fungal discs of 5 mm were placed in Petri dishes to evaluate the growth speed and colony color. Microcultures were carried out to analyze the shapes and dimensions of conidia and appressoria. For molecular analysis, the isolates were previously identified with primers specific gene of gender and species for *C. gloeosporioides*. Nine ISSR markers (Inter Simple Sequence Repeats) and 12 RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) were used to identify the genetic diversity of the 28 isolates. In the morphological evaluation, from the found structures, colony color, conidia, appressoria and growth rate, 28 isolates were identified belonging to the species *C. gloeosporioides* and later confirmed with specific primers genes. The RAPD and ISSR markers were considered satisfactory in detecting genetic diversity. The combination of the markers generated a variation of similarity from 0.23 (between isolates 12 and 21) to 0.71 (between isolates 2 and 4), thereby identifying high level of variability among fungi, where the dissimilarity was higher to 75%. The generated dendrogram revealed the formation of 8 main groups. There were no genetic clusters correlated with the collection site, thus demonstrating the great genetic diversity even among individuals from the same location. The pathogenicity of *C. gloeosporioides* isolates was evaluated in Tommy Atkins mango fruits by introducing 7 mm mycelial discs. For the *in vitro* test, three more pathogenic isolates were used to assess inhibition with the oils of ginger (*Zingiber officinale*), dragon blood (*Croton Lenchleri*) and the combination of both at concentrations of 0.2; 0.4; 0.6 and 0.8%. The same treatments were used for the *in vivo* test. After the introduction of mycelial discs in mango fruits, the different concentrations of oils were spread on the inoculated surface and maintained during seven days after the evaluation. Based on the pathogenicity test, most isolates showed low virulence in the cultivar Tommy Atkins. However, some isolates have been shown to be highly pathogenic to this cultivar. In *in vitro* tests, there were significant differences between treatments, with the highest mean inhibition being 28.5% found in the combination of 0.3% ginger plus 0.3% dragon blood. For *in vivo* tests, all treatments were highly effective in Tommy mango, with 100% inhibition of fungal growth in the fruit. The data generated in this work allow us to conclude that there is variation not only genetic, but also in the level of pathogenicity among isolates of *C. gloeosporioides* collected in commercial mango plantations and that not always single control measures can be sufficient or 100% effective in the fight this disease. The inhibiting effect of ginger oil and dragon blood on the evaluated isolates reveals that these can be an effective method of controlling anthracnose.

**Keywords:** Phytopathogens. Genetical diversity. Pathogenicity.



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1	- Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de mangueiras do Rio Grande do Norte, Brasil.....	23
Tabela 2	- Dados dos iniciadores ISSR e RAPD utilizados.....	27
Tabela 3	- Taxas de crescimento, caracterização de conídios, apressórios e presença de setas dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> .....	31
Tabela 4	Caracterização dos dados obtidos com os iniciadores RAPD e ISSR quanto ao total de locos (TL), locos monomórficos (LM), locos polimórficos (LP), porcentagem de polimorfismo (%P) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).....	32
Tabela 5	- Médias de lesões em mangas, causadas por isolados de <i>C. gloeosporioides</i> .....	35

### CAPÍTULO III

Tabela 1	- Efeitos dos óleos de gengibre e sangue de dragão no desenvolvimento <i>in vitro</i> de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> .....	49
Tabela 2	- Efeito inibitório <i>in vivo</i> de óleo essencial de gengibre, sangue de dragão e a combinação de ambos no desenvolvimento da antracnose causada por três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> , sete dias após a inoculação em frutos de manga da variedade Tommy.....	51

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1 - Produto de amplificação por PCR com o par de iniciadores CgInt/ITS4 para detecção de *Colletotrichum gloeosporioides*..... 29
- Figura 2 - Os seis morfotipos encontrados de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de mangueira, **a)** lado superior da colônia e **b)** verso da colônia..... 30
- Figura 3 - Estruturas encontradas nos isolados estudados: Setas (a) Conídios: retos com extremidade arredondada (b) retos e afilados em uma das extremidades (c) e retos com constrição (d) Apressórios: arredondados e lisos (e) irregulares e fracamente lobulado (f) irregulares e lobulados (g)..... 30
- Figura 4 - Produtos da amplificação de PCR com o iniciador RAPD 18 dos 28 isolados de *C. gloeosporioides* submetidos a eletroforese em gel de agarose. 'M' nas extremidades do gel representa o marcador de peso molecular de 100 pb. As canaletas de 1 a 28 representam cada um dos 28 isolados..... 32
- Figura 5 - Dendograma gerados pelo método UPGMA a partir da combinação dos iniciadores ISSR+RAPD..... 34
- Figura 6 - Patogenicidade de *C. gloeosporioides* em mangas da variedade Tommy Atkins, sete dias após a inoculação. Lesões causadas por isolados mais virulentos; isolados 24 (a) e 21 (b) e ampliação de suas respectivas lesões (e; f) e dois não patogênicos, isolados 5 (c) e 8 (d) e seus respectivos locais de inoculação (g e h)..... 34

### CAPÍTULO III

- Figura 1 - Teste *in vitro* utilizando o isolado 20 de *C. gloeosporioides* nos tratamentos com os óleos essenciais. Controle com inoculo fúngico (a), Tratamento com fungicida (b), óleo essencial de gengibre nas concentrações 0,2% (c), 0,4% (d), 0,6% (e) e 0,8% (f), óleo essencial de sangue de dragão nas concentrações 0,2% (g), 0,4% (h), 0,6% (i) e 0,8% (j) e a combinação dos dois óleos 0,1% + 0,1% (k), 0,2% + 0,2% (l), 0,3% + 0,3% (m) e 0,4% + 0,4% (n)..... 50

Figura 2 - Lesões causadas pelo isolado 24 de *C. gloeosporioides* nos tratamentos com os óleos essenciais. Controle sem tratamento (a), Tratamento com fungicida (b), óleo essencial de gengibre nas concentrações 0,2% (c), 0,4% (d), 0,6% (e) e 0,8% (f), óleo essencial de sangue de dragão nas concentrações 0,2% (g), 0,4% (h), 0,6% (i) e 0,8% (j) e a combinação dos dois óleos 0,1% + 0,1% (k), 0,2% + 0,2% (l), 0,3% + 0,3% (m) e 0,4% + 0,4% (n)..... 51

## SUMARIO

	<b>CAPÍTULO I</b> .....	13
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
	<b>CAPÍTULO II</b> .....	21
	<b>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. OBTIDOS DE MANGUEIRA</b> .....	19
	<b>RESUMO</b> .....	19
	<b>ABSTRACT</b> .....	20
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>2.1</b>	<b>Coleta das amostras</b> .....	23
<b>2.2</b>	<b>Isolamento fúngico</b> .....	24
<b>2.3</b>	<b>Análises morfológicas</b> .....	24
<b>2.4</b>	<b>Extração de DNA</b> .....	25
<b>2.5</b>	<b>Identificação molecular</b> .....	25
<b>2.6</b>	<b>Diversidade genética</b> .....	26
<b>2.7</b>	<b>Teste de patogenicidade</b> .....	28
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	29
<b>3.1</b>	<b>Identificação molecular</b> .....	29
<b>3.2</b>	<b>Análises morfológicas</b> .....	29
<b>3.3</b>	<b>Diversidade genética</b> .....	32
<b>3.4</b>	<b>Avaliação de patogenicidade</b> .....	34
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>CAPÍTULO III</b> .....	44
	<b>ATIVIDADE in vitro E in vivo DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Zingiber officinale</i> E <i>Croton lechleri</i> CONTRA <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ISOLADOS DE MANGUEIRA</b> .....	44
	<b>RESUMO</b> .....	44
	<b>ABSTRACT</b> .....	45
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
<b>2.1</b>	<b>Isolados fúngicos</b> .....	47
<b>2.2</b>	<b>Teste de inibição com óleos essenciais</b> .....	47
<b>2.2.1</b>	<b>Obtenção dos óleos essenciais</b> .....	47
<b>2.2.2</b>	<b>Teste in vitro</b> .....	47
<b>2.2.3</b>	<b>Teste In vivo</b> .....	47

2.4	Análise estatística.....	48
3	RESULTADOS.....	49
3.1	Teste de inibição in vitro.....	49
3.2	Teste de inibição in vivo.....	50
4	DISCUSSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	55

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

A mangueira (*Mangifera indica* L.) se destaca por ser uma das mais importantes fruteiras tropicais do mundo (CHENG et al., 2019; SANTO et al., 2018). A produção de manga no Brasil se destaca devido principalmente às condições climáticas e às modernas tecnologias pós-colheita empregadas (SIQUEIRA, 2003). Esse fruto, no Brasil, é detentor de grande capacidade de crescimento para exportação, tendo como pontos principais o preço e sua qualidade. Esse crescimento se deve às técnicas utilizadas no florescimento e na pós-colheita (PEROSA, 2002).

A cultura da mangueira representa notória expressividade na economia mundial, tendo a Índia como o principal país produtor, seguido pela China, com quase quatro vezes menos produtividade (FAO, 2017). No Brasil, é a fruta de maior exportação, tendo em 2019 volume de exportação de aproximadamente 222 mil toneladas, movimentando mais de U\$\$ 220 milhões (AGROESTAT/MAPA, 2019). Houve crescimento da área cultivada de 21,8% ao ano, aumentando de 13,2 mil para 31,2 mil hectares entre 2014 e 2019 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORFI E FRUTI, 2019). A região Nordeste se destaca como a maior produtora, sendo o estado do Rio Grande do Norte o terceiro maior produtor da região (IBGE, 2018).

Um dos principais períodos de grande risco para os frutos de manga é o pós-colheita, quando grandes agentes patogênicos atacam a produção desse fruto, causando sérios riscos à sua posterior comercialização (DELGADO et al., 2011). Estas doenças pós-colheitas são principalmente causadas por fungos fitopatogênicos (TERAO et al., 2008). Dentre os principais fungos fitopatógenos identificados na pós-colheita e causadores de podridão em manga, destaca-se o *Colletotrichum gloeosporioides* (PERUMAL et al., 2016).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* presentes em frutos verdes permanecem na sua forma inativada sem qualquer enfermidade aparente. Com o amadurecimento é que ele passa a ocasionar lesões nos tecidos dos frutos hospedeiros (BAILEY; JEGER, 1992). Porém, essas lesões podem ser manifestadas principalmente em épocas de pós-colheita (FERNANDES et al., 2002). Há pesquisas que relatam que essa interação em frutos imaturos ocorre porque estes expressam resistência ao *Colletotrichum*, devido à liberação de substâncias antifúngicas, o que não ocorre em frutos maduros, podendo explicar, assim, a grande infestação desses fungos em ambientes pós-colheita (ARAUZ, 2000).

A antracnose, doença causada principalmente por espécies do gênero *Colletotrichum*,

vem se destacando pelo nível de prejuízo produzido e elevado custo de controle, o que encarece ainda mais a produção da manga, limitando, assim, a exportação desse fruto. Esta doença é de extrema importância, tendo ocorrência registrada em todas as áreas de produção de manga, dentre outras frutíferas. Sua infestação é comumente encontrada em frutíferas em todo o mundo, como na Oceania, Ásia, África, e nas américas, sendo endêmica de várias regiões de clima tropical úmido e subtropical das américas (FEICHTENBERG et al., 2005). No Brasil, há identificação dessa doença em todo o território (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015).

Nos frutos recém-formados, a infecção ocasiona a queda prematura. Porém, a severidade da patogenicidade é mais visível em frutos maduros ou em amadurecimento. Inicialmente, surgem manchas arredondadas, tornando-se posteriormente irregulares e de coloração marrom-escura ou negra. Ao passar do tempo, a lesão externa da casca pode romper e penetrar para o interior do fruto, formando posteriormente uma área necrótica devido à formação de massas esporóicas de coloração alaranjadas a rosáceas (FERRARI et al., 2011). Quando já dentro o fruto, causa o escurecimento da sua polpa (FERRARI et al., 2011). Em folhas novas, a sintomatologia da antracnose é identificada pela grande quantidade de manchas pequenas, arredondadas e irregulares com tamanhos variáveis e coloração marrom (RIBEIRO et al. (1997). Em ramos novos, há o secamento e escurecimento de ponta para a base, provocando o desfolhamento (CUNHA et al., 2000).

Alguns estudos de diversidade genética do *Colletotrichum* com base em análises morfológicas têm sido produzidos em diversas culturas acometidas por fungos deste gênero. Porém, estas pesquisas tornam-se limitadas devido ao alto grau de características morfológicas diferenciais destes fungos, tais como a coloração das culturas e o seu crescimento. Isso possibilita alto índice de erros de indução quando usadas somente essas características para análises. Com isso, torna-se necessário o uso de outras metodologias que possam identificar as espécies de forma mais eficaz (SUTTON, 1980).

Técnicas baseadas na análise de DNA, aliadas a dados morfológicos, têm sido de grande importância em estudos de identificação do *Colletotrichum* em diversas culturas estudadas, pois são métodos rápidos e precisos da identificação deste microrganismo. Estudos genéticos, utilizando principalmente regiões ITS e IGS do genoma, visam a complementar essas pesquisas para melhor identificação das espécies (BACIARELLEI-FALINI et al., 2006)

Os primeiros estudos do uso de técnicas genômicas para separação de espécies de *Colletotrichum* foram desenvolvidos em 1992 (SREENIVASAPRASAD et al., 1992). Estas pesquisas iniciais identificaram modificações na sequência da região do ITS1 do rDNA entre seis diferentes espécies desse fungo, além da identificação de polimorfismo nessa região em

isolados de *C. gloeosporioides* de hospedeiros variados. Portanto, o uso de iniciadores gene específicos é de grande importância para a identificação das espécies ou da identificação do complexo de espécies desse gênero (CAI et al., 2009). Além disso, a avaliação da diversidade genética pode ser uma importante ferramenta para diferenciação de isolados desse fitopatógeno (TEIXEIRA et al., 2004).

Avaliar diversidade genética significa estudar as variações genéticas entre populações, entre grupos ou entre indivíduos de um mesmo grupo. Dentre essas avaliações, podem ser destacadas as morfológicas, bioquímicas, citológicas e genéticas. As genéticas permitem uma diferenciação mais precisa dos genótipos na medida em que se baseia no polimorfismo existente no DNA dos indivíduos (PEREIRA et al., 2009). Esse polimorfismo pode ser avaliado por várias técnicas, como o uso de iniciadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Estudos da interação do patógeno com seu hospedeiro auxiliam na compreensão das características da doença, além de avaliarem possíveis variações de virulência entre patógenos. Portanto, a rápida caracterização e o controle biológico são cruciais para o controle das doenças.

Para o manejo e controle da antracnose em frutos de manga, vários são os agroquímicos utilizados (DEGUINE et al., 2018; FENG et al., 2019), responsáveis por poluições nos solos e rios, causando altos prejuízos em curto, médio e longo prazo. Syed et al. (2014) identificaram grandes resíduos de agrotóxicos em frutos de manga exportados do Paquistão.

Com base nisso, o uso de substâncias vegetais tem despertado grande interesse investigativo para diminuição da deterioração da qualidade da manga, de modo sustentável, econômico e de rápido manejo (KANWAL et al., 2010). O uso de óleos essenciais como alternativa biológica contra doenças é considerado seguro e ecologicamente correto, além de controlar a deterioração pós-colheita (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BANOS, 2014; MUNHUWEYI et al., 2017). A grande eficiência dos óleos essenciais se deve à sua composição, possuindo compostos voláteis e misturas de metabólitos em concentrações variadas, como fenóis, terpenoides, álcoois e aldeídos (STURCHIO et al., 2014). Em virtude dessa atuação, diversos autores comprovam o efeito dos óleos essenciais na inibição de doenças pós-colheita (KARIMI et al., 2016; SERVILI et al., 2017; HERNANDEZ-MONTIEL, 2018).

Assim, o objetivo deste trabalho foi a caracterização morfológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. de mangueira e da atividade inibitória de óleos essenciais sobre este patógeno.



## REFERÊNCIAS

- AGROESTAT/MAPA. **Estatística de exportações de frutas em 2019**. 2019. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2020/01/28/8825/>>. Acesso em: 02 mar. 2020.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI E FRUTI. Acertando o compasso. **Editora Gazeta**, p. 72. Santa Cruz do Sul, 2019. Disponível em: <[http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/07/HortiFruti\\_2019\\_DUPLA.pdf](http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/07/HortiFruti_2019_DUPLA.pdf)>. Acesso em: 02 jan. 2020.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Principais cartas na manga. **Editora Gazeta**, Santa Cruz do Sul, p. 69. 2018. Disponível em: <<http://www.editoragazeta.com.br/flip/anoario-fruticultura-2018/files/assets/basic-html/page70.html>>. Acesso em: 05 jan. 2020.
- ARAUZ, L. F. Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options for Integrated Management, **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 6. p. 600-611, 2000.
- BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. p. 88-120.
- BACIARELLEI-FALINI, L.; RUBINI, A.; RICCIONI, C.; PAOLOCCI, F. Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of a novel truffle-like morphotypes. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, n. 7, p. 474-484, 2006.
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Divers**, v. 39, p. 183–204, 2009.
- CHENG, W. et al. **A comparative study of mango solar drying methods by visible and near infrared spectroscopy coupled with ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA)**, Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie, Copenhagen, v. 112, p. 108-214, 2019.
- CUNHA, M. M.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. (org). Manga Fitossanidade. Brasília: EMBRAPA Mandioca Fruticultura, Cruz das Almas-BA. Brasília – EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, **Frutas do Brasil 6**, 104 p. 2000.
- DEGUINE, J. P. et al. Agroecological protection of mango orchards in La Réunion. **Sustain Agric Rev**, Saint-Pierre, France, v. 28, p. 249–307. 2018.
- FAO. **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. FAOSTAT: Divisão de estatística. Produção de safras. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 1º jun. 2019.
- FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR., J. Doenças dos citros (Citrus spp). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres. 2005. p. 239-269.
- FENG, G. et al. Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in mango fruit. **Postharvest Bio Technol.**, Haikou, China, v. 147, p. 139-147. 2019.

FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J.; TÖFOLI, J. G.; NOGUEIRA, E. M. C. **Antracnose associada às fruteiras.** Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2011\\_4/antracnose/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/antracnose/index.htm)>. Acesso em: 10 out. 2018.

FERNANDES, M. C. A.; SARTORI, A. S.; RIBEIRO, P. L. D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 28, n. 4, p. 325-330, 2002.

HERNÁNDEZ-DELGADO, P. M. et al., Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale. **Sci. Hortic.**, Tenerife, Spain, v. 130, p. 536–540, 2011.

HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. et al. Mecanismos empregados por *Debaryomyces hansenii* no controle biológico da antracnose em mamão. *Biologia e tecnologia pós-colheita*, v. 139, p. 31-37, 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola. Brasil**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

KARIMI, K.; ARZANLOU, M. E.; PERTOT, I. Atividade antifúngica do óleo essencial de semente de endro (*Anethum graveolens* L.) contra antracnose de morango em condições *in vitro* e *in vivo*. **Arquivos de Fitopatologia e Proteção de Plantas**, v. 49. p. 554-566. 2016.

KANWAL, Q.; HUSSAIN, I.; LATIF SIDDIQUI, H.; JAVAID, A. Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **Nat. Prod. Res**, Lahore, Pakistan, v. 24, p. 1907–1914, 2010.

MUNHUWEYI, K.; CALEB, O. J.; LENNOX, C. L.; VAN REENEN, A. J. Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais de quitosana contra patógenos de romã. **Biologia e Tecnologia Pós-colheita**, v. 129, p. 9–22, 2017.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (org.) **Marcadores moleculares**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009. p. 103-128.

PEROSA, J. M. Y.; PIERRE, F. C. Técnicas de pós-colheita e expansão da cultura da manga no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 381-384, 2002.

PERUMAL, A. B.; SELLAMUTHU, P. S.; NAMBIAR R. B.; SADIKU, E. R. Anti-fungal activity of five different essential oils in vapour phase for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae* in vitro and on mango. **J. Int. Food Sci. Technol.**, n. 51, p. 411-418, 2016.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças da Mangueira In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (org.). **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo. Ed. Agron. Ceres, 1997. p. 511-524.

SANTO, D.; GRAÇA. A.; NUNES. C.; QUINTAS. C. *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii* in ‘Tommy Atkins’ minimally processed mangos: Survival, growth and effect of UV-C and electrolyzed water. **Food Microbiology**, Faro, Portugal, v. 70, p. 49-54, 2018.

- SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. Caracterização Morfofisiológica de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Agentes de Antracnose em Frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 475-480, 2004.
- SERVILI, A., FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Exposição a substâncias voláteis de óleos essenciais isoladamente ou sob tratamento hipobárico para controlar o mofo cinza pós-colheita de uvas de mesa. **Biologia e tecnologia pós-colheita**, v. 133, p. 36-40, 2017.
- SIQUEIRA, T. V. A cultura da manga: desempenho no período 1961/2001 BNDES **Setorial**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 3-67, 2003.
- SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BANOS, S. Uma revisão sobre o uso de óleos essenciais para controle de deterioração pós-colheita e manutenção da qualidade da fruta durante o armazenamento. **Crop Protection**, v. 64, p. 23–27, 2014.
- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 265-281, 1992.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Great Britan: Commonwealth Agriculture Bureaux, 1980.
- STURCHIO, E. et al. Óleos essenciais: uma abordagem alternativa para o tratamento da doença do oídio. **Phytopathology Mediterranea**, v. 53, n. 3, p. 385-395, 2014.
- SYED, J. H. et al. Pesticide residues in fruits and vegetables from Pakistan: a review of the occurrence and associated human health risks. **Environ Sci Pollut Res.**, Guangzhou, China, v. 21, p. 13367–13393, 2014.
- TAVARES, G. M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (Carica papaya L.) na pós-colheita**. 2004. 55f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- 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, p. 651-655, 2004.
- TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; VIANA, F. M. P.; SARAIVA, A. C. M. **Estratégias de controle de podridões em pós-colheita de melão**: uma revisão. Documentos 112, Embrapa, 2008.

## CAPÍTULO II

### CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. OBTIDOS DE MANGUEIRA

#### RESUMO

A mangueira (*Mangifera indica* L.) se destaca como uma das fruteiras tropicais de maior importância no mundo. A antracnose, causada por fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum*, é uma das principais doenças desta cultura, relacionada principalmente a períodos de pós-colheita. Esse trabalho visou a estudar a caracterização morfológica, similaridade genética e de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira do Rio Grande do Norte, Brasil. Na avaliação morfológica dos 28 isolados, de acordo com a coloração das colônias, conídios, apressórios e velocidade de crescimento, os isolados foram identificados com características semelhantes à espécie *C. gloeosporioides*, sendo posteriormente confirmados com os primers gene específico. A combinação dos iniciadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) utilizados gerou uma variação de similaridade de 0,23 entre os isolados 12 e 21, e de 0,71 entre os isolados 2 e 4, identificando alto nível de variabilidade entre os fungos, para os quais a dissimilaridade foi superior a 75%. O dendograma gerado pelo método UPGMA indicou a formação de oito grupos principais. Não foram observados agrupamentos genéticos correlacionados com o local da coleta. Com base no teste de patogenicidade, a maioria dos isolados apresentou baixa virulência na variedade Tommy Atkins. Entretanto, alguns isolados se mostraram altamente agressivos (Isolados 9, 15, 20, 21, 24, 26 e 27) a esta variedade. Não foi possível a correlação dos agrupamentos gerados na similaridade genética com a patogenicidade encontrada nos isolados. Estes resultados confirmam a grande variabilidade genética e patogênica de *C. gloeosporioides* em variedades de manga em uma das principais regiões exportadoras do Brasil.

Palavras-chave: Fitopatógenos. Diversidade genética. Patogenicidade. Antracnose em manga.

## ABSTRACT

Mango tree (*Mangifera indica* L.) is highlighted as one of the most important fruitful trees in the world. Anthracnose, caused by phytopathogenic fungi from genre *Colletotrichum*, is one of the most important diseases of this culture, especially related to post harvest periods. This work aimed to study the morphological description, genetic similarity and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. isolate of mango tree from Rio Grande do Norte, Brasil. In the morphological description of the 28 isolate, according to the color of colonies, conidia, appressoria and speed of growing, the isolates were identified with features similar to the species *C. gloeosporioides*, confirmed with the primers specific gene. The combination of initiators RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) used provoked a similarity variation of 0.23 between the isolates 12 and 21 and of 0.71 between the isolates 2 and 4, identifying great level of variability among fungi, for which the dissimilarity was superior to 75%. The dendrogram generated by the method UPGMA indicated the formation of eight main groups. Genetic groupings related to the collection location were not observed. With basis on the pathogenicity, most isolates had shown small virulence to the variety Tommy Atkins. However, some isolates were highly aggressive (Isolates 9, 15, 20, 21, 24, 26 and 27) to this variety. It was impossible to correlate the groupings generated in the genetic similarity with the pathogenicity found in the isolates. These results confirm great genetic and pathogenic variability in mango varieties in one of the main important exporting regions of Brazil.

Palavras-chave: Phytopathogens. Genetic diversity. Pathogenicity. Anthracnose in mango.

## 1. INTRODUÇÃO

A mangueira (*Mangifera indica* L.) se destaca por ser uma das mais importantes fruteiras tropicais do mundo (CHENG et al., 2019; SANTO et al., 2018), representando notória expressividade na economia mundial, tendo a Índia como o principal país produtor, seguida pela China, com quase quatro vezes menos produtividade (FAO, 2017). No Brasil, esta fruta apresentou em 2019 um volume de exportação de aproximadamente 222 mil toneladas, movimentando mais de U\$\$ 220 milhões (AGROESTAT/MAPA, 2019). O cultivo da mangueira teve crescimento da área cultivada de 21,8% ao ano, aumentando de 13,2 mil para 31,2 mil hectares entre 2014 e 2019 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORFI E FRUTI, 2019). A região Nordeste se destaca como a maior produtora, sendo o estado do Rio Grande do Norte o terceiro maior produtor da região (IBGE, 2018).

Um dos principais períodos de grande risco para os frutos de mangueira é o pós-colheita. É neste período que os agentes patogênicos atacam os frutos, causando sérios riscos para a comercialização (HERNANDEZ-DELGADO et al., 2011). Doenças pós-colheitas são causadas principalmente por fungos fitopatogênicos (TERAO et al., 2008), dentre os quais se destaca um dos causadores da podridão em manga, o *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (1884) (PERUMAL et al., 2016).

A antracnose, doença causada principalmente por espécies do gênero *Colletotrichum*, vem se destacando devido aos danos produzidos e ao elevado custo de controle, o que encarece ainda mais a produção da manga, limitando a exportação deste fruto. Esta doença é de extrema importância no Brasil, onde se constata a doença em todo o território (BRASIL, 2015).

As espécies do gênero *Colletotrichum* são divididas em complexos. O complexo *C. acutatum* compreende mais de 29 espécies, o *C. gloeosporioides*, mais de 22 espécies e no Complexo *C. boninense* já foram relatadas mais de 18 espécies (DAMM et al., 2012; WEIR et al., 2012). Habitualmente, são identificadas por características culturais e morfológicas, como formas e dimensões de conídios e apressórios, presença ou ausência de cerdas, coloração das colônias, taxa de crescimento, dentre outros (ADASKAVEG; HARTIN, 1997). A sobreposição de características morfológicas em diferentes espécies e sua variação sob diferentes condições ambientais (CANNON, 2000) tornam necessário seu estudo combinado com outras técnicas para uma identificação precisa dentro desse gênero (LIU, 2016).

Métodos moleculares, como o emprego da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando primers genes específicos da espécie, aliados às análises morfológicas, têm sido bastante empregados visando à maior precisão na identificação de espécies de *Colletotrichum*

(MILLS, 1992). Outras ferramentas moleculares bastante utilizadas são o uso de iniciadores moleculares, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Ensaio moleculares de diversidade genética utilizando estes iniciadores são utilizados para a elucidação de variação genética dentro e entre espécies (MILGROOM, 1996). Nesse contexto, a variação genética representa o acúmulo de mutações que podem estar relacionadas à superação da resistência genética do hospedeiro (MCDONALD, 2002). Pesquisas visando à identificação desta resistência são de grande importância na identificação de indivíduos com maior capacidade de virulência. Estudos sobre a interação do patógeno com o seu hospedeiro auxiliam na compreensão das características da doença, além de avaliarem possíveis variações de virulência entre patógenos.

A caracterização morfológica, as análises moleculares e os testes de patogenicidade são cruciais para o manejo e controle de doenças. Assim, esta pesquisa teve como objetivo estudar a caracterização morfológica, similaridade genética e de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira do Rio Grande do Norte, Brasil.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta das amostras

Folhas e frutos de mangueira contendo sintomatologia típica de antracnose foram coletados de cinco áreas de produção no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, para o isolamento do fungo *Colletotrichum* sp. (Tabela 1).

**Tabela 1** – Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de mangueiras do Rio Grande do Norte, Brasil.

	Isolado	Tecido vegetal	Variedade	Localização	
Fazenda 1	Planta 1	1	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 2	2	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 3	3	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 4	4	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 5	5	Folha	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 6	6	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
Fazenda 2	Planta 7	7	Fruto	Tommy	Ipanguaçu
	Planta 8	8	Fruto	Tommy	Ipanguaçu
Fazenda 3	Planta 9	9	Folha	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 10	10	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 11	11	Folha	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 12	12	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 13	13	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 14	14	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 15	15	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 16	16	Folha	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 17	17	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
	Planta 18	18	Fruto	Palmer	Ipanguaçu
Planta 19	19	Folha	Palmer	Ipanguaçu	
Planta 20	20	Folha	Palmer	Ipanguaçu	



	Planta 17	21	Folha	Tommy	Pendências
	Planta 18	22	Folha	Tommy	Pendências
	Planta 19	23	Folha	Tommy	Pendências
Fazenda 4	Planta 20	24	Fruto	Tommy	Pendências
	Planta 21	25	Folha	Tommy	Pendências
	Planta 22	26	Fruto	Tommy	Pendências
	Planta 23	27	Folha	Tommy	Pendências
Fazenda 5	Planta 23	28	Fruto	Palmer	Assú

## 2.2 Isolamento fúngico

Para os isolamentos fúngicos, os frutos e folhas coletados foram lavados em água destilada esterilizada e secos em papel estéril. Após a lavagem inicial, pequenos fragmentos, aproximadamente 7 mm, dos tecidos vegetais sintomáticos foram retirados das áreas limítrofes (entre a doente e a sadia) e desinfestadas em álcool 70 % por 30 s, seguido de 60 s em hipoclorito de sódio a 1 %. Em seguida, foram lavadas em água destilada esterilizada, sendo posteriormente colocados em meio Batata Dextrose Agar (BDA) com a adição de 0,05g/L de estreptomicina. As placas foram mantidas a  $28 \pm 2$  °C por sete dias e, após o cultivo, bordas das estruturas fúngicas obtidas sobre o tecido coletado foram transferidas para o meio BDA. Após o desenvolvimento de culturas puras por técnica de purificação monohifal, discos contendo estruturas fúngicas foram armazenadas a 5 °C em frascos contendo água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939).

## 2.3 Análises morfológicas

Para as análises morfológicas, discos contendo estruturas fúngicas (5 mm de diâmetro) de culturas puras dos isolados foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA e mantidas a  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias, sendo registrada sua coloração durante esse período. Os diâmetros das colônias dos isolados e sua velocidade de crescimento micelial ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) foram calculados diariamente. Para a avaliação dos conídios e apressórios, foi utilizado o método do microcultivo, sendo depositado um bloco de ágar contendo a estrutura fúngica sobre a lâmina, e acima a lamínula. A lâmina foi colocada dentro

da placa Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada esterilizada (MENEZES; ASSIS, 2004). As placas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C em BOD por 5 dias. Após o cultivo, as lamínulas foram retiradas das placas de Petri para avaliação. Para cada isolado, foram avaliados o comprimento e largura de 100 apressórios e conídios, escolhidos aleatoriamente, identificados por microscópio óptico, utilizando o *software* image j, versão 1.52a. Para cada isolado, foram utilizadas três réplicas. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott a 5 % de probabilidade pelo programa Sisvar versão 5.7 (Build 91).

## 2.4 Extração de DNA

A massa micelial dos isolados fúngicos foi obtida de cultivos em BDA crescidas por sete dias a  $28 \pm 2$  °C. O micélio foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido e seu material genômico foi extraído pelo método de Ferreira; Grattapaglia (1998), com modificações, sendo adicionados 700 uL de tampão de extração (NaCl 1,4M; Tris HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; SDS 0,5%;  $\beta$ -Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q) e incubados a 65 °C por 60 min. Em seguida, foi adicionada uma solução de Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1, v/v) com posterior precipitação com 400 mL de álcool isopropílico. As amostras precipitadas foram centrifugadas a 15.000 g por 10 min. Os precipitados foram lavados em etanol gelado a 70, 80 e 90 %, respectivamente, e secos em temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em água estéril com adição de RNA'se e, em seguida, submetidas ao banho-maria, a 37 °C por 30 min, e posteriormente armazenadas a -20 °C. O DNA obtido foi quantificado em eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) em tampão TBE a 120 V por 30 min e posteriormente visualizado sob luz UV usando o sistema de documentação em gel (Proteinsimple – Alphaimager HP).

## 2.5 Identificação molecular

A identificação molecular foi realizada usando primers específicos para o gênero *Colletotrichum*, Cc1F1 (5'-ACC TAA CTG TTG CTT CGG CG-3') e Cc2R1 (5'-AAA TTT GGG GGT TTT ACG GC-3'), descrito por Cullen et al. (2002), e para a espécie *C. gloeosporioides*, CgInt (5'-GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG-3'") e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), descrito por Mills et al. (1992). Para a PCR, utilizou-se 20  $\mu\text{L}$  de volume final contendo 25 ng de DNA, 1x tampão de PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; da Sinopse inc), 2,5 mM de cada dNTP (Sinopse inc.), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM Primer e 1

U de Taq polimerase (Sinopse inc.). As ampliações do DNA foram realizadas em termociclador de DNA Amplitherm, consistindo em uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C durante três minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 40 s, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, e uma etapa final de extensão 72 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,2 %, corado com brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em tampão TBE a 120 V por 1,5-2 h, e posteriormente visualizados sob luz UV, usando o sistema de documentação em gel (Proteinsimple – Alphaimager HP). O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado a partir do padrão de peso molecular de 100 pb “DNA Ladder Plus” (Thermofisher).

## 2.6 Diversidade genética

Para a diversidade genética, foram utilizados nove primers ISSR e 12 Primers RAPD para o rastreamento do polimorfismo (Tabela 2) de 28 isolados de *C. gloeosporioides*. As reações de amplificação para os iniciadores RAPD foram realizadas utilizando volumes finais de 12  $\mu\text{L}$ , contendo 10 ng do DNA, 5  $\mu\text{M}$  do primer, 2 mM de cada dNTP, solução tampão de Buffer 1x (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{g}$  de BSA e 1 U de Taq DNA polimerase. As ampliações em termociclador para os primers RAPD consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 96 °C por 1 min, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 1 min para a desnaturação, 1 min a 40 °C para o anelamento e 2 min a 72 °C para a extensão e uma etapa final de extensão de 72 °C, por 5 min. As reações de amplificação para os iniciadores ISSR foram realizadas utilizando volumes finais de 12  $\mu\text{L}$  contendo 10 ng do DNA, 0,2  $\mu\text{M}$  do primer, 2 mM de cada dNTP, solução tampão de Buffer 1x (50 mM de KCl; 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{g}$  de BSA e 1 U de Taq DNA polimerase. As ampliações para os primers ISSR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação por 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 40 s, temperatura de anelamento de cada iniciador por 40 s e 72 °C por 1 min, e uma etapa final de extensão 72 °C por 5 min.

**Tabela 2** - Dados dos iniciadores ISSR e RAPD utilizados.

Nº do Primer	Código do iniciador	Sequência do iniciador (5' → 3')	Temperatura de anelamento
Primer ISSR			
1	DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	50
2	TriCAC'RC	CACCACCACCACCACRC	55
3	TriGTG	GTGGTGGTGGTGGTG	55
4	TriGTG3'yC	GTGGTGGTGGTGGTGyC	52
5	TriGTG5'Cy	CyGTGGTGGTGGTGGTG	55
6	TriTGT5'Cy	CyTGTTGTTGTTGTTGT	50
7	TriTCA3'RC	TCATCATCATCATCARC	50
8	TriTCC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	50
9	TriCGA3'RC	CGACGACGACGACGARC	45
Primer RAPD			
1	OPD 02	GGACCCAACC	40
2	OPD 03	GTCGCCGTCA	40
3	OPD 07	TTGGCACGGG	40
4	OPD 08	GTGTGCCCCA	40
5	OPD 13	GGGGTGACGA	40
6	OPD 18	GAGAGCCAAC	40
7	OPD 20	ACCCGGTCAC	40
8	OPM 01	GTTGGTGGCT	40
9	OPM 02	ACAACGCCTC	40
10	OPM 12	GGGACGTTGG	40
11	OPM 15	GACCTACCAC	40
12	OPM 20	AGGTCTTGGG	40

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>), em tampão TBE (1X) a 120 V por 1,5-2 h, e posteriormente visualizados sob luz UV utilizando o sistema de fotodocumentação em gel (Proteinsimple – Alphaimager HP). O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado a partir do padrão de peso molecular de 100 pb “DNA Ladder Plus” (Thermofisher).

Os resultados das ampliações com os iniciadores ISSR e RAPD nos 28 isolados foram analisados em sistema binário para a presença de bandas “1” ou ausência “0”, sendo consideradas somente bandas nítidas e reproduzíveis. Para cada marcador selecionado, foi gerado o conteúdo de informações polimórficos (PIC). Um dendograma foi construído com

base no coeficiente de similaridade de Jaccards utilizando o método de agrupamento de pares não ponderadas (UPGMA) pelo programa NTSYS (ROHLF, 1998).

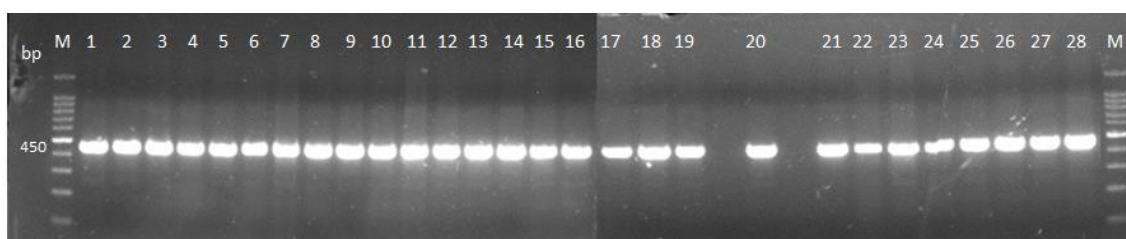
## 2.7 Teste de patogenicidade

A virulência dos isolados foi avaliada em frutos da variedade Tommy Atkins obtidos de cultivos locais do RN. Os frutos foram lavados em água corrente, desinfestados por imersão em hipoclorito de sódio a 1,5 % (NaCl) por 2 min, e novamente lavados em água destilada esterilizada e secos sob temperatura ambiente (colocar sob temperatura média do ambiente). Em seguida, foram realizadas três perfurações de 7 mm, com o auxílio de furador metálico estéril na epiderme de cada fruto. Para cada isolado, discos contendo estruturas fúngicas de 5 mm de diâmetro foram previamente removidos de bordas de culturas crescidas em meio BDA por sete dias de crescimento, e transferidos para cada ponto das perfurações do fruto. O grupo controle consistiu de discos de meio BDA sem crescimento fúngico. Os frutos foram colocados em bandejas plásticas (desinfestadas com álcool 70%), contendo algodão umedecidos com água destilada esterilizada, sendo posteriormente cobertos com papel filme para a manutenção da umidade nos frutos. As bandejas com os frutos foram mantidas em temperatura ambiente ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) em fotoperíodo natural. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com seis repetições por isolado, sendo a unidade experimental equivalente a uma perfuração. A avaliação da virulência foi realizada sete dias após a inoculação, mediante a medição do diâmetro médio das lesões (cm). Os isolados foram considerados patogênicos quando a área lesionada foi superior à lesão inicial de 7 mm de diâmetro. A diferença na virulência dos isolados de *C. gloeosporioides* foi analisada por ANOVA, e suas médias foram comparadas pelo teste LSD a 5 % de significância, utilizando o programa estatístico Sisvar versão 5.7 (Build 91).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Identificação molecular

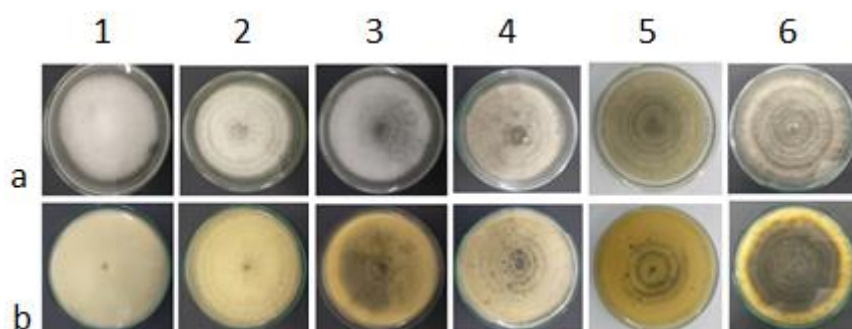
Dos isolamentos teciduais de folhas e frutos de mangueira, o DNA dos 28 isolados amplificou com os iniciadores Cc1F1/Cc2R1 e CgInt / ITS4 específicos para o gênero e espécie do *C. gloeosporioides* (Figura 1), respectivamente. Ambos geraram um fragmento de DNA de 450 pb, conforme o esperado.



**Figura 1** - Produto de amplificação por PCR com o par de iniciadores CgInt/ITS4 para detecção de *Colletotrichum gloeosporioides*.

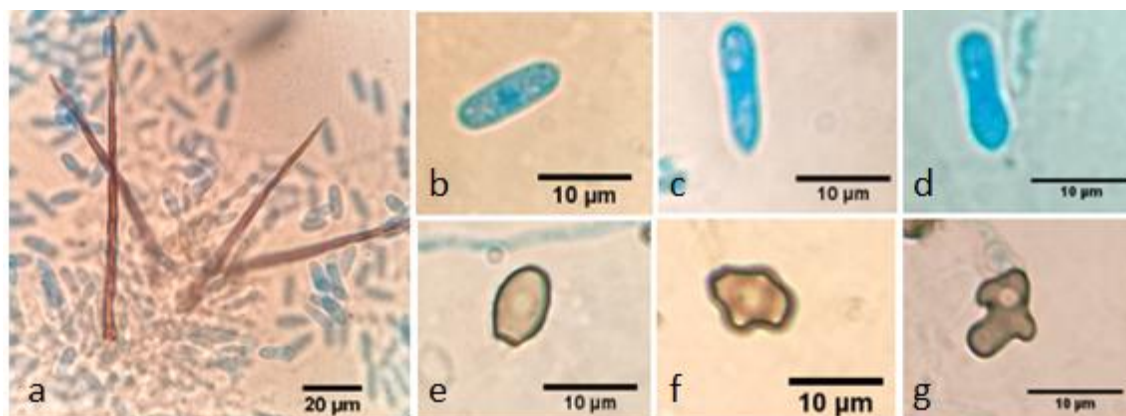
#### 3.2 Análises morfológicas

As diferenças nas características de coloração das colônias resultaram em seis grupos distintos para os 28 isolados de *C. gloeosporioides* (Figura 2). Isolados do grupo 1 (Isolado 1) produziram colônias de coloração levemente acinzentada sem massa conidial visível. O grupo 2 (Isolados 5, 7, 14, 15, 16, 17, 22, 27 e 28) apresentaram micélio levemente acinzentado com massa conidial alaranjada pouco visível. Grupo 3 (Isolados 6, 8, 10, 11, 20 e 23) apresentou massa micelial acinzentada com massa conidial escura no centro e regiões escuras nas laterais. O grupo 4 (Isolados 2, 9, 12, 13, 21, 18 e 25) apresentou coloração levemente salmão contendo massa conidial alaranjada, e escura no centro. O grupo 5 (Isolados 19 e 24) apresentou coloração salmão com massa conidial escura e anéis concêntricos escuros ao longo do centro para as bordas da cultura. O grupo 6 (Isolados 4 e 26) apresentou variações concêntricas de coloração variando do salmão, cinza claro e cinza escuro com massa conidial escura visível. Houve diferença significativa na taxa de crescimento entre os isolados avaliados (Tabela 3), variando de 11,13 (Isolado 26) a 17,73 mm dia<sup>-1</sup> (Isolado 14).



**Figura 2** – Os seis morfotipos encontrados de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de mangueira, **a)** lado superior da colônia e **b)** verso da colônia.

Três tipos de conídios e apressórios foram observados nos isolados avaliados (Figura 3). Para os conídios: 1 - retos com extremidade arredondada, 2 – retos com constrição e 3 – retos e afilados em uma das extremidades. Para os apressórios: 1 - irregulares e lobulados, 2 - irregulares e fracamente lobulados, 3 - arredondados e lisos. Foram observados 25 isolados contendo, em sua maioria, conídios retos com extremidade arredondada e três apresentando conídios retos e afilados em uma das extremidades. Em relação aos apressórios, 19 isolados apresentaram estruturas redondas e lisas e nove irregulares e fracamente lobulado. Além disso, foram observados a presença de setas em oito dos 28 isolados. Os tamanhos médios de largura e comprimento variaram de 2,10 a 4,55  $\mu\text{m}$ , e 7,75 a 14,28  $\mu\text{m}$  para os conídios e de 4,89 a 7,05  $\mu\text{m}$ , e 7,13 a 9,90  $\mu\text{m}$  para os apressórios, respectivamente (Tabela 3).



**Figura 3** - Estruturas encontradas nos isolados estudados: Setas (a) Conídios: 1 - retos com extremidade arredondada (b) retos e afilados em uma das extremidades (c) e retos com constrição (d) Apressórios: arredondados e lisos (e) irregulares e fracamente lobulados (f) irregulares e lobulados (g).

**Tabela 3** - Taxas de crescimento, caracterização de conídios, apressórios e presença de setas dos isolados de *C. gloeosporioides*.

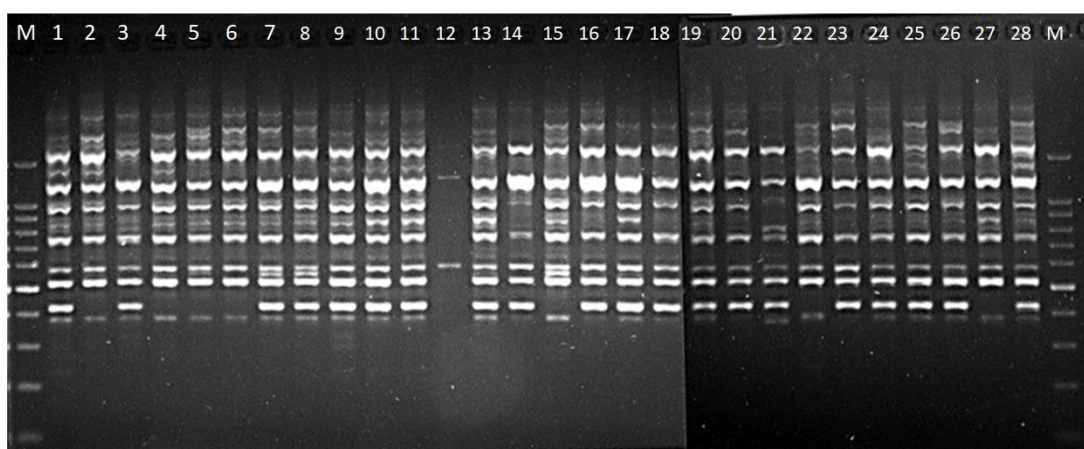
Isolado:	Presença de setas	Taxa de crescimento (mm dia <sup>-1</sup> )	Conídios			Apressório conidial		
			Largura (µm)	Comprimento (µm)	Forma mais encontrada	Largura (µm)	Comprimento (µm)	Forma mais encontrada
1	-	15,47±0,32 e	3,85±0,32 c	11,23±0,86 f	1	6,21±0,78 e	8,62±1,17 e	3
2	+	13,93±0,19 d	3,54±0,27 b	11,34±1,06 f	1	6,34±0,70 f	9,10±1,08 f	2
3	-	14,53±0,24 d	4,55±0,37 f	7,75±0,87 a	1	6,15±1,43 e	8,19±1,29 d	3
4	-	13,20±0,22 c	4,17±0,28 e	11,26±0,97 f	1	6,32±0,70 f	8,21±0,95 d	3
5	-	13,93±0,27 d	3,95±0,29 e	12,17±0,69 h	3	5,13±0,44 a	7,39±0,88 a	3
6	-	13,73±0,26 d	2,82±0,43 a	9,46±1,40 c	1	6,03±0,75 d	8,08±1,19 c	3
7	-	12,40±0,30 b	2,93±0,37 b	10,91±0,59 e	1	5,27±0,67 b	7,41±1,07 a	3
8	-	11,20±0,15 b	2,46±0,45 a	8,32±1,12 b	3	5,88±0,77 d	8,31±0,81 d	2
9	-	13,40±0,16 c	3,54±0,28 c	11,20±0,51 e	1	6,10±0,69 d	7,91±1,30 c	2
10	-	15,60±0,22 e	2,10±0,39 a	10,98±1,27 e	1	5,78±0,79 c	7,73±1,11 b	2
11	-	13,73±0,16 d	3,52±0,32 b	11,86±0,84 g	1	4,89±0,80 a	7,48±1,29 a	2
12	-	14,20±0,26 d	3,65±0,34 c	11,63±1,36 f	1	6,54±0,87 f	8,43±0,97 d	2
13	-	14,33±0,14 d	2,89±0,59 b	9,89±1,23 c	1	5,17±0,75 a	7,13±1,20 a	2
14	+	17,73±0,38 g	3,50±0,23 b	10,52±0,57 d	1	5,56±0,68 b	7,41±0,83 a	3
15	-	14,07±0,23 d	4,03±0,19 e	11,73±0,55 g	1	5,32±0,80 b	7,72±1,17 b	3
16	-	17,40±0,30 g	4,19±0,34 e	12,20±0,62 h	3	6,24±0,64 e	9,30±1,32 g	3
17	+	16,07±0,19 e	4,09±0,37 e	11,67±0,76 g	1	6,09±0,66 d	8,24±0,95 d	3
18	+	14,07±0,22 d	2,94±0,52 b	11,15±1,29 e	1	5,86±0,50 c	8,13±0,68 d	2
19	+	16,27±0,13 f	4,27±0,40 f	12,79±0,84 i	1	6,87±0,59 g	9,60±0,88 h	3
20	+	11,33±0,14 a	4,29±0,58 f	14,28±2,62 j	1	5,90±0,74 d	8,62±1,06 e	2
21	+	15,53±0,25 e	4,32±0,33 f	12,28±0,67 h	1	7,05±0,76 g	9,90±1,01 h	3
22	+	15,13±0,23 e	3,98±0,21 e	11,83±1,48 g	1	5,74±0,46 c	7,92±0,78 c	3
23	-	14,80±0,29 e	3,88±0,26 d	11,31±0,75 f	1	5,67±0,45 c	7,91±0,81 c	3
24	-	12,87±0,14 c	3,65±0,38 c	12,29±0,74 h	1	5,85±0,62 c	8,91±0,95 f	3
25	-	15,40±0,38 e	3,92±0,25 d	13,04±0,98 i	1	5,44±0,50 b	8,16±0,86 d	3
26	-	11,13±0,27 a	3,88±0,23 d	11,68±0,69 g	1	5,21±0,81 b	7,82±1,25 c	3
27	-	16,00±0,36 f	4,26±0,54 f	10,85±1,18 d	1	5,12±0,90 a	7,34±1,92 a	3
28	-	16,47±0,08 f	4,02±0,29 d	12,45±0,85 h	1	6,30±0,79 e	9,59±1,84 g	3

Formas mais encontradas: Conídios: 1 - retos com extremidade arredondada, 2 - retos com constricção e 3 - retos e afilado em uma das extremidades; Apressórios: 1 - irregulares e lobulados, 2 - irregulares e fracamente lobulados, 3 - arredondados e lisos. Média ± erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna difere significativamente ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott Knott.



### 3.3 Diversidade genética

As ampliações com os iniciadores RAPD (Figura 4) usando 12 iniciadores produziram 167 locos, dos quais 128 (76,6%) foram locos polimórficos (Tabela 4), sendo bandas altamente distintas. O número de bandas amplificadas para os iniciadores variou de 7 (OPD08) a 22 (OPM01). Dos 12 iniciadores, nenhum obteve 100 % de polimorfismo, tendo o iniciador OPM01 apresentado maior taxa (90%). Foram calculados os valores de PIC para cada iniciador. O iniciador OPD07 apresentou o maior valor de PIC, 0,440 e o iniciador OPM02 obteve o menor valor de PIC de 0,265. O valor médio de PIC para o marcador RAPD de 0,364.



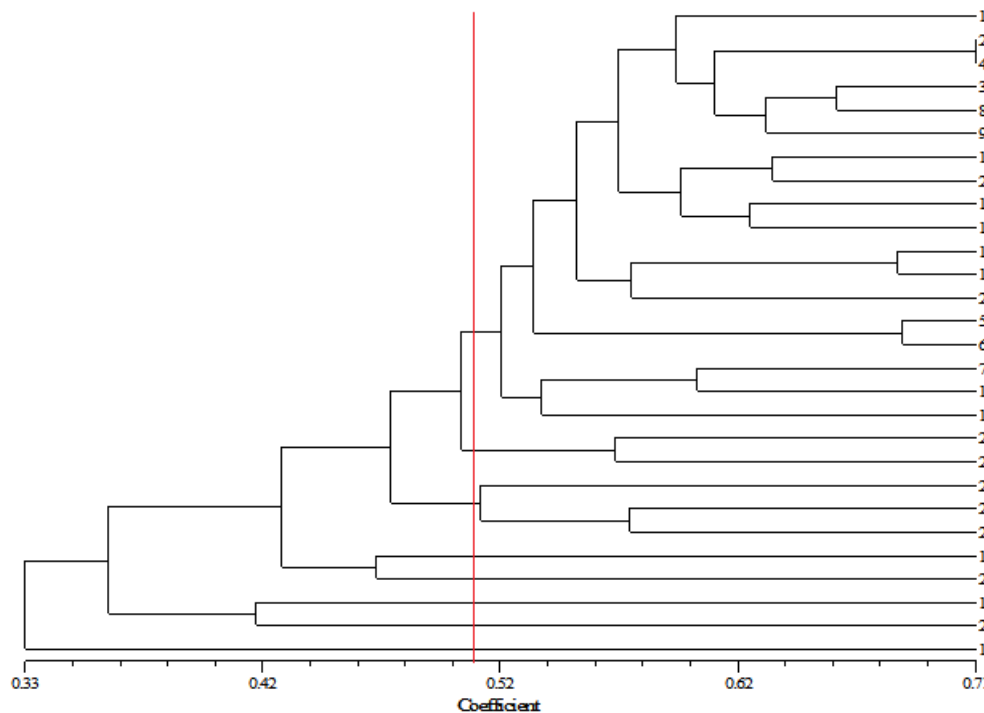
**Figura 4** - Produtos da amplificação de PCR com o iniciador RAPD 18 dos 28 isolados de *C. gloeosporioides* submetidos a eletroforese em gel de agarose. 'M' nas extremidades do gel representa o marcador de peso molecular de 100 pb. As canaletas de 1 a 28 representam cada um dos 28 isolados.

**Tabela 4** - Caracterização dos dados obtidos com os iniciadores RAPD e ISSR quanto ao total de locos (TL), locos monomórficos (LM), locos polimórficos (LP), porcentagem de polimorfismo (%P) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

Primer	TL	LM	LP	% P	PIC
<b>Primers RAPD</b>					
OPD 02	10	1	9	90	0,387
OPD 03	8	2	6	75	0,356
OPD 07	9	1	8	88,9	0,440
OPD 08	7	2	5	71,4	0,328
OPD 13	12	7	5	41,7	0,363
OPD 18	17	3	14	82,4	0,290
OPD 20	20	2	18	90	0,328
OPM 01	22	2	20	90,9	0,406
OPM 02	17	3	14	82,4	0,265
OPM 12	15	8	7	46,7	0,414
OPM 15	12	3	9	75	0,378
OPM 20	18	5	13	72,2	0,408
Total	167	39	128	76,6	-
Média	13,9	3,25	10,7	-	0,364

<b>Primers ISSR</b>					
DiGA5'CR	8	0	8	100	0,356
TriCAC'RC	7	1	6	85,7	0,215
TriGTG	10	0	10	100	0,353
TriGTG3'yC	8	2	6	75	0,460
TriGTG5'Cy	7	0	7	100	0,439
TriTGT5'Cy	5	0	5	100	0,364
TriTCA3'RC	6	0	6	100	0,401
TriTCC3'RC	6	0	6	100	0,446
triCGA3'RC	6	2	4	66,7	0,385
Total	63	5	58	92,1	-
Média	7	0,5	6,4	-	0,380

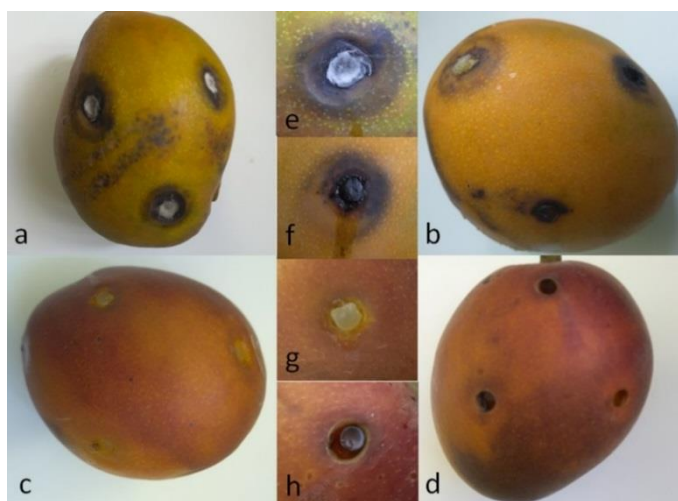
As ampliações dos iniciadores ISSR utilizando nove iniciadores produziram 63 locos, dos quais 58 (92,1%) foram polimórficos (Tabela 4). O número de bandas amplificadas para os iniciadores ISSR variou de cinco (TriTGT5'Cy) a dez (TriGTG). Dos nove iniciadores, seis apresentaram 100% de polimorfismo (DiGA5'CR, TriGTG, TriGTG5'Cy, TriTGT5'Cy, TriTCA3'Cy e TriTCC3'RC). O maior valor de PIC (0,460) foi obtido com o iniciador ISSR10 e o menor (0,215) foi com o iniciador ISSR08, com valores médios de 0,380 por iniciador. Os dados obtidos de ambos os iniciadores foram combinados para gerar a similaridade genética. O dendograma gerado com os dados (Figura 5) gerou 0,51 de similaridade a formação de oito grupos: grupo 1 (isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 27 e 28), grupo 2 (isolados 22 e 26), grupo 3 (isolados 20, 24 e 25), grupo 4 (isolado 18), grupo 5 (isolado 23), grupo 6 (isolado 17), grupo 7 (isolado 21), grupo 8 (isolado 12). O coeficiente de similaridade variou de 0,23 (Isolados 12 e 21) a 0,71 (Isolados 2 e 4).



**Figura 5** – Dendrograma gerados pelo método UPGMA a partir da combinação dos iniciadores ISSR+RAPD.

### 3.4 Avaliação de patogenicidade

Houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) na virulência entre os isolados (Figura 6). Dentre os isolados de *C. gloeosporioides* avaliados, apenas três (Isolados 5, 8 e 23) não apresentaram lesões nos frutos (0,7 cm referente a lesão inicial) (Tabela 5). Os demais produziram lesões típicas de antracnose. As maiores médias de lesões foram encontradas entre os isolados 24 (2,7 cm), 21 (2,6 cm) e 20 (2,3 cm).



**Figura 6** – Patogenicidade de *C. gloeosporioides* em mangas da variedade Tommy Atkins, sete dias após a inoculação. Lesões causadas por isolados mais virulentos; isolados 24 (a) e 21 (b) e ampliação de suas respectivas lesões (e; f) e dois não patogênicos, isolados 5 (c) e 8 (d) e seus respectivos locais de inoculação (g e h).

**Tabela 5** – Médias de lesões em mangas, causadas por isolados de *C. gloeosporioides*.

Isolado	Média de lesão (cm)	Isolados	Média de lesão
Controle	0,7 a	15	2,1 ef
1	0,82 ab	16	0,95 b
2	0,88 ab	17	0,85 ab
3	0,78 ab	18	0,77 ab
4	0,75 ab	19	0,72 ab
5	0,7 a	20	2,3 f
6	1,2 c	21	2,6 g
7	0,73 ab	22	0,73 ab
8	0,7 a	23	0,7 a
9	2,1 e	24	2,7 g
10	0,82 ab	25	0,8 ab
11	0,82 ab	26	1,65 d
12	0,75 ab	27	1,77 d
13	0,75 ab	28	0,82 ab
14	0,95 b		

Letras diferentes mostram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste t (LSD).

#### 4 DISCUSSÕES

A diversidade de coloração obtida pelas colônias pode ser atribuída às expressões fenotípicas associadas ao ambiente, bem como à liberação de metabólitos secundários, que tem sido bastante associada a isolados de *Colletotrichum*, possibilitando alto grau de variações morfo-culturais (BAILEY; JERGER, 1992; BONETT et al., 2010).

Para a velocidade de crescimento micelial, foram encontradas diferenças até mesmo entre isolados de mesmo grupo de coloração morfo-cultural, demonstrando relação de independência entre a coloração e a taxa de crescimento micelial. Além disso, pode-se observar diferença significativa de crescimento entre *C. gloeosporioides* isolados da mesma planta, porém de tecidos diferentes, como é o caso dos isolados 10 e 11; 15 e 16; 18 e 19; 24 e 25, respectivamente, de frutos e folhas. Este resultado demonstra possível variação dos isolados que pode estar associada a uma especificidade ao tecido do hospedeiro, podendo possuir até mesmo variação em nível genético.

A maioria dos isolados teve predominância de conídios retos com extremidades arredondadas, sendo esse formato característico de *C. gloeosporioides* (SUTTON, 1992; RITCHIE, 2003). Segundo Sutton (1992), o comprimento médio dos conídios desta espécie é de 12 a 17  $\mu\text{m}$ , e a largura é de 3,5 a 6. Este resultado é divergente do encontrado no presente trabalho, em que se obteve resultados menores para o comprimento (7,75  $\mu\text{m}$ ) e largura (2,10  $\mu\text{m}$ ) dos conídios. Entretanto, outros trabalhos (TOZZE, 2015; ANDRADE, 2007) relatam também as divergências nos parâmetros informados por Sutton (1992). Damm (2012) relata que a variabilidade na expressão morfológica dessa espécie torna a identificação com base na caracterização morfológica bastante ambígua.

Embora haja caracterização morfológica e molecular de espécies de *Colletotrichum* em todo o mundo, estudos como esses ainda são escassos no Rio Grande do Norte (RN), grande exportador de manga do Brasil. A combinação de caracteres morfológicos e moleculares encontradas no presente trabalho confirmam que *C. gloeosporioides* é o causador de antracnose em manga na região do RN, Brasil. Foram identificados, por meio de iniciadores moleculares, 100% dos isolados de *Colletotrichum* obtidos (28), como pertencentes ao complexo de espécie de *C. gloeosporioides*. O uso de primers específicos para *C. gloeosporioides* também foram utilizados com sucesso para a detecção desta espécie em culturas tropicais como tamarindo, maracujá e manga (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). Stracieri (2015), quando avaliou isolados de *Colletotrichum* com primers gene específico associados a mangueira no estado de São Paulo no Brasil, confirmou que os 52 isolados avaliados pertenciam à espécie *C.*

*gloeosporioides*. Estes resultados mostram a confiabilidade desses primers para uma identificação precisa, especialmente quando a identificação morfológica é dificultada (WHITELAW-WECKERT et al. 2007). Ferramentas baseadas em PCR são de grande interesse nesse tipo de estudo na medida em que permitem o diagnóstico rápido e preciso dessa espécie.

Nos perfis dos iniciadores ISSR e RAPD foi possível observar a confiabilidade e reprodutibilidade aparentes nas amplificações da PCR. O agrupamento dos isolados de *C. gloeosporioides* pôde ser identificado devido à alta detecção dos alelos característicos da espécie. A variação polimórfica foi de 66,7 a 100% e 41,7 a 90,9% em ISSR e RAPD, respectivamente, sendo encontrada maior taxa de polimorfismo em iniciadores ISSR. Diversos autores identificam a grande capacidade dos iniciadores ISSR em acessar a diversidade genética (FAN et al., 2010; ABADIO et al., 2012). Entretanto, alguns autores revelam maior porcentagem de polimorfismo encontrado em iniciadores RAPD, em comparação a ISSR (ARIF et al., 2009; GOMES et al., 2009; TANYA et al., 2011), atribuindo isso à maior capacidade desses iniciadores em acessar mais regiões informativas no genoma.

O PIC médio para ambos os iniciadores ISSR e RAPD foi de 0,380 (intervalo = 0,215 a 0,460) e 0,364 (intervalo= 0,290 a 0,440), respectivamente. Prittesh (2018), avaliando a diversidade genética de isolados de *C. falcatun*, obteve resultados muito superiores de valores de PIC para iniciadores ISSR e RAPD (0,767 e 0,705, respectivamente). Contudo, apesar dos baixos valores de PIC encontrados no presente estudo, a obtenção de coeficientes de similaridade baixos obtidos com ISSR e RAPD revelam o grande suporte que esses iniciadores possuem em acessar a diversidade genética de *C. gloeosporioides*.

Além disso, a diversidade genética pode ser encontrada até mesmo em isolados coletados da mesma planta, identificando, assim, o grande nível de variação genética de *C. gloeosporioides* presentes em plantações de mangueira do Rio Grande do Norte, Brasil. Resultados semelhantes foram relatados na caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* em citros, sendo possível o agrupamento genético de isolados obtidos em diferentes tecidos da planta (SILVEIRA et al., 2016).

Os iniciadores RAPD e ISSR detectaram variações notáveis de polimorfismo e satisfatória capacidade de discriminação dos indivíduos, sugerindo, assim, a eficiência dos dois iniciadores na análise de relações genéticas. Os agrupamentos gerados pelo dendograma não puderam ser correlacionados às localidades de coleta dos isolados. Estes resultados estão em conformidade com os de Ratanacherdchai et al. (2010), para quem nem sempre se pode relacionar o agrupamento genético e a localização geográfica dos isolados. Porém, Stracieri (2015), quando estudaram isolados de *Colletotrichum* em mamão, observou a formação de

quatro grupos contendo todos os indivíduos relacionados de uma mesma região. Ratanacherdchai et al. (2010), avaliando diversidade genética de *C. falcatum* em pimenta por iniciadores ISSR, correlacionaram a distribuição geográfica à diversidade encontrada nos indivíduos. Os resultados encontrados neste trabalho podem ser relacionados com infecções cruzadas de isolados de regiões diferentes, possibilitando trocas genéticas entre regiões, dificultando, assim, o agrupamento de isolados de uma mesma localidade. Isto implicaria a dispersão de isolados possivelmente mais patogênicos ao longo da região, incidindo em contaminações e perdas de produção em áreas onde ocorreram a introdução dos novos isolados, dificultando o controle e aumentando os custos de produção.

Poucos isolados de *Colletotrichum* apresentaram altos níveis de virulência, tendo 67% dos isolados obtidos da variedade Tommy apresentando lesões acima de 1 cm de diâmetro contra apenas 21% dos isolados da variedade Palmer (Figura 8). Estes resultados mostram a grande adaptabilidade de isolados obtidos da mesma variedade de manga, assim como observado por Marques (2009), ao avaliar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* em diferentes variedades de café, identificou, para um mesmo isolado, a patogenicidade em 100% dos frutos inoculados na variedade Semperflorens contra apenas 20% da variedade Catuaí Arrepiado.

Lima et al. (2015), verificando a diversidade patogênica de isolados de *C. gloeosporioides* em frutos de manga entre as variedades Keith, Palmer e Tommy Atkins, observaram que a variedade Tommy foi identificada como a mais resistente a este patógeno. Estes dados estão de acordo com o presente trabalho, no qual foi evidenciada baixa quantidade de isolados que obtiveram virulência significativa contra a variedade Tommy. Isso provavelmente se deve à resistência do fruto inoculado ou das características dos isolados (ALAHAKOON et al., 1994; SNADERS; KORSTEN, 2003). Segundo Lima et al. (2015), essa virulência reduzida pode estar relacionada à resistência dessa variedade à deterioração na fase de pós-colheita, sendo menos perecível e mais parcialmente resistente à antracnose (LIMA NETO et al., 2010), o que justifica a grande apreciação de sua produção para o mercado externo.

Os isolados mais patogênicos foram provenientes da Fazenda 3 (Isolados 9, 15 e 20), localizada em Ipanguaçu/RN, e da Fazenda 4 (Isolados 21, 24, 26 e 27), localizada em Pendências/RN. As demais Fazendas apresentaram isolados pouco virulentos. Lima et al. (2015), quando avaliaram mangas na cidade de Pendências no Rio Grande do Norte, mesma localidade da Fazenda 3, encontraram também isolados com alta taxa de virulência, chegando a 6 cm de lesão dez dias após a inoculação. Estes resultados demonstram possivelmente uma carga genética de alta virulência dos isolados destas áreas, necessitando de maiores cuidados e de rígidas práticas de manejo deste fungo.

Dentre os isolados obtidos, dez foram provenientes de cinco diferentes plantas, sendo isolados tanto dos frutos quanto das folhas. Destes, os isolados 15, 16 (planta 13) e 24, 25 (planta 20), de fruto e folha, respectivamente, foram mais virulentos os isolados obtidos de frutos (isolados 15 e 24), mostrando a seletividade não só de variedade da fruta como também do tecido vegetal. Os demais isolados (4, 5; 10, 11 e 18, 19) foram pouco virulentos, não apresentando diferença significativa na virulência.

Apesar dos iniciadores RAPD e ISSR se mostrarem eficientes em acessar a diversidade genética dos isolados, não foi possível correlacionar os agrupamentos obtidos na similaridade genética com os níveis de patogenicidade, de maneira que alguns grupos tiveram tanto indivíduos patogênicos quanto não patogênicos. Estes resultados podem estar relacionados à hipótese relatada por Gordon; Martyn (1997), segundo a qual isolados patogênicos podem ter se originado de populações não patogênicas pré-existentes ou da perda de patogenicidade destes isolados. Outra justificativa está relacionada às regiões do genoma de atuação dos iniciadores RAPD e ISSR utilizados. Como as características de patogenicidade podem ter o envolvimento de diversos genes, os iniciadores utilizados podem não ter sido capazes de acessar estes genes, podendo não distinguir entre isolados patogênicos e não patogênicos. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins (2005), que não identificou correlação da variabilidade genética com a virulência de isolados de *Fusarium* ssp.

Nossos achados revelam grande diversidade de espécies do complexo *C. gloeosporioides* presentes em áreas produtoras do Rio Grande do Norte, Brasil. Conseqüentemente, pesquisas extensivas sobre a caracterização de espécies de *Colletotrichum*, além de avaliações patogênicas podem possibilitar maior conhecimento sobre a atuação e carga genética da virulência em regiões de importância.



## REFERÊNCIAS

- AGROESTAT/MAPA. **Estatística de exportações de frutas em 2019**. 2019. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2020/01/28/8825/>>. Acesso em: 02 mar. 2020.
- ABADIO, A. K. et al. Genetic diversity analysis of isolates of the fungal bean pathogen *Pseudocercospora griseola* from central and southern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Viçosa, Brasil, v. 11, p. 1272–1279, 2012.
- ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, cidade, v. 87, p. 979–987, 1997.
- AFANADOR-KAFURI, L., MINZ, D., MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, v. 93, p. 579-587, 2003.
- ALAHAKOON, P. W.; BROWN, A. E.; SREENIVAPRASAD, S. Cross infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Belfast, U.K, v. 44, p. 93–103, 1994.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização Morfo-cultural e Molecular de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Patogênicos ao Mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Pelotas, Brasil v. 32, n. 1, p. 21–31, 2007.
- ANUÁRIA BRASILEIRO DE HORTI E FRUTI. Acertando o compasso. **Editora Gazeta**, p. 72. Santa Cruz do Sul, 2019. Disponível em: <[http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/07/HortiFruti\\_2019\\_DUPLA.pdf](http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/07/HortiFruti_2019_DUPLA.pdf)>. Acesso em: 02 dez. 2019.
- ARIF, M.; ZAIDI, N. W.; SINGH, Y. P.; RIZWANUL-HAQ, Q. M.; SINGH, U. S. A Comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*). **Plant Mol Biol Rep.**, Uttarakhand, India, v. 27, p. 488–95, 2009.
- BAILEY, J. A.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology control. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992.
- BONETT, L. P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R. G. A.; AQUINO, F. A. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência**, Guarapuava, v. 6, n. 3, p. 451-463, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva de frutas**. 2015. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/x\\_files/Documentos/Cadeia\\_Produtiva\\_de\\_Frutas\\_S%C3%A9rie\\_Agroneg%C3%B3cios\\_MAPA.pdf](http://www.ibraf.org.br/x_files/Documentos/Cadeia_Produtiva_de_Frutas_S%C3%A9rie_Agroneg%C3%B3cios_MAPA.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- 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. (org.). **Colletotrichum host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, 2000. p. 1-20.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Baltimore, v. 24, p. 270-276, 1939.
- CHENG, W. et al. **A comparative study of mango solar drying methods by visible and near infrared spectroscopy coupled with ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA)**, Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie, Copenhagen, v. 112, p. 108-214, 2019.

- CULLEN, D. W.; LEES, A. K.; TOTH, I. K.; DUNCAN, J. M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 281-292, 2002.
- DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 1-36, 2012.
- DAMM, U. et al. *Colletotrichum*: complex species or species complex? **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1–36, 2012.
- FAN, J. Y. et al. Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (fungi, Ascomycota, Heliotales) from China. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Beijing, China, v. 57, p. 206–212, 2010.
- FAO. Organização das **Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. FAOSTAT: Divisão de estatística. Produção de safras. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 06 jan. 2020.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.
- GOMES, S.; MARTINS-LOPES, P.; LOPES, J.; GUEDES-PINTO, H. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. **Plant Mol Biol Rep.**, Vila Real, Portugal, v. 27, p. 365–73, 2009.
- GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Reviews Phytopathology**, California, USA, v. 35, p. 111-28, 1997
- HERNÁNDEZ-DELGADO, P. M. et al. Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale. **Sci. Hortic.**, cidade, v. 130, p. 536–540, 2011.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Brasil, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- LIMA, N. B. et al. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal Plant Pathology**, Recife, Brasil, v. 141, p. 679-688, 2015.
- LIMA NETO, F.P., SANTOS, C.A.F., & COSTA, J.G. Cultivo da mangueira: Cultivares. **Resource document**. Embrapa. v.2, 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/884451/1/CultivodaMangueira.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- LIU, N. G., et al. Perspectives into the value of genera, families and orders in classification. **Mycosphere**, Guiyang, China, v. 7, p. 1649–1668, 2016.
- MARQUES, V. V. **Patogenicidade e Variabilidade Genética de *Colletotrichum* spp. Em Cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de fusarium spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MCDONALD BA, LINDA C. Genética populacional de patógenos, potencial evolutivo e resistência duradoura. **Annu Rev Phytopathol.**, cidade, v. 40, p. 349-379, 2002.

- MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2. Ed. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2004.
- MILGROOM M.G. Recombinação e estrutura multiloco de populações de fungos. **Annu Rev Phytopathol.**, v. 34, p. 457–477, 1996.
- MILLS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Belfas, U.K., v. 98, p. 137–143, 1992.
- PERUMAL A. B.; SELLAMUTHU P. S.; NAMBIAR R. B.; SADIKU, E. R. Anti-fungal activity of five different essential oils in vapour phase for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae* in vitro and on mango. **J. Int. Food Sci Technol.**, Lynnwoodridge, Republic of South Africa, n. 51, p. 411–418, 2016.
- PRITTESH, P. B. K. et al. Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went accessions based on RAPD and ISSR markers. **Journal of genetic Engineering and Biotechnology**, Gujarat, India, v. 16, n. 1, p. 153-159, 2018.
- RATANACHERDCHAI, K., WANG, H. K., LIN, F. C.; SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. **Afri. J. Microbiol. Res.**, Bangkok, Thailand, v. 4, p. 76-83, 2010.
- RITCHIE, B.; CANNON, P. *Colletotrichum* in: plant health diagnostics, introduction to fungi. **CABI BIOSCIENCE 2003**, CAB International, Wallingford, 2003.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: taxonomia numérica e sistema de análise multivariada, versão 2.1**. Exeter Software, Setauket, Nova Iorque. 1998.
- SANTO, D.; GRAÇA. A.; NUNES. C.; QUINTAS. C.: *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii* in ‘Tommy Atkins’ minimally processed mangos: Survival, growth and effect of UV-C and electrolyzed water. **Food Microbiology**, Faro, Portugal., v. 70, p. 49-54, 2018.
- SILVEIRA et al. Caracterização molecular de isolados de *colletotrichum* spp. Associados a podridão floral dos citros. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 38, n. 1, p. 64-71, 2016.
- SNADERS, G. M.; KORSTEN, L. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, Pretoria, South Africa, v. 158, p. 143–150, 2003.
- STRACIERI, J. **Caracterização morfo-cultural e molecular de *Colletotrichum* spp. Associados a antracnose em manga, mamão e goiaba**. 2015. 127f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (org.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, 1992. p. 1-26.
- TANYA P, TAEPRAYOON P, HADKAM Y, SRINIVES P. Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. **Plant Mol Biol Rep.**, Pathom, Thailan, v. 29, p. 252–264, 2011.
- TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; VIANA, F. M. P.; SARAIVA, A. C. M. **Estratégias de Controle de Podridões em Pós-Colheita de Melão: uma Revisão**. Documentos 112, Embrapa, 2008.

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.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 115–180, 2012.

WHITELAW-WECKERT, M. A.; CURTIN, S. J.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; BLANCHARD, C. L.; ROFFEY, P. E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. **Plant Pathology**, Wagga Wagga, Australia, v. 56, p. 448-463. 2007.

### CAPÍTULO III

#### **ATIVIDADE *in vitro* E *in vivo* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Zingiber officinale* E *Croton lechleri* CONTRA *Colletotrichum gloeosporioides* ISOLADOS DE MANGUEIRA**

#### **RESUMO**

A antracnose, causada pelos fungos do gênero *Colletotrichum*, é uma doença principalmente de pós-colheita em diversas fruteiras, causando grandes prejuízos na produção de mangas. Essa doença é de extrema importância, ocorrendo em todas as áreas de produção desse frutífera em todo o mundo. Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização de óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale*) e de sangue de dragão (*Croton lechleri*) como método alternativo para o manejo da antracnose da mangueira, em condições *in vitro* e *in vivo*. Para o teste *in vitro*, três isolados mais patogênicos foram utilizados na avaliação de inibição com os óleos de gengibre, sangue de dragão e a combinação de ambos nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% em placas de Petri. Os mesmos tratamentos foram utilizados para o teste *in vivo*. Após a introdução de discos miceliais em frutos de manga, as diferentes concentrações de óleos foram espalhadas na superfície inoculada e mantida por sete dias após a avaliação. Nos testes *in vitro*, houve diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que a maior inibição média foi de 28,5% na combinação de 0,3% de gengibre mais 0,3% de sangue de dragão. Para os testes *in vivo*, todos os tratamentos se mostraram altamente eficazes em manga Tommy, apresentando 100% de inibição do crescimento fúngico no fruto. Com base nos resultados, os óleos de gengibre, sangue de dragão e suas combinações se mostraram eficientes para estudos desses óleos no aumento da qualidade pós-colheita do fruto para longos períodos de exportação.

**Palavras-chave:** Antracnose. Inibição. Gengibre. Sangue de Dragão.

## ABSTRACT

Anthracnose, caused by fungi from genre *Colletotrichum*, is a disease especially of post-harvest in many fruitful trees, causing big losses in the mango production. This disease is extremely importante, occurring in all the areas of this fruitful tree around the world. This study aimed to evaluate the use of essencial oils of ginger (*Zingiber officinale*) and dragon blood (*Croton lechleri*) as an alternative method for the management of anthracnose in mango tree, in conditions *in vitro* and *in vivo*. For the *in vitro* test, three isolates more pathogenic were used in the assessment of inhibition with ginger, dragon blood oils and the combinations of both in the concentrations of 0.2; 0.4; 0.6 in petri dish. The same treatments were used for *in vivo* test. After the introduction of mycelial discs in mango fruit, different concentrations of oil were spread in the surface inoculated and maintained durign seven days after the assessment. In *in vitro* tests, there were significant differences, being the greatest average inhibition of 28.5% in the combination involving 0.3% of ginger and 0.3% of blood dragon. For *in vitro* tests, all the treatments were highly effective in mango Tommy, presenting 100% of inhibition of fungi growthing in the fruit. Based on the results, the oils of ginger, blood dragon and their combinations were eficiente for studies about these oils over the increasing post-harvest fruit quality for long exportation periods.

**Keywords:** Anthracnose. Inhibition. Ginger. Blood dragon.

## 1. INTRODUÇÃO

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é destacada como uma das principais frutíferas cultivadas em todo o mundo. Isso se deve à grande apreciação da população pelo seu sabor e valor nutricional (SHARMA; RAO, 2017). Ela é adaptada a diversos climas sendo mais cultivadas em regiões tropicais e subtropicais com alta umidade relativa (LEVIN et al. 2018). A maior produção desse fruto, no Brasil, está concentrada na região nordeste, sendo o estado do Rio Grande do Norte um dos maiores polos de produção dessa região (IBGE, 2018).

Dentre as diversas patologias associadas a cultura da manga estão as doenças fúngicas. A antracnose se destaca como uma das patologias mais devastadoras no mundo (CANNON et al., 2012) e a mais comum para frutíferas (HE et al., 2017). É causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, de grande diversidade genética entre suas espécies (CAI et al., 2009) e nichos de vida variados (DE SILVA et al., 2017). Dentre os principais sintomas, nos hospedeiros, estão a queima das flores, as manchas das folhas e a podridão dos frutos (ARAUZ, 2000).

Os métodos para o controle da antracnose em manga consistem na utilização de fungicidas com princípio ativo, como Azoxistrobina, Difenconazol Mancozebe, dentre outros. Com isso, é grande a demanda e aplicação de produtos químicos (SERRANO, 2005). Entretanto, sua utilização causa danos ao meio ambiente, sendo até irreversíveis no solo (HAYES, 1991), podendo até causar resistência dos fungos com base em processos seletivos artificiais (GOTOR-VILA et al., 2017). Diante disto, a busca pelo controle alternativo aos fungicidas tem se intensificado nos meios científicos para o combate de fitopatógenos, principalmente para a redução de perdas de frutos pós-colheita (ZHANG et al., 2017).

Uma alternativa de controle seria o uso de produtos naturais como óleos essenciais, confiáveis e ecologicamente seguros. Devido à grande comprovação de propriedades importantes, essas substâncias têm sido bastante estudadas para os mais diversos patógenos causadores de enfermidades em plantas (SILVA et al., 2012; JUNIOR et al., 2009).

Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização de óleos essenciais de gengibre e de sangue de dragão como método alternativo de controle contra a antracnose em manga em condições *in vitro* e *in vivo*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Isolados fúngicos

Foram utilizados três isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de manga coletados em áreas produtoras do estado do Rio Grande do Norte no Brasil.

### 2.2 Teste de inibição com óleos essenciais

#### 2.2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Óleos essenciais naturais puros de *Z. officinale* (Gengibre) e *C. lechleri* (Sangue de dragão) das marcas BioEssência e Terraflor aromaterapia, respectivamente, foram obtidos comercialmente, sendo armazenados a 4°C até o uso.

#### 2.2.2 Teste *in vitro*

Placas de Petri de 9 cm de diâmetro foram utilizadas contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar) com diferentes concentrações de óleos essenciais de *Z. officinale* e *C. lechleri*, sendo 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8% de ambos os óleos e também em associação 0,1% + 0,1% (0,2%), 0,2% + 0,2% (0,4%), 0,3% + 0,3% (0,6%) e 0,4% + 0,4% (0,8%). No controle, foi usada água destilada esterilizada. Foi realizado um tratamento utilizado o fungicida com princípio ativo mancozeb (100g/L), totalizando 14 tratamentos. Após a polimerização do meio, discos de 5 cm de três isolados patogênicos de *C. gloeosporioides* (isolados 24, 21 e 20) foram colocados no centro das placas para a avaliação de inibição. As placas foram incubadas no escuro a uma temperatura de 25°C até que o controle, sem a presença de óleo, atingisse as bordas da placa. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento, sendo a unidade experimental equivalente a uma placa de Petri.

#### 2.2.3 Teste *in vivo*

Frutos de manga da cultivar Tommy Atkins foram tratados com diferentes concentrações de óleos essenciais contra *C. gloeosporioides* para avaliações *in vivo*. Os frutos foram previamente lavados em água corrente, desinfestados em hipoclorito de sódio 1,5% por dois minutos e lavados em água destilada autoclavada. Em seguida, foram realizadas três perfurações de 7 mm, com o auxílio de furador metálico estéril na epiderme de cada fruto. Para



cada isolado, discos contendo estruturas fúngicas de 5 mm de diâmetro foram previamente removidos de bordas de culturas crescidas em meio BDA por sete dias de crescimento e transferidos para cada ponto das perfurações do fruto. Após a adição dos isolados, solução dos óleos essenciais foi espalhada na superfície inoculada e secas em temperatura ambiente. Foram utilizados os mesmos tratamentos do teste *in vitro*. O grupo controle consistiu de frutos com o isolado, mas sem o uso dos óleos. Foram utilizados também tratamentos contendo fungicida mancozeb. Os frutos foram colocados em bandejas plásticas (desinfestadas com álcool 70%), contendo algodão umedecido com água destilada esterilizada, sendo posteriormente cobertos com papel filme para a manutenção da umidade nos frutos. As bandejas com os frutos foram mantidas em temperatura ambiente ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) em fotoperíodo natural. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, sendo a unidade experimental equivalente a uma perfuração. A avaliação foi realizada no 7º dia após a inoculação, sendo medido o diâmetro da lesão.

### **2.3 Análise estatística**

Os dados observados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), tendo suas médias comparadas pelo teste de t (LSD) a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* estatístico Sisvar versão 5.7 (Build 91).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Teste de inibição *in vitro*

Os óleos testados reduziram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) o crescimento micelial *in vitro* dos três isolados fúngicos testados em comparação ao controle (Tabela 1). Na concentração de 0,8%, o óleo de gengibre apresenta maior efeito sobre a inibição média dos isolados (27,4%) para esse óleo. O sangue de dragão a 0,2% propiciou maior inibição, com média de 19,2% sobre os isolados. Por sua vez, a combinação dos dois óleos (0,3% de gengibre e 0,3% de sangue de dragão) teve sua maior taxa de inibição média de 28,5%.

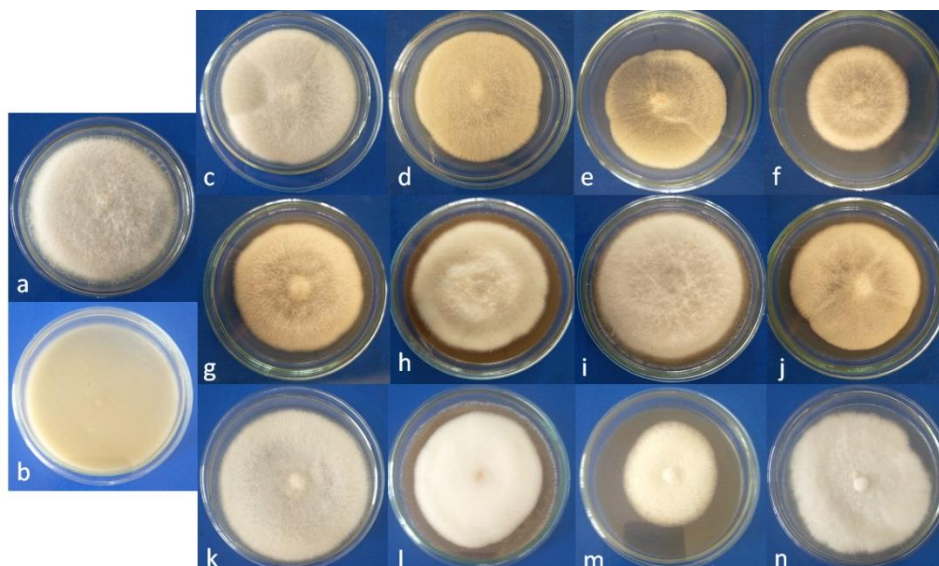
**Tabela 1** - Efeitos dos óleos de gengibre e sangue de dragão no desenvolvimento *in vitro* de três isolados de *C. gloeosporioides*.

Tratamento	Isolado 24		Isolado 21		Isolado 20		Inibição média (%)
	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	
G 0,2%	7,9 ef	12,3	8,2 d	8,9	8,1 de	10,0	10,4
G 0,4%	7,3 cde	18,9	8,2 d	8,9	7,8 cd	13,3	13,7
G 0,6%	6,3 ab	30,0	7,4 c	17,8	7,7 bcd	14,4	20,7
G 0,8%	6,1 a	32,2	7,2 bc	20,0	6,3 a	30,0	27,4
S 0,2%	7,0 cd	22,2	6,9 b	23,3	7,9 cd	12,2	19,2
S 0,4%	6,2 a	31,1	8,3 d	7,8	8,3 e	7,8	15,6
S 0,6%	8,0 f	11,1	8,2 d	8,9	9,0 f	0,0	6,7
S 0,8%	7,5 de	16,7	8,5 d	5,6	7,5 bc	16,7	13
G 0,1% + S 0,1%	7,3 cde	18,9	8,0 d	11,1	9,0 f	0,0	10
G 0,2% + S 0,2%	6,9 bcd	23,3	8,2 d	8,9	7,5 bc	16,7	16,3
G 0,3% + S 0,3%	6,7 abc	25,6	6,4 a	28,9	6,2 a	31,1	28,5
G 0,4% + S 0,4%	6,7 abc	25,6	6,8 ab	24,4	7,3 b	18,9	22,9
Sem tratamento	9,0 g	0,0	9,0 e	0,0	9,0 f	0,0	0,0
Fungicida	0,0	100	0,0	100	0,0	100	100

Letras diferentes na mesma coluna difere significativamente ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste t (LSD). G – Gengibre. S – Sangue de dragão.

A porcentagem média de inibição entre os isolados variou de 6,7% (0,6% de sangue de dragão) a 28,5% (0,3% de gengibre + 0,3% de sangue de dragão). Houve divergência na resposta inibitória entre os três isolados avaliados. A combinação de 0,3% de óleos de gengibre e 0,3% de óleo de sangue de dragão possibilitou maior taxa de inibição nos isolados 21 (28,9%) e 20 (31,1%). O isolado 24 apresentou maior inibição (32,2%) com 0,8% de óleo de gengibre (Tabela 1). Todas as concentrações testadas proporcionaram inibições significativas em comparação ao controle, exceto quando analisados no isolado 20, dois tratamentos não foram significativos. Com exceção dos tratamentos somente com o óleo de gengibre, os demais obtiveram decaimento significativo em sua taxa de inibição com o aumento da concentração

dos óleos. O tratamento com fungicida químico com o princípio ativo mancozeb inibiu em 100% o crescimento micelial do *C. gloeosporioides*. A figura 1 mostra a variação de inibição encontrada no isolado 20.



**Figura 1** - Teste *in vitro* utilizando o isolado 20 de *C. gloeosporioides* nos tratamentos com os óleos essenciais. Controle com inoculo fúngico (a), Tratamento com fungicida (b), óleo essencial de gengibre nas concentrações 0,2% (c), 0,4% (d), 0,6% (e) e 0,8% (f), óleo essencial de sangue de dragão nas concentrações 0,2% (g), 0,4% (h), 0,6% (i) e 0,8% (j) e a combinação dos dois óleos 0,1% + 0,1% (k), 0,2% + 0,2% (l), 0,3% + 0,3% (m) e 0,4% + 0,4% (n).

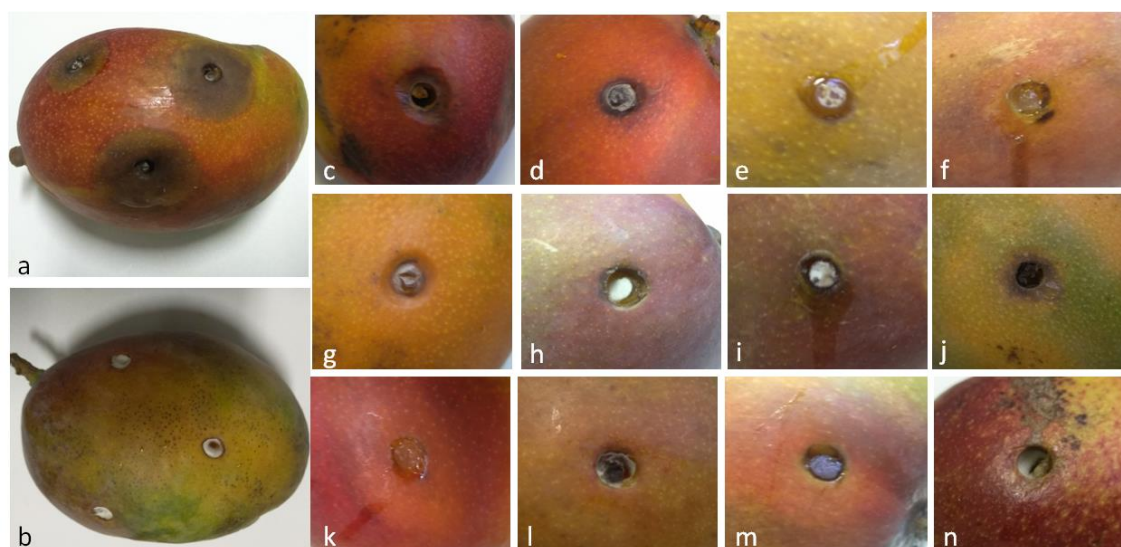
### 3.2 Teste de inibição *in vivo*

Todos as concentrações de óleos inibiram significativamente a severidade da doença. A maior taxa média de inibição de todos os isolados foi de 100% para as concentrações de gengibre a 0,8%, sangue de dragão a 0,6% e a combinação dos óleos em 0,1% e em 0,4% de cada um. No isolado 24, houve aumento na porcentagem de inibição, com o aumento da concentração todos os tratamentos testados, com exceção dos óleos de sangue de dragão que teve um decaimento significativo da taxa de inibição na concentração de 0,8%. Os frutos contendo o inóculo de *C. gloeosporioides* sem o tratamento com óleo apresentaram maior lesão, sendo estatisticamente superiores a todos os outros tratamentos. O tratamento com mancozeb inibiu 100% dos isolados de *C. gloeosporioides* nos frutos (Tabela 2; Figura 2).

**Tabela 2** - Efeito inibitório *in vivo* de óleo essencial de gengibre, sangue de dragão e a combinação de ambos no desenvolvimento da antracnose causada por três isolados de *C. gloeosporioides*, sete dias após a inoculação em frutos de manga da variedade Tommy.

Tratamentos	Isolado 24		Isolado 21		Isolado 20		Inibição média (%)
	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	Diâmetro (cm)	Inibição (%)	
G 0,2%	1,2 c	79,1	0,7 a	100	1,1 b	73,3	84,1
G 0,4%	0,9 ab	91,7	0,7 a	100	1,0 ab	80	90,6
G 0,6%	0,7 a	100	0,7 a	100	0,8 ab	93,3	97,8
G 0,8%	0,7 a	100	0,7 a	100	0,7 a	100	100
S 0,2%	0,92 ab	90,9	0,7 a	100	0,7 a	100	96,7
S 0,4%	0,8 a	95,5	1,1 b	73,3	0,7 a	100	89,6
S 0,6%	0,7 a	100	0,7 a	100	0,7 a	100	100
S 0,8%	1,1 bc	83,3	1 ab	80	1,0 ab	86,7	83,3
G 0,1% + S 0,1%	0,7 a	100	0,7 a	100	0,7 a	100	100
G 0,2% + S 0,2%	0,85 ab	93,7	0,7 a	100	0,7 a	100	97,9
G 0,3% + S 0,3%	0,7 a	100	0,8 a	93,3	0,7 a	100	97,8
G 0,4% + S 0,4%	0,7 a	100	0,7 a	100	0,7 a	100	100
Controle sem tratamento	3,1 d	0	2,2 c	0	2,2 c	0	0
Fungicida	0,7a	100	0,7 a	100	0,7 a	100	100

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) nos tratamentos de acordo com o teste t. G: Gengibre, S: Sangue de Dragão.



**Figura 2** - Lesões causadas pelo isolado 24 de *C. gloeosporioides* nos tratamentos com os óleos essenciais. Controle sem tratamento (a), Tratamento com fungicida (b), óleo essencial de gengibre nas concentrações 0,2% (c), 0,4% (d), 0,6% (e) e 0,8% (f), óleo essencial de sangue de dragão nas concentrações 0,2% (g), 0,4% (h), 0,6% (i) e 0,8% (j) e a combinação dos dois óleos 0,1% + 0,1% (k), 0,2% + 0,2% (l), 0,3% + 0,3% (m) e 0,4% + 0,4% (n).

#### 4. DISCUSSÃO

Vários estudos relatam a grande propriedade fungicida de óleos essenciais contra doenças pós-colheita de frutas e legumes (WILSON et al., 1997; IMELOUAN et al., 2009). Foi avaliada a capacidade de dois óleos essenciais e sua combinação na inibição do crescimento de *C. gloeosporioides*. O óleo de gengibre foi mais eficaz com o aumento da concentração, chegando à inibição média de 27,4% na concentração de 0,8%. Abd-Alla (2013), utilizando óleos de laranja, limão, mostarda e manjerição obteve inibição gradativa com o aumento da concentração dos óleos utilizados tanto em testes *in vitro* quanto nos *in vivo* contra *C. gloeosporioides* em manga. Os resultados obtidos no presente estudo são superiores aos encontrados por Oliveira et al. (2019), que, avaliando *in vitro* a atividade antifúngica do óleo de gengibre contra *Colletotrichum*, identificaram uma inibição de apenas 17% quando utilizaram 1% do óleo. Entretanto, Marinelli et al. (2012) obtiveram inibição de 100% de *C. gloeosporioides* quando utilizaram apenas 0,05% de óleo de gengibre em testes *in vitro*. Ramos (2016) utilizou 50% desse óleo para uma inibição completa *in vitro*. Essa grande divergência na atuação do óleo essencial de gengibre se deve à alta variedade de composição presentes nos óleos utilizados (MACHADO et al., 2003; DABAGUE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019). A alta capacidade desse óleo é justificada pela composição química do gengibre, com a aliicina, inulina, o gingerol e o shorgaol, conferindo alto potencial contra vários fitopatógenos (CARVALHO et al., 2008; LORENZI; MATOS, 2002).

O óleo de sangue de dragão causou maior porcentagem de inibição quando utilizado na concentração de 0,2% do óleo. Vários autores já utilizam o látex e extratos desta planta no combate a diversos patógenos. Santos (2015), estudando a atividade leishmanicida do látex de *Croton lechleri*, obteve inibição de 61% do crescimento com 0,6% do extrato. Franco et al. (2013), estudando o uso de extratos vegetais em atividade antifúngica contra *Leucoagaricus gongylophorus*, observaram que o de *Croton urucurana* se mostrou mais eficiente em inibição do crescimento *in vitro*. Contudo, nos resultados obtidos o aumento da concentração desse óleo teve efeito contrário ao de inibição. Resultados semelhantes foram encontrados por Guimarães et al. (2016), utilizando combinação de cera de carnaúba com óleos essenciais em frutos de manga Palmer contra antracnose verificaram a inibição de 63,7% da lesão do fungo com 100 ppm de óleo de tomilho. Entretanto, quando avaliado em concentrações maiores (250, 500 ppm), obtiveram diminuição dessa inibição para 29,31 e 25,74%, respectivamente. Estes autores obtiveram resultados semelhantes entre as concentrações de 1500 ppm e 3000 ppm de óleo de eucalipto.

Na combinação dos dois óleos, houve maior taxa de inibição média (28,5%) em concentrações de 0,3% de gengibre mais 0,3% de sangue de dragão. Este resultado pode estar relacionado à maior eficácia da associação de substâncias presentes nos dois óleos em atuar mais efetivamente na inibição desse fitopatógeno.

Todas as concentrações dos óleos se mostraram estatisticamente eficientes na inibição de *C. gloeosporioides* em frutos de manga. Asgar et al. (2016), avaliando a eficiência do óleo de gengibre a 2,0% no controle de qualidade de frutos de mamão durante o armazenamento refrigerado, identificaram a inibição de germinação de 93% dos conídios de *C. gloeosporioides*. Alves (2008), testando efeito de extrato aquoso de gengibre contra *C. gloeosporioides*, identificou variação de inibição de 48,1 a 91,1%, indicando a existência de variabilidade entre os isolados, demonstrando, assim, diferenciação de inibição pelo isolado utilizado.

No teste *in vitro*, apesar das análises dos tratamentos possibilitarem diferença significativa de inibição em relação ao controle, nenhum tratamento inibiu taxa micelial superior a 35%. Entretanto, no teste *in vivo*, a taxa de inibição média dos isolados não foi inferior a 75%. Segundo Rodrigues et al. (2002), alguns óleos essenciais não possuem agentes inibidores diretos, não possuindo efeito fungitóxico ou fungicida, sendo seu efeito observado diretamente na inibição do crescimento do patógeno no fruto, agindo como retardante do aparecimento dos sintomas da virulência. Com isso, os resultados encontrados no trabalho podem ser explicados pela baixa ação dos óleos de gengibre, sangue de dragão e sua combinação em inibir o crescimento do fungo *in vitro* pela inferior ação fúngica, porém testes *in vivo* comprovaram possível ação de indução de resistência no fruto para o controle da doença.

Sousa et al. (2012), avaliando o efeito de 10 óleos essenciais *in vitro* e *in vivo* sobre *C. gloeosporioides* em pimenta, identificaram taxa de inibição de apenas 6,2% de óleo de sementes de uva em testes *in vitro* e de 100% de inibição em teste *in vivo* e ainda obtiveram as características fisiológicas inalteradas mesmo após 12 dias de inoculação no fruto. Eles justificaram esses resultados com base no fato de que este óleo ativa mecanismos de resistência em frutos de pimenta.

Esses resultados estão de acordo com outros autores em que a utilização de óleos essenciais diminuiu a deterioração pós-colheita em diversas fruteiras, como pimenta (HONG et al., 2015), banana (VILAPLANA et al., 2018), morangos (CAMPOS-REGUENA et al., 2017). Segundo Ben-Jabeur (2015), esses resultados estão possivelmente relacionados ao estresse ocasionado por substâncias presentes nos óleos essenciais, o que estimula a produção de compostos fenólicos e peroxidases que atuarão na defesa do fitopatógeno. De acordo com Ramezani (2016), a alta taxa de compostos fenólicos em vegetais inibe o crescimento de

*Alternaria citri*, agente causador de doenças em laranja, diminuindo a severidade da decomposição da fruta. Nychas (1995) relata que compostos fenólicos interrompem e danificam as cascatas de enzimas na produção de energia microbiana.

Os resultados desse estudo demonstram efeitos positivos nos parâmetros qualitativos do fruto da manga, inibindo consideravelmente o crescimento micelial do fungo em testes *in vitro* e com alta taxa de inibição em testes *in vivo*. Contudo, estudos posteriores devem ser realizados visando à identificação das substâncias de antagonismo para melhor compreensão das atividades inibitórias dos respectivos óleos.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. A. et al. Use of Some Plant Essential Oils as Post-harvest Botanical Fungicides in the Management of Anthracnose Disease of Mango Fruits (*Mangifera indica* L.) Caused by *Colletotrichum Gloeosporioides* (Penz). **International Journal of Agriculture and Forestry**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2013.
- ALVES, K. F. **Controle alternativo da antracnose do pimentão com extratos vegetais**. 2008. 47f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- ARAUZ, L.F. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. **Plant Dis.**, v. 84, p. 600-611, 2000.
- ASGAR, A.; HEY, G. K.; KEAT, Y. W. Efficacy of ginger oil and extract combined with gum arabic on anthracnose and quality of papaya fruit during cold storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2016.
- BEN-JABEUR, M.; GHABRI, E.; MYRIAM, M.; HAMADA, W. Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. **Plant Physiology and Biochemistry**, Le Kef, Tunisia, v. 94, p. 35–40, 2015.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Beijing, China, v. 39, p. 183–204, 2009.
- CARVALHO, R. A. et al. **Extratos de plantas medicinais como estratégias para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste**. Disponível em: <<http://www.emepa.org.br/anais/volume1/av107.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2020.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – Current status and future directions. **Studies in Mycology**, Auckland, New Zealand, v. 73, p. 181–213, 2012.
- CAMPOS-REGUENA, V. H. et al. Thermoplastic starch/clay nanocomposites loaded with essential oil constituents as packaging for strawberries in vitro antimicrobial synergy over *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 129, p. 29–36, 2017.
- DABAGUE, I. C. M.; DESCHAMPS, C.; MÓGOR, A. F.; SCHEER, A. P.; CÔCCO, L. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Curitiba-Brasil, v. 13, n. 1, p. 79–84, 2011.
- DE SILVA, D.; CROUS, P.; ADES, P.; HYDE, K.; TAYLOR, P. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, VIC, Australia, v. 31, p. 155–168, 2017.
- FRANCO, A. A. et al. Ação de Extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos simbiotes das formigas cortadeiras. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 10, n. 1, p. 103-113, 2013.
- GOTOR-VILA, A. et al. Formulation of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. **Biocontrol**, Lleida, Spain, v. 62, p. 45–555, 2017.
- GOULD G. W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of food protection**, v. 45, p. 82-85, 1995.



- GUIMARÃES, J. E. R. **Produtos naturais no controle da antracnose e na qualidade pós-colheita de mangas ‘Palmer’**. 2016. 123f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2016.
- HAYES, W. J.; LAWS, E. R. Handbook of pesticides Toxicology. **Academic Press**, New York, USA, v. 1, p. 55–56, 1991.
- HE, J. et al. Defense responses of salicylic acid in mango fruit against postharvest anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and its possible mechanism. **J Food Saf**, Guiyang, China, v. 37, p. 1–10, 2017.
- HONG, J. K., et al. Application of volatile antifungal plantessential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology Journal**, Jeju, Korea, v. 31, n. 3, p. 269–277, 2015.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola. Brasil**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acessado em 20 jan. 2020.
- IMELOUAN E, B. A. et al. Physicochemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata*. **Int. J. Agric. Biol.**, Zaio, Morocco, v. 11, p. 113–118, 2009.
- JUNIOR, I. T. S.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, Pelotas, Brasil, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.
- LEVIN, A. G.; PERES, M.; NOY, M.; LOVE, C.; GAL, Y.; NAOR, A. The response of field-grown mango (cv. Keitt) trees to regulated deficit irrigation at three phenological stages. **Irrig. Sci.**, Kiryat’shmona, Israel, v. 36, p. 25–35, 2018.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- MACHADO, G. C. et al. Composição química de amostras de gengibre (*Zingiber officinale*) de cultivo convencional e orgânico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Maringá. **Anais...**Curitiba: Universidade Federal do Paraná, v. 26. 2003
- MARINELLI, E. et al. Activity of Some Essential Oils against Pathogenic Seed Borne Fungi on Legumes. **Asian Journal of Plant Pathology**, v. 6, p. 66-74, 2012.
- OLIVEIRA S. S. et al. Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Colletotrichum theobromicola*, causador da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*). **Scientia Naturalis, Rio Branco - Acre**, v. 1, n. 1, p. 32-40, 2019.
- RAMEZANIAN, A.; AZADI, M.; MOSTOWIZADEH-GHALAMFARSA, R.; SAHARKHIZ, M. J. Effect of *Zataria multiflora* Bioss and *Thymus vulgaris* L. essential oils on black rot of Washington navel orange fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Shiraz, Iran, v. 112, p. 152–158, 2016.
- RAMOS, K.; ANDREANI JUNIOR, R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 605-612, 2016.
- RODRIGUES, J. C. V.; CHILDERS, C. C. Óleos no manejo de pragas e doenças em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 77-100, 2002.

- SANTOS, A. P. A et al. Efeito leishmanicida in vitro do látex de *Croton lechleri* (Euphorbiaceae). **Revista de Ciências farmacêuticas Básica e Aplicada**, Porto Velho, Brasil., n. 36, v. 3, p. 413-418, 2015.
- SERRANO, M. D. et al. The use of the natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Alicante, Spain, v. 6, p. 115–123, 2005.
- SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSOA, J. O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde**, Dourados, Brasil v. 7, n. 1, p. 18-23, 2012.
- SOUSA, R. M. S; SERRA, I. M. R. S; MELO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, São Luís, Brasil, v. 38, n. 1, p. 42-47, 2012.
- SHARMA, S.; RAO, T. V. R. Responses of fresh-cut products of four mango cultivars under two different storage conditions. **J. Food Sci. Technol.**, Gujarat, India, v. 54, p. 1689-1702, 2017.
- VILAPLANA, R.; PAZMINO, L.; VALENCIA-CHAMORRO, S. Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. **Postharvest Biology and Technology**, Quito, Ecuador, v. 138, p. 56–63, 2018.
- WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Dis.**, St. Paul, USA, v. 81, p. 204-210, 1997.
- ZHANG, H. et al. Augmentation of biocontrol agents with physical methods against postharvest diseases of fruits and vegetables. **Trends Food Sci. Technol.**, Jiangsu, China, v. 69, p. 36–45, 2017.