

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**

**Caracterização morfológica, atividade enzimática e processo  
inicial de colonização de *Colletotrichum guaranicola*  
patogênico e endofítico**

**MARCELY CRISTINY ANDRADE DA SILVA**

**MANAUS/AM**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**

**MARCELY CRISTINY ANDRADE DA SILVA**

**Caracterização morfológica, atividade enzimática e processo  
inicial de colonização de *Colletotrichum guaranicola*  
patogênico e endofítico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia Tropical, área de concentração Produção Vegetal.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Jânia Lilia da Silva Bentes

**MANAUS/AM**

**2016**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586c Silva, Marcelly Cristiny Andrade da  
Caracterização morfológica, atividade enzimática e processo inicial de colonização de *Colletotrichum guaranicola* patogênico e endofítico / Marcelly Cristiny Andrade da Silva. 2016  
133 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes  
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. colonização. 2. enzimática. 3. antracnose. 4. morfocultural. 5. molecular. I. Bentes, Jânia Lília da Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


MARCELY CRISTINY ANDRADE DA SILVA

**Caracterização morfológica, atividade enzimática e processo inicial de colonização de *Colletotrichum guaranicola* patogênico e endofítico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia Tropical, área de concentração Produção Vegetal.

Aprovado em 10 de março de 2016

**BANCA EXAMINADORA**



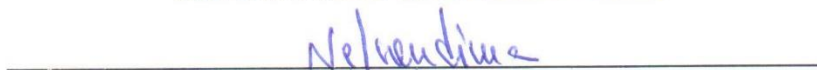
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jânia Lilia da Silva Bentes**

**Universidade Federal do Amazonas**



**Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos**

**Universidade de La Frontera - Chile**



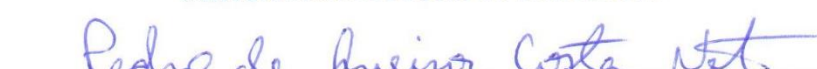
**Prof. Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima**

**Universidade do Minho - Portugal**



**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange de Mello Vêras**

**Universidade Federal do Amazonas**



**Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto**

**Universidade Federal do Amazonas**



***DEDICO***

*A Deus e meus guias pela sabedoria e paciência, e ao meu pai Paulo Andrade e minha mãe Elizabete Aguiar por todos os ensinamentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar ao meu lado durante toda a minha caminhada e aos meus guias espirituais que me guiam e me fortalecem a cada dificuldade que a vida me apresenta.

Aos meus pais, Elizabete Aguiar e Paulo Andrade, por sempre acreditarem em mim e me ajudarem em todos os momentos apesar da distância terrestre que muitas vezes atrapalhou nos momentos de saudade.

Aos meus avós paternos Pedro Paulo e Maria Deusa e aos meus avós maternos Maria Zilma e Adauto Aguiar, por serem muito mais que avós, serem um presente que Deus me deu, me concedendo o privilégio de sempre estar assistida em todos os momentos por eles.

A minha família, tios e primos, por serem o meu alicerce em todos os momentos, por se fazerem presentes apesar da distância e nunca terem me deixado sentir sozinha, por estar longe de casa.

Aos meus irmãos Paulo's, Kaio Renato e Anna Júlia, por serem a minha rota de fuga nos momentos difíceis e me alegrarem em todos os momentos.

Ao Kleyver Fagundes e Família, por serem a minha segunda família, e terem me acolhido em sua casa como um membro da família, me apoiando e ajudando em todos os momentos de dificuldades e compartilhando junto comigo os momentos de alegria.

A FAPEAM, pelo financiamento da pesquisa através da bolsa de estudo.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Jânia Lília da Silva Bentes pela paciência, orientação, e puxões de orelha que me ajudaram a crescer academicamente.

Aos professores, Dr. Cledir Santos e Dr. Nelson Lima pelas correções e sugestões apresentadas, as quais melhoraram substancialmente a qualidade do texto.

Aos professores, Dr. Pedro Queiroz, Dr. Magno Valente e Dra. Enedina Nogueira, pelo tempo colocado à minha disposição para ensinar e tirar dúvidas.

Ao secretário do programa, José Nascimento, pela preocupação em atender sempre de forma eficiente.

Aos meus amigos, Alex-Sandra Farias, Fabíola Almeida, Francely Thome, Eliezer Litaiff e Leilane, por serem muito mais que amigos, por estarem presente ao meu lado em dias de sol e principalmente em dias de chuva.

Aos meus amigos de pós-graduação, Aldilane, Anselmo, Isabel e Catiele, por me acompanharem durante essa jornada, me ajudando e apoiando durante toda a caminhada do doutorado.

Aos meus amigos da SEMMAS, em especial, Davi, Kelrye, Radduley, Rita, Willian e Regina, por mostrarem que podemos ter amigos em todas as situações da vida.

Ao Pai Henrique e toda a sua turma, por me guiarem e me fortalecerem em todos os momentos, me mostrando que nunca estou sozinha.

A equipe do Laboratório de Microbiologia e Fitopatogogia da UFAM, em especial, Francy Mary, Bruno, Geisa e Adriana, por me ajudarem e compartilharem bons momentos comigo durante essa minha caminhada.

A Maria (ADAF), por participar do meu dia a dia.

Ao atual Secretário de Meio Ambiente e Sustentabilidade – SEMMAS, Itamar de Oliveira, pelo apoio e ajuda nos momentos em que a ele recorri.

Aos integrantes do Laboratório de Anatomia Vegetal da FCA, em especial, ao Técnico Manoel, a Professora Sílvia, Professora Poliana e Joelma, por me assistirem nos momentos que precisei.

A Pós-Graduação de Microbiologia da UFLA e aos Doutores responsáveis pelos laboratórios de pesquisas, pelo momento em que estive lá e me ajudaram.

A cada uma das pessoas que se preocuparam, torceram e contribuíram para que eu conseguisse chegar ao fim dessa etapa, os meus sinceros agradecimentos.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estratégias de infecção desenvolvidas pelas espécies do gênero <i>Colletotrichum</i> . A) colonização intramural subcuticular; B) colonização intracelular. S - esporo; A – apressório; E: células epidérmicas; M: células do mesófilo; IV: vesículas de infecção; PH: hifa primária; SH: hifa secundária (necrotrófica). 1,2, 3 e 4, referem-se à sequência dos estados de desenvolvimento do patógeno no hospedeiro (adaptado de Perfect et al., 1999).....	19
<b>Figura 2.</b> Formato dos conídios avaliados: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redonda na outra; (4) reto, com constrição; (5) falcado, com ápices afilados. ....	44
<b>Figura 3.</b> Formatos dos apressórios: 1. Lobados; 2. Levemente lobados; 3. Arredondados. (Adaptado de Sutton, 1980; Cox e Irwin, 1988).....	44
<b>Figura 4.</b> Características culturais dos 8 grupos dos isolados estudados com 7 dias de cultivo. (1) micélio cinza no centro e branco ao redor da colônia; (2) micélio amarelo avermelhado, com formação de anéis de coloração cinza escuro; (3) micélio cinza oliva claro, com formação de anéis de coloração amarelo avermelhado (4) micélio marrom acinzentado no centro, com formação de anéis com coloração amarelo avermelhado; (5) micélio vermelho claro; (6) micélio coloração cinza escuro; (7) micélio de coloração cinza; (8) micélio de coloração branca. ....	50
<b>Figura 5.</b> Formato dos conídios (A) oblongo ou cilíndrico (B) constricto (C) clavado; e Formato dos apressórios (D) arredondado; (E) levemente lobado (F) lobado. ....	55
<b>Figura 6.</b> Dendograma construído pelo método UFGMA, usando o coeficiente de NEI & LI a partir dos perfis ISSR com iniciador GTG <sub>5</sub> , GACA <sub>4</sub> e M13 obtido de 26 isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. e 2 isolados de <i>Fusarium</i> spp. ....	63
<b>Figura 7.</b> Dendograma baseado em análises de espectrometria de massas MALDI-TOF dos isolados de <i>Colletotrichum guaranicola</i> patogênico e endofítico. ....	68
<b>Figura 8.</b> Resultados positivos das atividades enzimáticas com formação de halo de degradação das enzimas estudadas. ....	100
<b>Figura 9.</b> Germinação de conídio de <i>Colletotrichum guaranicola</i> patogênico e endofítico. ....	103
<b>Figura 10.</b> Formação de apressórios de <i>Colletotrichum guaranicola</i> endofítico e patogênico.....	104

<b>Figura 11.</b> Processo de colonização de <i>C. guaranicola</i> patogênico e endofítico em folhas suscetíveis de guaraná (clone 300) no período de 48 horas após a inoculação. A) Hifas (hi) do <i>C. guaranicola</i> patogênico colonizando os tecidos da planta hospedeira; B) Processo de infecção do isolado patogênico com presença de apressórios na superfície e hifas de penetração; C) e D) Apressórios na superfície da folha da planta hospedeira.	109
<b>Figura 12.</b> Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados <i>C. guaranicola</i> agrupados no grupo 1.	118
<b>Figura 13.</b> Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados <i>C. guaranicola</i> agrupados no grupo 2.	118
<b>Figura 14.</b> Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados <i>C. guaranicola</i> agrupados no grupo 3.	119
<b>Figura 15.</b> Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados <i>C. guaranicola</i> agrupados no grupo 4.	119
<b>Figura 16.</b> Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados <i>C. guaranicola</i> agrupados no grupo 5.	120

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação, procedência e classificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. .....	41
<b>Tabela 2.</b> Variabilidade cultural dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	58
<b>Tabela 3.</b> Características morfológicas dos isolados patogênicos, endofíticos e de referência. ....	61
<b>Tabela 4.</b> Isolados de <i>Colletotrichum guaranicola</i> usados nos testes enzimáticos. ....	86
<b>Tabela 5.</b> Atividade enzimática de isolados de <i>Colletotrichum guaranicola</i> por difusão em substratos sólidos específicos. ....	101
<b>Tabela 6.</b> Área lesionada (cm) em folhas de guaranazeiro inoculadas com discos de micélio contendo o patógeno <i>Colletotrichum guaranicola</i> . ....	102

# SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
OBJETIVO GERAL .....	4
OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	4
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
O HOSPEDEIRO <i>PAULLINIA CUPANA</i> VAR. <i>SORBILIS</i> .....	5
ANTRACNOSE DO GUARANAZEIRO .....	7
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E ENDOFÍTICOS .....	8
CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E GENOTIPAGEM.....	10
MALDI-TOF MS .....	14
ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	15
HISTOLOGIA DE <i>COLLETOTRICHUM</i> .....	17
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>32</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>33</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>35</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOSPÓRICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4. GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2. GENOTIPAGEM .....</b>	<b>62</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>80</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>81</b>

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>82</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>85</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>85</b>
<b>2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....</b>	<b>85</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>86</b>
<b>3.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE <i>COLLETOTRICHUM GUARANICOLA</i></b> <b>.....</b>	<b>86</b>
<b>3.2. PROCESSO DE INFECÇÃO DE <i>C. GUARANICOLA</i> ENDOFÍTICO E PATOGÊNICO.</b>	<b>91</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>4.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....</b>	<b>95</b>
<b>4.2. PROCESSO DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE <i>COLLETOTRICHUM</i></b> <b><i>GUARANICOLA</i> ENDOFÍTICO E PATOGÊNICO .....</b>	<b>102</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>110</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>118</b>

## RESUMO

*Paullinia cupana* (guaranazeiro), é uma planta tropical que se originou a partir da floresta da Amazônia brasileira. No entanto, a produção de guaraná tem vindo a diminuir no Estado do Amazonas, quando comparado com a produção do Estado da Bahia. O principal fator limitante da produção e expansão no Estado do Amazonas é a antracnose, causada por *Colletotrichum guaranicola*, que é considerada a doença mais grave da cultura do guaraná. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados de *C. guaranicola* patogênicos e endofíticos, provenientes de guaranazeiro, quanto aos aspectos culturais, morfológicos, molecular, enzimático e histológico, visando determinar diferenças entre o patogênico e o endofítico. Neste trabalho, nove isolados endofíticos e quatorze isolados patogênicos de *C. guaranicola* foram obtidos através do isolamento indireto de folhas de guaranazeiro sadias e com sintomas de antracnose. Os isolados foram caracterizados por meio das características morfológicas e culturais. A identificação molecular compreendeu a análise de PCR utilizando os primers GACA<sub>4</sub>, GTG<sub>5</sub> e M13. Quanto a atividade enzimática, foram testadas as seguintes enzimas: lipase, amilase, protease, polifenol-oxidase, celulase e pectinase. Foi realizado o teste de patogenicidade com a finalidade de selecionar um isolado patogênico e um isolado endofítico para análise do processo de pré-penetração e colonização do patógeno nos tecidos das folhas suscetíveis (clone 300) de guaranazeiro. Quanto à caracterização morfocultural, os isolados patogênicos e endofíticos apresentaram alta variabilidade. A coloração da colônia e tamanho dos conídios diferenciou entre os endofíticos e os patógenos. Não foi possível fazer uma correlação com as análises morfocultural e molecular com os isolados patogênicos e endofíticos. A genotipagem permitiu confirmar que todos os isolados pertencem ao gênero *Colletotrichum*, entretanto, não permitiu identificar os isolados a nível de espécie para o gênero. Não houve diferença

enzimática entre os endofíticos e patogênicos, não sendo possível encontrar correspondência com o processo de infecção nas folhas de guaranazeiro. O período de 48 horas após inoculação permitiu verificar 100% de germinação e formação de apressórios no isolado patogênico, além da colonização nos tecidos da planta, ao contrário do endofítico que apresentou porcentagens inferiores quanto a germinação e formação de apressórios, e não foi observado colonização dos tecidos 48 horas após inoculação.

**Palavras-chaves:** colonização; enzimática; antracnose; morfocultural; molecular.

## ABSTRACT

*Paullinia cupana* (guarana) is a tropical plant originated from the forest of the Brazilian Amazon. However, guarana production has been declining in the state of Amazonas, in comparison with the production of the State of Bahia. The main limiting factor of production and expansion in the state of Amazonas is anthracnose, caused by *Colletotrichum guaranicola*, which is considered the most serious disease of guarana culture. This study aimed to characterize the isolates of *C. guaranicola* pathogenic and endophytic, from guarana, considering cultural, morphological, molecular, enzymatic and histological aspects, in order to determine differences between pathogenic and endophytic. In the present work, 9 endophytic and 14 pathogenic isolated from *C. guaranicola* were obtained through indirect isolation of healthy leaves and guarana anthracnose symptoms. The isolates were characterized by morphological and cultural characteristics. The molecular identification involved PCR analysis using primers GACA4, GTG5 and M13. The enzyme activity, the following enzymes were tested: lipase, amylase, protease, polyphenoloxidase, cellulase and pectinase. The pathogenicity test was conducted in order to select one isolated pathogenic and one isolated endophytic for analysis of the pre-penetration process and colonization of the pathogen in the tissues of susceptible leaves (clone 300) of guarana. About the Morphocultura characterization, pathogenic and endophytic isolates presented great variability. The color of the colony and size of conidia differed between endophytes and pathogens. It was not possible to make a correlation with Morphocultural and molecular analysis with pathogenic and endophytic isolates. Genotyping confirmed that all isolates belong to the genus *Colletotrichum*, however, it was not possible to identify the isolated species level to the genre. There was no difference between the enzyme and endophytic pathogens, it is not possible to find correspondence with the infection process in guarana leaves. The



period of 48 hours after inoculation allowed to verify 100% germination and appressorium formation in the isolated pathogenic, in addition to colonization in tissues of the plant, by contrast to the endophyte which showed lower percentages for germination and formation of appressoria, and it was not observed colonizing tissues 48 hours after inoculation.

**Keywords:** colonization; enzyme; anthracnose; Morphocultural; molecular.

## INTRODUÇÃO GERAL

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Duke) é uma espécie arbustiva nativa da região Amazônica, que produz o fruto conhecido como guaraná, o Brasil é praticamente o único produtor comercial de guaraná do mundo, exceto para algumas áreas plantadas nas regiões da Venezuela e Amazônia peruana. Seu cultivo é de grande importância sócio-econômica para a região, movimentando vários setores da economia. A maior parte da produção brasileira de guaraná é consumida no mercado interno. Estima-se que pelo menos 70% do mercado nacional destina-se à fabricação de refrigerantes, enquanto o restante é comercializado sob a forma de xarope, pó, extrato e outros produtos nas indústrias farmacêutica e cosmética (KURI, 2008).

Um dos fatores limitantes da produção e expansão da guaranicultura no Estado do Amazonas é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola*, que é considerada a doença mais grave da cultura (TRINDADE; POLTRONIERI, 1997). Foi inicialmente descrita por Albuquerque (1961), no entanto este taxón ainda não foi reconhecido nas chaves taxonômicas do gênero (SUTTON, 1980) e ainda existe uma controvérsia entre os pesquisadores sobre a espécie associada á esta doença (BENTES; BARRETO, 2004).

A identificação de espécies de *Colletotrichum* é difícil devido a grande variabilidade e caracteres morfológicos utilizados para fins taxonômicos (KILAMBO et al., 2013). As técnicas moleculares ajudam a superar as insuficiências de métodos tradicionais, e têm sido recentemente utilizadas para identificar e caracterizar espécies de *Colletotrichum* (LIMA et al., 2013; MANAMGODA et al., 2013; SCHENA et al., 2014). Nos últimos anos MALDI-TOF MS tem sido desenvolvido para identificação rápida e confiável de micro-organismos patogênicos (BIZZINI; GREUB, 2010). É uma

técnica que consiste na obtenção de vários espectros que, juntos, formam um espectro principal, e tem sido amplamente utilizada na identificação e caracterização de grupos de fungos filamentosos (SANTOS et al., 2010).

A produção de enzimas extracelulares é um dos mecanismos utilizados pelos fungos para degradar constituintes da parede celular vegetal e colonizar os tecidos (KIKOT et al., 2009). Para isso, fungos possuem uma matriz diversificada de enzimas segregadas para despolimerizar os principais componentes de polissacáridios estruturais da parede celular da planta, isto é, celulose, hemicelulose e pectina (KUBICEK et al., 2014). Oeser et al. (2002) observaram que o crescimento do patógeno *Claviceps purpurea* na hospedeira estava interligado com a degradação da pectina, e que dois genes de endopoligalacturonase (cppg1/cppg2) eram expressos em todas as fases de infecção.

O tipo de associação estabelecida do patógeno com a sua planta hospedeira representa uma grande estratégia de vida que, aparentemente, difere muito entre espécies de fungos (DELAYE et al., 2013). Estritamente falando, os endofíticos são todos os tipos de micro-organismos que vivem dentro de plantas (PARTIDA-MARTÍNEZ; HEIL, 2011). Mais comumente, o termo “endofítico” é utilizada para fungos que colonizam tecidos vivos sem causar qualquer sintomas da doença (PURAHONG; HYDE 2011).

O estudo da atividade enzimática e do processo de colonização dos tecidos por isolados endofíticos e patogênicos, pode auxiliar a esclarecer mecanismos relacionados com a patogenicidade do fungo *C. guaranicola* em guaranazeiro.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Caracterizar os isolados de *Colletotrichum guaranicola* patogênicos e endofíticos, quanto aos aspectos culturais, atividade enzimática e estudar o processo inicial de infecção nos tecidos de guaranazeiro.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Caracterizar morfológicamente isolados endofíticos e patogênicos de *C. guaranicola*;
- ✓ Realizar a genotipagem dos isolados de *C. guaranicola* por meio da técnica AP-PCR;
- ✓ Verificar o agrupamento dos isolados patogênico e endofítico usando a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF;
- ✓ Avaliar a atividade de enzimas extracelulares (amilases, celulasas, pectinases, proteases, polifenol-oxidase e lipases) de isolados de *C. guaranicola* patogênico e endofítico em substratos sólidos específicos;
- ✓ Estudar o processo inicial de infecção de isolados de *C. guaranicola* patogênico e endofítico em folhas suscetíveis de guaranazeiro.

## REVISÃO DE LITERATURA

### O hospedeiro *Paullinia cupana* var. *sorbilis*

O guaranazeiro é uma dicotiledônea, nativa da Amazônia e pertencente à família Sapindaceae. O gênero *Paullinia* possui aproximadamente 147 espécies, distribuídas pela América Tropical e Subtropical, das quais nove ocorrem na Amazônia brasileira, inclusive *P. cupana* (H.B.K.), sendo a variedade *sorbilis*, o guaraná verdadeiro, cultivado comercialmente. A classificação botânica do guaranazeiro consiste da seguinte forma: Divisão: Angiospermae; Classe: Dicotiledônea; Família: Sapindaceae; Gênero: *Paullinia*; Espécie: *P. cupana*; subespécies ou variedades: *sorbilis* e *typica* (NASCIMENTO FILHO et al., 2001).

É uma cultura tradicional com significativa importância econômica e social na região Amazônica. É uma planta nativa brasileira, cultivada por produtores de pequena e larga escala. Seus frutos são cápsulas deiscentes que contém de uma a três sementes de coloração marrom escura (KRUG et al., 2015). As sementes são processadas para se obter o pó, xarope ou extrato, que é usado em alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos no mundo todo (ANGELO et al., 2008).

Miranda e Metzner (2010) relataram que a semente de *P. cupana* chega a apresentar 6% de cafeína (4 a 8% na massa seca), enquanto o grão de café possui de 1 a 2,5% de cafeína, o mate 1% e o cacau 0,7%. Ainda apresenta grande quantidade de amido (60% da semente seca), tanino (em torno de 10%), teobromina (0,03 a 0,17%) e teofilina (0,02 a 0,06%). Rica também em fósforo, potássio, ferro, cálcio, tiamina, vitamina A, proteína e açúcares. A quantidade de cafeína no guaraná em pó pode variar de acordo com a procedência da matéria prima (região de plantio), o método de cultivo, presença de contaminantes químicos e métodos de secagem (FUKUMASU et al., 2008). Nos seres humanos, o guaraná em doses de 75 mg por dia demonstrou na pesquisa

realizada por Haskell et al. (2007) efeitos favoráveis na memória.

A condição de centro de diversificação da cultura de guaranzeiro fez surgir na região Amazônica, por coevolução, doenças que a afetam severamente, sendo a antracnose, causada pelo *Colletotrichum guaranicola*, a mais importante delas, seguida pelo super brotamento, um complexo de anomalias atribuídas a *Fusarium decemcellulare* (CONAB, 2013). Essas doenças contribuem para a baixa produtividade de guaraná no Estado do Amazonas, situando-se atualmente em torno de 174 Kg/ha, correspondente ao primeiro semestre de 2015, muito aquém do potencial da cultura, que pode facilmente atingir 600 Kg/ha (CONAB, 2015). Segundo levantamento de Avaliação da Safra de Guaraná em Grãos – SAFRA de 2015, divulgado pelo IBGE (2015) a Bahia permanece como líder no ranking da produção brasileira com 2.600 toneladas, e o Amazonas segue o segundo lugar, alcançando uma produção de 855 toneladas.

Os Estados do Amazonas e Bahia juntos contêm 95% da área de crescimento de guaraná no Brasil, no entanto, em 2012, o rendimento médio na Bahia era aproximadamente 1,8 vezes maior do que no Estado de Amazonas (FAO, 2015). Mesmo com o desenvolvimento de cultivares tolerantes às principais pragas e doenças para a região Amazônica, a produtividade continua baixa quando comparada com os demais anos. A baixa produtividade também está relacionada com as baixas qualificações técnicas dos agricultores, que são na sua maioria pequenos produtores (CUNHA, 2006).

A diferença de produtividade entre esses estados é parcialmente compensada pelo preço de mercado das sementes, que é maior no Amazonas, de R\$ 21,13/Kg, comparado a R\$ 13,00/Kg na Bahia (IBGE, 2015). O preço menos elevado do Estado do Amazonas é um resultado da negociação dos produtores do Amazonas diretamente

com as indústrias de processamento do guaraná localizados exclusivamente no interior do Estado, enquanto o produto da Bahia tem seu custo aumentado pela necessidade de transportá-lo para as indústrias no Amazonas. Após o processamento, parte do extrato de guaraná permanece nessas empresas para a produção de bebidas e outra parte destina-se aos mercados interno e externo (SAGRI - BRASIL, 2010).

### **Antracnose do guaranazeiro**

Antracnose é um tipo de doença que se caracteriza pela formação de lesões escuras sobre o tecido vegetal, sendo promovida por espécies do gênero *Colletotrichum* os quais englobam os fungos mitospóricos pertencentes à ordem *Melanconiales* da classe *Coelomycetes*, e apresentam associação teleomórfica com ascomicetos do gênero *Glomerella* (SUTTON, 1980; HYDE et al., 2009). *Colletotrichum* é um dos mais importantes fungos patogênicos de plantas, causando antracnose em frutos e folhas de uma ampla gama de hospedeiros, incluindo muitas culturas comercialmente importantes (SUTTON et al., 1992; CANNON et al., 2012; GAN et al., 2013). *Colletotrichum* também engloba fungos endofíticos, epifíticos e saprófitas (KUMAR; HYDE, 2004; LIU et al., 2007; PRIHASTUTI et al., 2009).

A antracnose, causada pelo fungo *C. guaranicola*, é a mais importante e destrutiva doença do guaranazeiro. Albuquerque (1961) foi o primeiro a identificar a espécie de *C. guaranicola* em folhas de guaranazeiro, posteriormente Bentes e Barreto (2004) afirmaram não haver ocorrência do patógeno em outros hospedeiros, além do guaranazeiro, a partir da reavaliação taxonômica de *C. guaranicola*.

Este fungo ataca a planta em qualquer estágio de desenvolvimento de forma altamente destrutiva. Nas plantas atacadas, o fungo induz o crestamento (queima) em folhas jovens, com sua subsequente queda. Em folhas novas, ainda em crescimento e



antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico, caracterizando o quadro da antracnose. Quando numerosas, essas lesões causam deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendente dos ramos e por fim a da planta (TAVARES et al., 2005).

O controle integrado como o uso de clones resistentes e controle químico tem sido recomendado para gestão da cultura, para prevenir e reduzir a antracnose (BENTES; MATSUOKA, 2002; TAVARES et al., 2005). A utilização de cultivares tolerantes constituiu-se na estratégia de controle mais viável do ponto de vista socioeconômico e ambiental. A Embrapa Amazônia Ocidental tem caracterizado as cultivares quanto ao nível de resistência, estabilidade e previsibilidade de resistência, frequência de infecção e adaptabilidade para serem recomendados para uso pelos produtores. Além disso, as cultivares também foram selecionadas com relação às características agronômicas adequadas ao manejo sustentável da cultura. As cultivares BRS-Maués, BRS-Amazonas, BRS-CG-611, BRS-CG-648, BRS-CG-882 e BRS-CG-612 estão sendo recomendadas para o cultivo em região e/ou locais onde a antracnose constituiu-se no principal fator limitante à produção (EMBRAPA, 2014).

### **Fungos fitopatogênicos e endofíticos**

A presença de micro-organismos em partes aéreas de plantas, em geral, é associada a sintomas que promovem algum prejuízo ao tecido vegetal. Entretanto, a presença de fungos em tecidos assintomáticos tem sido relatada em vários estudos, colonizando o interior dos tecidos vegetais sem causar dano aparente ou o aparecimento de sintomas de doenças. Tais micro-organismos receberam a denominação de fungos endofíticos ou endofíticos (KUSARI et al., 2012; DELAYE et al., 2013).

Bary, em 1866, introduziu o termo endofítico, citado por Stone (1988), sendo aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações de antagonistas ou simbioses. Carroll (1988), no entanto restringiu o uso do termo endofítico, aplicando somente para organismos que em seu processo de colonização não causam sintomas ao hospedeiro, desta forma excluindo os organismos patogênicos e mutualísticos.

A diferenciação entre endofíticos (aqueles micro-organismos que vivem dentro da planta) e fitopatogênicos (aqueles que causam doenças às plantas) depende do nicho ocupado em determinado estágio e da interação do micro-organismo com o hospedeiro (STROBEL et al., 2004), portanto a aplicação destes termos tem puro significado didático, havendo dificuldade em determinar limites entre eles. Alguns endofíticos têm demonstrado ser capaz de melhorar as habilidades e resistência competitivas para herbívoros, patógenos, e vários estresses abióticos para seus hospedeiros (SAIKKONEN et al., 1998; NEWTON et al., 2010).

Alguns fungos endofíticos são conhecidos por serem patógenos quiescentes (latentes) (HYDE; SOYTONG, 2008). Recentes observações e hipóteses sobre fungos endofíticos afirmaram que a colonização assintomática é um equilíbrio de antagonismos entre o patógeno e o hospedeiro (DEVARAJU; SATISH, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a importância de fungos endofíticos na indução de resistência de plantas (DINGLE; MCGEE, 2003; KAVROULAKIS et al., 2007), promoção do crescimento vegetal (HAMAYUN et al., 2009; YOU et al., 2012), maior tolerância ao estresse abiótico (KHAN et al., 2012), controle biológico de pragas e doenças (CAO et al., 2009; ZHANG et al., 2009) e a produção de metabólitos de interesse farmacológico, tais como antibióticos e antioxidantes (CHANDRA, 2012; RADIĆ; STRUKELJ, 2012; BUDHIRAJA et al., 2013;).

O gênero *Colletotrichum* tem sido relatado como causador de antracnose em várias plantas incluindo gramíneas e cereais a nível mundial (CROUCH et al., 2009a, b; PRIHASTUTI et al., 2009), e também foram registradas várias espécies como endofíticas em quase todos os principais grupos de angiospermas (HOFSTETTER et al., 2012; TADYCH et al., 2012; MANAMGODA et al., 2013;), coníferas (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012a), e samambaias (MCKENZIE et al., 2009).

Fungos endofíticos e patogênicos têm sido frequentemente classificados como *Colletotrichum gloeosporioides* ou *Colletotrichum* spp. (GONZAGA et al., 2015; SIDHU et al., 2014; TAO et al., 2013). *Colletotrichum gloeosporioides* é comumente um endofítico isolado a partir de uma gama de espécies de plantas (CHITHRA et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Portanto, é importante estabelecer a relação entre as cepas de vários isolados de *Colletotrichum* com diferentes formas de vida para estabelecer a diversidade das espécies.

Costa Neto (2009) cita que *Colletotrichum* pode ser encontrando tanto em guaranazeiro doentes quanto sadios, indicando que existem fungos do gênero que são danosos ao hospedeiro e alguns que não são danosos, podendo ser endofíticos ou patogênicos latentes, que só ocorre quando houver condições favoráveis à sua manifestação.

### **Caracterização morfocultural e genotipagem**

Nos últimos anos, o gênero *Colletotrichum*, que contém mais de 600 espécies, desenvolveu-se rapidamente com inúmeros estudos combinando caracterização molecular e morfológica (CANNON et al., 2012; VELHO et al., 2015). Na avaliação de Tao et al. (2013), mais de 52 espécies, foram introduzidas no gênero com base nas características morfoculturais e molecular (DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b;

DOYLE et al., 2013; NOIREUNG et al., 2012; WEIR et al., 2012).

As dificuldades encontradas na identificação das espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998; ANDRADE et al., 2007).

A taxonomia de *Colletotrichum* mudou significativamente ao longo dos anos. Inicialmente, algumas destas espécies foram combinadas com base na morfologia dos esporos e outras estruturas, incluindo estruturas sexuais produzidos nas culturas. Este processo foi levado ao seu extremo, em 1957, quando Von Arx reduzia várias centenas de espécies descritas de *Colletotrichum* para apenas 11 espécies morfológicas (CANNON et al., 2012). Em seguida, o número de espécies descritas lentamente voltou a aumentar, com base em diferenças sutis como a forma e tamanho de conídios; forma e tamanho apressorial; presença ou ausência de cerdas; e aparência da colônia e taxa de crescimento (GONZÁLEZ et al., 2006; HYDE et al., 2009).

Historicamente, assumiu-se que as espécies de *Colletotrichum* eram específicas de determinado hospedeiro. Novas espécies foram descritas quando este fungo foi encontrado em um novo gênero de planta hospedeira resultando em mais de 660 nomes publicados (FARR et al., 2006). Cerca de 600 destes foram considerados *C. gloeosporioides* por Arx (1957) com base em sua morfologia. Em estudos posteriores alguns destes provaram ser espécies distintas, como por exemplo *C. boninense* identificado por Moriwaki et al. (2003) e *C. orbiculare* (DAMM et al., 2013). Uma chave útil para a identificação de espécies de *Colletotrichum* estava na publicação de Sutton (1980) que distinguiu 21 espécies que baseia-se principalmente nas características dos conídios, apressórios, cerdas, escleródios e coloração das colônias

produzidos sob condições padronizadas combinadas com a planta hospedeira, mais tarde Sutton (1992) listou 39 espécies de *Colletotrichum* cada um com uma breve descrição, mas não chave.

A identificação das espécies tem sido tradicionalmente baseada na forma e tamanho de conídios (FREEMAN et al., 2000), a taxa de crescimento em meio BDA (SUTTON et al., 1992), e a sensibilidade a benomyl (VALERO et al., 2010). No entanto, somente estes critérios não são adequados, porque as características morfológicas e culturais podem variar em diferentes condições ambientais (CAI et al., 2009). As técnicas moleculares, combinados com caracterização morfológica e testes de patogenicidade tem provado ser eficaz para a caracterização de espécies de *Colletotrichum* (PHOULIVONG et al., 2012).

Métodos moleculares são ferramentas úteis na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* (LOPEZ, 2001). Nos últimos anos diferentes técnicas foram utilizadas para caracterizar *Colletotrichum*: análises moleculares incluindo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA ribossomal e mitocondrial, sequenciamento de regiões conservadas como as denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Intergenic Spacer Region*) do *Rdna*, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites. Estas informações têm possibilitado a diversidade existente entre populações, além de distinguir espécies muito próximo de *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. acutatum*, caracterizar a especificidade por hospedeiro, caracterizar isolados patogênicos de não patogênicos, caracterizar a produção de metabólicos e em alguns casos possibilitam a construção direta de primers específicos para estas características (LIU et al., 2011; SCHENA et al., 2014).

Caracteres morfológicos de espécies do complexo *C. gloeosporioides* muitas

vezes se sobrepõem e são ambíguos (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009). Assim, diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* continua a ser um desafio considerável para os taxonomistas. Reação em cadeia da polimerase em tempo real, ou quantitativa, (PCR em tempo real ou qPCR) é uma ferramenta molecular poderosa e tem sido utilizado na genotipagem e detecção do patógeno (MACKAY, 2007; TAO et al., 2013). PCR em tempo real foi desenvolvida para satisfazer os requisitos técnicos específicos, tais como uma elevada sensibilidade e especificidade, que não foram facilmente conseguido com outras técnicas clássicas. O PCR está se tornando ferramenta de rotina, devido à sua confiabilidade e rapidez demonstrada (GACHON et al., 2004; KUAN et al., 2011). A técnica tem sido desenvolvida para identificar e realizar a genotipagem de um certo número de agentes patogênicos fúngicos de plantas, incluindo espécies de *Colletotrichum* (MAHARAH; RAMPERSAD, 2012).

Estudos indicaram que *C. guaranicola* possui uma ampla base genética (DUARTE et al., 1995; VÉRAS et al., 1997; BENTES; GASPAROTTO, 1999), o que pode ter implicação na durabilidade da resistência de clones de guaranazeiro em campo, devido à seleção de variantes do fungo capazes de suplantar a resistência da hospedeira. Duarte et al. (1995) estudaram características morfológicas de oito isolados de *C. guaranicola* e observaram variação no fenótipo do fungo. Verás et al. (1997) avaliaram a variabilidade morfofisiológica de *C. guaranicola* em diferentes substratos, tendo observado uma grande variabilidade fenotípica entre os isolados. Bentes e Gasparotto (1999) avaliaram a virulência de três isolados de *C. guaranicola* em sete clones de guaranazeiro, e observaram variação na virulência dos isolados em cada hospedeira testada.

## MALDI-TOF MS

A correlação entre dados moleculares e morfológicos tem sido descritos como fundamentais para identificação de espécies de *Colletotrichum*. Nos últimos anos, a espectrometria de massa MALDI-TOF MS tem sido desenvolvida para identificação rápida e confiável de micro-organismos patogênicos (BIZZINI; GREUB, 2010).

Oliveira et al. (2015) enfatizaram que MALDI-TOF MS é um método viável, rápido e preciso para identificação de rotina do complexo *Sporothrix*. Várias pesquisas comprovaram a capacidade do MALDI-TOF MS para identificar espécies de fungos pertencentes a diferentes gêneros fúngico (CHANG et al., 2016), por exemplo *Fusarium* (DONG et al., 2009; SANTOS et al., 2015) e *Trichoderma* (DE RESPINIS et al., 2010).

Santos e Lima (2010) afirmaram que é de fundamental importância ter em consideração que a técnica de MALDI-TOF ICMS é uma abordagem entre muitas e deve, por isso, ser usada como uma ferramenta de apoio dentro de uma abordagem polifásica (análise morfológica clássica, perfis bioquímicos, dados espectrais e os dados moleculares) no processo de identificação fúngica de modo a reduzir ao máximo identificações incorretas dos fungos. Na abordagem polifásica as informações obtidas a partir de cada técnica são comparadas (SIMÕES et al. 2013; SILVA et al., 2015).

A identificação de espécies fúngicas utilizando a espectrometria de massas MALDI-TOF tem sido uma rotina dos laboratórios que trabalham com diagnose de micro-organismos (DE RESPINIS et al., 2010). Os espectros de massa são específicos da espécie, como se fosse impressões digitais, altamente reprodutíveis, e apenas minimamente influenciado por condições de crescimento (CROXATTO et al., 2012) e, com instrumentos modernos, uma única amostra é analisada em minutos, isto é, um lote de 100 amostras pode ser analisado em menos de 1 h, com um ganho de tempo de um ou mais dias, em comparação com as técnicas de identificação convencionais (VAN

VEEN et al., 2010; POSTERARO et al., 2013). Isso acontece porque cada espécie de fungo tem o seu próprio perfil de proteínas característicos, podendo ser identificado por comparação dentro de minutos utilizando o MALDI-TOF MS (BRUN et al., 2013).

### **Atividade enzimática**

Fungos patogênicos produzem uma variedade de enzimas hidrolíticas que lhes auxiliam na penetração e infecção no tecido hospedeiro, estas enzimas são chamadas coletivamente como degradantes de parede celular, elas podem contribuir para a patogênese, auxiliando na invasão tecidual e disseminação do patógeno. Além disso, eles podem atuar como indutores de reação de defesa do hospedeiro (KIKOT et al., 2009).

As enzimas degradadoras da parede celular vegetal, compreendem pectinases, cutinases, celulases, xilanases e proteases. Essas podem apresentar ação tanto sinérgica como seqüencial na degradação dos substratos. A parede celular das plantas apresenta celulose, hemiceluloses, substâncias pécticas, proteínas e lignina. Entretanto, a proporção e a distribuição destes componentes é variável de acordo com células de diferentes tecidos, idades, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (WULFF, 2002).

Alguns pesquisadores têm utilizado a atividade enzimática das espécies para auxiliar na caracterização dos isolados, sendo este método, portanto de grande valia na tarefa. De acordo com Couto et al. (2002), a produção de enzimas extracelulares, com atividades amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica, em meio sólido, permitiu a distinção entre isolados de *C. musae* (BERK; CURTIS) von Arx, em banana, assim como *C. gossypii* em algodão (LIMA; CHAVES, 1992).

Marchi et al. (2009) relataram que enzimas hidrolíticas secretadas por *C. gloeosporioides* atuam na interação com *Stylosanthes* spp., visto o amplo arsenal



enzimático produzido por *Colletotrichum* spp., o qual é capaz de destruir componentes estruturais de tecidos da planta, e em alguns casos, culminar com a morte celular.

O processo de infecção do patógeno no hospedeiro incluem as cutinases, que quebram a superfície cuticular da parte aérea das plantas (TORTO-ALALIBO et al., 2009). Enzimas como a cutina são sugeridas como fator de patogenicidade em fungos que necessitam penetrar diretamente através da superfície do hospedeiro (IDNURM; HOWLETT, 2001).

O papel de cutinases na penetração da planta tem sido bem documentado. Skamnioti e Gurr (2007) mostraram que a enzima extracelular cutinase2 produzida por *Magnaporthe grisea* é necessária para efetuar a penetração completa de tecido de arroz, complementando a pressão hidrostática exercida pelos apressórios melanizados.

A pectina é um heteropolissacarídeo de estrutura química complexa, comercialmente importante para as indústrias alimentícias e farmacêuticas. Sua estrutura varia de acordo com as espécies, estágio metabólico e condições de extração (FRAEYE et al., 2010; ROUND et al., 2010). As enzimas pectinolíticas, são capazes de degradar pectina e conduz à maceração dos tecidos de plantas, são as primeiras enzimas secretadas pela maioria dos fungos patogênicos ao atacar as células do hospedeiro.

São as enzimas mais estudadas em relação a patogênese, considerando que a pectina é um grande componente da parede celular primária e secundária, e a maioria dos fungos tem, portanto, que degradá-lo pelo menos parcialmente quando encontra barreiras físicas de células vegetais. Além disso, a degradação enzimática da pectina enfraquece a parede celular e a expõe a outros componentes da parede celular e outras enzimas tais como celulasas e hemicelulasas (REIGNAULT et al., 2008).

Jia et al. (2009) estudando a atividade de poligalacturonase, pectato liase e pectina metilesterase em cepas patogênicas de *Phytophthora capsici* incubados em

diferentes condições, constataram uma alta produção de enzimas pectolíticas. Além disso, relataram existir uma correlação evidente entre a atividade da enzima pectolítica e a patogenicidade. Perfect et al. (1999) observaram que na fase de infecção necrotrófica por espécies de *Colletotrichum*, enzimas que degradam a parede celular da planta tais como endopoligalacturonase e pectato liase apresentaram um aumento na expressão.

As enzimas celulolíticas desempenham importante papel na patogenicidade, degradando a celulose. Alguns fungos são dotados com a capacidade de secretar complexos celulolíticos contendo pelo menos três atividades enzimáticas: Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, celobiohidrolase e  $\beta$ -glicosidase (SOHAIL et al., 2009). Cada uma destas enzimas atua de forma específica nos polímeros de celulose. Roncero et al. (2003) afirmaram que as celulases fazem parte das enzimas que degradam a parede celular, e estão associadas à fitopatogenicidade. De acordo com Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), os fungos que decompõem substâncias celulósicas geralmente ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes.

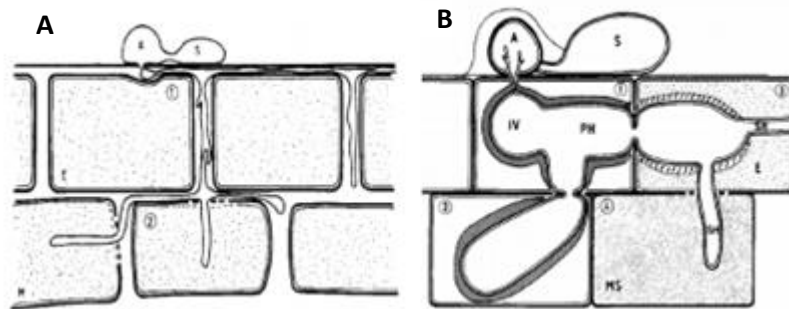
### **Histologia de *Colletotrichum***

Espécies de *Colletotrichum* empregam diversas estratégias para invasão do hospedeiro, desenvolvendo uma série de estruturas de infecção especializadas como tubos germinativos, apressórios, *pegs* de penetração (vesículas de infecção, hifas primárias e hifas secundárias), as quais aparecem numa sequência comum às diversas espécies. Eventos das fases iniciais do desenvolvimento de estruturas infectivas de *Colletotrichum* spp. tais como a germinação e a formação de apressórios possuem semelhanças entre si em diferentes patossistemas (WHARTON; DIÉGUES-URIBEONDO, 2004; PERES et al., 2005). Os estágios iniciais de desenvolvimento de

fungos durante o processo de infecção são essencialmente os mesmos para todas as espécies de *Colletotrichum* (ARAÚJO; STADNIK, 2011; ARAÚJO et al., 2014;), sendo os fungos endofíticos podendo a colonização ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (SCHULZ; BOYLE, 2005).

No processo de infecção das espécies de *Colletotrichum* inicialmente ocorre a adesão dos conídios ou ascósporos dispersos sobre a planta, sendo este um processo passivo e inespecífico, posteriormente, conídios e ascósporos germinam como tubos germinativos indiferenciados ou passando por uma diferenciação complexa a fim de se formar apressórios (BAILEY et al., 1992; GONÇALVES; STADNIK, 2012). A penetração é principalmente pela forte pressão osmótica exercida pela hifa infecciosa, que emerge a partir de um poro apressorial melanizado, que culmina na colonização dos tecidos da planta e depois na formação e reprodução das estruturas (ARAÚJO et al., 2014). Divon e Fluhr (2007) relataram em sua pesquisa que fungos fitopatogênicos invadem a cutícula e a parede celular de seu hospedeiro através da secreção de enzimas líticas, pressão de turgor, força mecânica, ou a combinação de ambas.

Duas estratégias básicas têm sido descritas para a colonização para *Colletotrichum* spp.: (1) hemibiotrófico intracelular (HBI), que é a forma mais comum; e (2) necrotrófico intramural subcuticular (NIS). Na estratégia HBI, a penetração de hifas infecciosas ocorre na célula da epiderme, enquanto na colonização NIS, o fungo cresce sob a cutícula, dentro de paredes periclinais e anticlinais das células epidérmicas (DIÉGUEZ - URIBEONDO et al., 2005; PERES et al., 2005) (Figura 1).



**Figura 1.** Estratégias de infecção desenvolvidas por espécies do gênero *Colletotrichum*. A) Colonização intramural subcuticular; B) Colonização intracelular. (s) - esporo; (a) - apressório; (e) - células epidérmicas; (m) - células do mesófilo; (iv) - vesículas de infecção; (ph) - hifa primária; (sh) - hifa secundária (necrotrófica). (Adaptado de Perfect et al., 1999).

Os fungos endofíticos têm a capacidade de colonização inter ou intracelular e estão localizados muitas vezes em uma única célula. A colonização de tecidos vegetais por endofíticos envolve várias etapas, incluindo o reconhecimento, a germinação de esporos, a penetração da epiderme e a colonização dos tecidos (PETRINI, 1996; GAO et al., 2010).

No processo de infecção de *C. gloeosporioides* em macieira, Araújo et al. (2014) observaram a colonização com as duas estratégias (hemibiotrófico intracelular e necrotrófico intramural subcuticular), mas possuem uma preferência pela colonização necrotrófico intramural subcuticular, sendo uma interação necrotrófica em grande parte e uma fase biotrófica muito curta, ou quase inexistente. Auyong et al. (2012) observaram sintomas de antracnose em pimenta, causada pelo fungo *C. truncatum* três dias após inoculação (d.a.i.) e com uma estratégia de colonização necrotrófico intramural subcuticular.

O processo de infecção por *C. gloeosporioides* observado por Barreto et al. (2007) foi iniciado, exclusivamente, via abertura natural dos estômatos, por tubos germinativos, sem formação de apressório, ocorrendo de modo indireto. Em algumas espécies de *Colletotrichum*, os apressórios são quiescentes, não germinam, mas os

tecidos das folhas são penetrados indiretamente através dos estômatos (LATUNDE-DADA, 2001).

A partir de estudos histológicos de *C. guaranicola* em *P. cupana* em clones resistentes e suscetível, sabe-se que, o início da germinação dos conídios ocorre no período entre 6 e 12 h.a.i. (horas após inoculação), atingindo o máximo de germinação no período de 24 h.a.i. (BENTES; MATSUOKA, 2002).

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F.C. Antracnose do guaraná. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Serviço de Informação Agrícola, p. 22, 1961.
- ANDRADE, E.; UESUGI, C.; UENO, B.; FERREIRA, M. Morphocultural and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic to papaya. *Fitopatologia Brasileira*. v. 32, n.1, p. 21-31, 2007.
- ANGELO,P.; NUNES-SILVA,C.; BRIGIDO,M.; et al., Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Rep*, v. 27, p. 117-124, 2008.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M.J. Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, n. 4, p. 241-248, 2011.
- ARAÚJO, L.; GONÇALVES, A.E.; STADNIK, M. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phitoparasitica*, v. 42, p. 631-640, 2014.
- ARX, J.A. VON. Die Arten der gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Z*, v. 29, p.413-469, 1957.
- AUYONG, A.S.M.; FORD, R.; TAYLOR, P.W.J. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. *Journal of basic Microbiology*, v. 52, n.4, p. 372-382, 2012.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. England: CAB Internacional Wallingford, p. 388, 1992
- BARRETO, A.L.H.; VASCONCELOS, I.M.; GRANGEIRO, T.B.; MELO, V.M.M.; MATOS, T.E.; ELOY, Y.R.G.; FERNANDES, C.F., TORRES, D.C.; FREIRE-FILHO, F.R.; FREIRE, F.O.; OLIVEIRA, J.T.A. Infection Process and Host Defense Responses in compatible and incompatible interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Internacional Journal of Plant Sciences*, v. 168, n. 2, p. 193-203, 2007.
- BENTES, J.L.S.; BARRETO, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque agente causal da antracnose do guaranzeiro. *Acta Amazônica*, v. 34, nº1, p. 129-131, 2004.
- BENTES, J.L.S.; GASPAROTTO, L. Pathogenicity of *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque isolates in clones of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p. 260-267, 1999.
- BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histology of *Colletotrichum guaranicola* and *Paullinia cupuana* var. *sorbilis* on resistant and susceptible clones. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 71-77, 2002.

- BIZZINI, A.; GREUB, G.; MALDI-TOF M.S. A revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 11, p.1614–1619, 2010.
- BRUN, S.; MADRID, H.; ENDE, B.G.V.D.; ANDERSEN, B.; MARINACH-PATRICE, C.; MAZIER, D.; DE HOOG, G. S. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. *Fungal Biology*, v. 117, n. 1, p. 32-40, 2013.
- BUDHIRAJA, A.; NEPALI, K.; SAPRA, S.; GUPTA, S.; KUMAR, S.; DHAR, K.L. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. *Medicinal Chemistry Research*, n° 22, 323–329, 2013.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.; WALLER, J.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E.H.C.; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, n° 39, p. 183-204, 2009.
- CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, v.73, p. 181–213, 2012.
- CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.
- CAO, R.; LIU, X.; GAO, K.; MENDGEN, K.; KANG, Z.; GAO, J.; DAI, Y.; WANG, X. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Curr Microbiol*, v. 59, p. 584-592, 2009.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: Novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiol Biotechnol*, v. 95, p. 47-59, 2012.
- CHANG, S.; CARNEIRO-LEAO, M. P.; OLIVEIRA, B. F.; SOUZA-MOTTA, C.; LIMA, N.; SANTOS, C.; OLIVEIRA N. T. Polyphasic Approach Including MALDI-TOF MS/MS analysis for identification and characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian Corn Kernels. *Toxins*, v. 8, n. 54, 2016.
- CHITHRA, S.; JASIMA, B.; SACHIDANANDANB, P.; JYOTHISA, M.; RADHAKRISHNANA, E.K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, v. 21, n. 4, p.534–540, 2014.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de guaraná em grãos: levantamento em maio de 2013. Brasília: CONAB, 2013.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura Mensal de Guaraná: levantamento em novembro de 2015. Brasília: CONAB, 2015.
- COSTA NETO, P.Q. Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke). 108p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

COUTO, E.F.; MENEZES, M.; COELHO, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. Summa Phytopathologica, v. 28, p. 260-266, 2002.

CROUCH, J.A.; TREDWAY, L.P.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. Phylogenetic and population genetic divergence correspond with habitat for the pathogen *Colletotrichum cereale* and allied taxa across diverse grass communities. Molecular Ecology, v. 18, p. 123-135, 2009a.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B.; WHITE, J.F.; HILLMAN, B.I. Systematic analysis of the falcate-spored *Colletotrichum graminicolous* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. Mycologia, v. 101, p.717-732, 2009b.

CROXATTO, A.; PRODHOM, G.; GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Microbiology Reviews, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

CUNHA, G.M. Informações de mercado sobre guaraná. Serviço Apoio Micro Pequenas Empresas – SEBRAE, 2006.

DAMM, U.; CANNON P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies Mycology, v. 73, p. 1–36, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. Studies in Mycology, v. 73, p. 37–113, 2012b.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; LIU, F.; BARRETO, R.W.; GUATIMOSIM, E.; CROUS P.W. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field and weeds. Fungal Divers, v. 69, p. 29–59, 2013.

DE RESPINIS, S.; VOGEL, G.; BENGLI, C.; TONOLLA M.; PETRINI, O.; SAMUELS G. J. Mycology Progress, v. 9, p. 79-100, 2010.

DELAYE L.; GARCÍA-GUZMÁN.; HEIL MARTIN. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens-are fungal lifestyles evolutionarily stable traits?. Fungal Diversity, v. 60, p. 125-135, 2013.

DEVARAJU, R.; SATISH, S.; Endophytic fungi: Trapped or hidden store houses of bioactive compounds within plants: A review. Journal of Pharmacy Research, v. 3, p. 2986–2989, 2010.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J., FORSTER H., SOTO-ESTRADA A., ADASKAVEG J.E. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. Ecology and Epidemiology, v. 95, n.7, p. 751-758, 2005.

DINGLE, J.; MCGEE, P.A. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. tritici in wheat. Mycological Research, v. 107, n. 3, p. 310-316, 2003.



DIVON, H.H.; FLUHR, R. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters*, v. 266, n.1, p. 65-74, 2007.

DONG, H.; KEMPTNER, J.; MARCHETTI-DESCHMANN M.; KUBICEK C. P.; ALLMAIER, G. Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, n. 5, p. 1373-1383, 2009.

DOYLE, V.P.; OUDEMANS, P.V.; REHNER, S.A.; LITT, A. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America. *PLoS One*, v. 8, n. 5, 2013.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; CORREA, M.P.F. Physiological and morphological changes in *Colletotrichum guaranicola* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 141-144, 1995.

EMBRAPA. Boas Práticas de Cultivo de Guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Embrapa Amazônia Ocidental, Relatório de Impacto das Tecnologias – Embrapa Amazônia Ocidental, p. 36, 2014.

FAO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Perspectivas Agrícolas no Brasil: Desafios da agricultura brasileira 2015-2024, v. 2, p. 1-50, 2015.

FARR, D.F.; AIME, M.C.; ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E. Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. *Mycological Research*, v.110, p. 1395-1408, 2006.

FRAEYE, Y.; COLLE, I.; VANDEVENNE, E.; DUVETTER, T.; VAN BUGGENHOUT, S.; MOLDENAERS, P.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 401-409, 2010.

FREEMAN, S.; KATAN T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*. v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). *Applied Environmental Microbiology*. v. 66, n. 12, p. 5267-5272, 2000.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; NAGAMINE, M.K.; BARBUTO, J.A.; RAO, K.V.; DAGLI, M.L.Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, Guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, n. 4, p. 305-310, 2008.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: What relevance to plant studies?. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p.1445-1454, 2004.

GAN, P.; IKEDA, K.; IRIEDA, H.; NARUSAKA, M.; O'CONNELL, R.J.; NARUSAKA, T.Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytologist*, v. 197, n.4, p. 1236-1249, 2013.

GAO, F. K.; DAI, C. C.; LIU, X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, n. 13, p. 1346-1351, 2010.

GONÇALVES, A.E.; STADNIK M. J. Interference of ulvan on apressoria development and melanization of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tropical Plant Pathology*, v. 37, n.6, p. 431-437, 2012.

GONZAGA, L.L.; COSTA, L.E.O.; SANTOS, T.T.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, n. 2, p. 485-496, 2015.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology*, v. 96, p. 982-992, 2006.

HAMAYUN, M.; KHAN, S.A.; KIM, H.Y.; CHAUDHARY, M.F.; HWANG, Y.H.; SHIN, D.H.; KIM, I.K.; LEE, B.H.; LEE, I.J. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. *Journal Microbiology Biotechnol*, v. 19, p. 560-565, 2009.

HASKELL, C.F.; KENNEDY, D.O.; WESNES, K.A.; et al. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guarána in humans. *Journal of Psychopharmacology*, v. 21, n. 1, p. 65–70, 2007.

HOFSTETTER, V.; BUYCK, B.; CROLL, D.; VIRET, O.; COULOUX, A.; GINDRO, K. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease?. *Fungal Divers*, v. 54, p. 51–67, 2012.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; et al. *Colletotrichum* – Names in current use. *Fungal Diversity*, v. 39, p.147-183, 2009.

HYDE, K.D., SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, v. 33, p. 163–173, 2008.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal – Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Indicadores, IBGE, 2015. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br> >. Acesso em: 12 jan. 2016.

IDNURM, A.; HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, v. 2, p. 241-255, 2001.

ISMAIL, W.; GESCHER, J. Epoxy Coenzyme A thioesterpPathways for degradation of aromatic compounds. *Applied Environmental Microbiology*, v. 78, n. 15, p. 5043-5051, 2012.

JIA, L.; QINGTIAN, L.; JIN, K.; XUEFENG, X.; ZHENHAI, H. Microarray analysis of salt-stress responsive genes in *Malus zumimats*. *Journal of China Agricultural University*, v.14, v. 5, p. 61-67, 2009.

- KAVROULAKIS, N.; NTOUGIAS, S.; ZERVAKIS, G.I.; EHALIOTIS, C.; HARALAMPIDIS, K.; PAPADOPOULOU, K.K. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot.*, v. 58, p. 3853–3864, 2007.
- KHAN, A.L.; HAMAYUN, M.; KANG, S.M., KIM, Y.H., JUNG, H.Y., LEE, J.H. LEE, I.J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: An example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology*, v. 12, p. 1-14, 2012.
- KIKOT, G.E.; HOURS, R.A.; ALCONADA, T.M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review. *Journal Basic Microbiology*, v. 49, p. 231–241, 2009.
- KILAMBO, D.L.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; MABAGALA, R.B.; VARZEA V.M.P.; HADDAD, F.; LOUREIRO, A.; TERI, J. M. Characterization of *Colletotrichum kahawae* strains in Tanzania. *International Journal of Microbiology Research*, v. 5, p. 382-389, 2013.
- KRUG, C.; GARCIA, M.V.B.; GOMES F.B. A scientific note on new insights in the pollination of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Apidologie*, v. 46, p. 164-166, 2015.
- KUAN, C.P.; WU, M.T.; HUANG, H.C.; CHANG, H. Rapid detection of *Colletotrichum lagenarium*, causal agent of anthracnose of cucurbitaceous crops, by PCR and real-time PCR. *Journal of Phytopathology*, v. 159, p. 276–82, 2011.
- KUBICEK, C.P.; STARR, T.L.; GLASS, N. L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v. 52, p.427-451, 2014.
- KUMAR, D.S.S.; HYDE, K.D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, v. 17, p. 69–90, 2004.
- KURI, C.M.B. The guaraná industry in Brazil. *International Business and Economics Research Journal*, v. 7, p. 87–98, 2008.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry&Biology*, v.19, n.7, p. 792-798, 2012.
- LATUNDE-DADA, A.O. *Colletotrichum*: Tales of forcible entry, stealth, transiente confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, v. 2, n. 4, p.187-198, 2001.
- LIMA, E.F.; CHAVES, G.M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, p. 61-66. 1992.
- LIMA, N.B.; VINICIUS DE, A.; BATISTA, M.; DE MORAIS, M.A. JR.; BARBOSA, M.A.G.; MICHEREFF, S.J.; HYDE, K.D.; CÂMARA, M.P.S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in Northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, v. 61, p. 75–88, 2013.

- LIU, G.; KENNEDY, R.; GREENSHIELDS, D.L.; PENG, G.; FORSEILLE, L.; SELVARAJ, G.; WEI, Y.D. Detached and attached Arabidopsis leaf assays reveal distinctive defense responses against hemibiotrophic *Colletotrichum* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, p. 1308-1319, 2007.
- LIU, B.; LOUWS, F.J.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 132, p. 593–607, 2011.
- LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 9, p. 291-337, 2001.
- MACKAY, I. Real-Time PCR in microbiology: From diagnosis to characterization. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 454, 2007.
- MAHARAJ, A.; RAMPERSAD S.N. Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.) based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. *Molecular Biotechnology*, v. 50, n. 3, p. 237–249, 2012.
- MANAMGODA, D.S.; UDAYANGA, D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Divers*, v. 61, p. 107–115, 2013.
- MCKENZIE, S.J.; PERES, N.A.; BARQUERO, M.P.; ARAUZ, L.F.; TIMMER, L.W. Host range and genetic relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leather leaf fern in Florida. *Phytopathology*, v. 99, p. 620–631, 2009.
- MARCHI, C.E., BORGES, M.F., MIZUBUTI, E.S.G. Amilolytic and pectinolytic activities of *Alternaria solani* and aggressiveness in tomato plants. *Summa Phytopathologica*, v. 32, n. 4, p. 45 -352, 2006.
- MARCHI C. E., FERNANDES C. D., GUIMARÃES L. R., A., FABRIS L. R., BORGES M. F., TRENTIN R. A., JERBA V. F. Atividade Pectolítica de *Colletotrichum gloeosporioides* e a relação com a agressividade ao *Stylosanthes* ssp. *Bragantia*, v. 68, n. 2, p. 423-433, 2009.
- MIRANDA, M.V.; METZNER, B.S. *Paullinia cupana*: Revisão da matéria médica. *Revista de Homeopatia*, v. 73, p. 1-17, 2010.
- MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. from Japan. *Mycoscience*, v. 44, n. 1, p. 47-53, 2003.
- NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; SOUSA, N.R.; GARCIA, T.B.; CRAVO, M. DA S.; COUTINHO, E.F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.36, nº 3, p. 501-506, 2001.
- NEWTON, A.C.; GRAVOUIL, C.; FOUNTAINE, J.M. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, v. 157, p. 343–59, 2010.

NOIREUNG, P.; PHOULIVONG, S.; LIU, F.; CAI, L.; MCKENZIE, E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; JONES, E.B.G.; BAHKALI, A.H.; HYDE, K.D. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Cryptogamie Mycologie*, v. 33, n. 3, p. 347-362, 2012.

OESER, B.; HEIDRICH, P.M.; MULLER, U.; TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K.B. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genetics and Biology*. v. 36, n. 3, p.176-186, 2002.

OLIVEIRA, M.M.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; ROMEO, O; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; LIMA, N.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Res. Microbiology*, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.

PARTIDA-MARTINEZ, L.P.P.; HEIL, M. The microbe-free plant: Fact or artifact?. *Frontiers in Plant Science*, v. 2, p. 1-16, 2011.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Review of Plant Disease*, v. 89, p. 784-796, 2005.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, San Diego, v. 27, n° 2, p. 186-198, 1999.

PETRINI, O. Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi, in S.C. Redlin., L.M. Carris (eds), *Endophytic fungi in Grasses and Woody Plants*, p. 87-100, 1996.

PHOULIVONG, S.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Cross infection of *Colletotrichum* species: A case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental e Applied Mycology*, v. 2, n.2, p. 99–111, 2012.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE K.D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers*, v. 39, p. 89–109, 2009.

POSTERARO, B.; DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; SANGUINETTI, M. MALDI-TOF mass laboratory: Identification off ungi and beyond. *Expert Review of Proteomics*, v. 10, n.2, p. 151-164, 2013.

PURAHONG, W.; HYDE K.D. Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. *Fungal Diversity*, v. 47, p. 1-7, 2011.

RADIĆ, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi: The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, v. 19, p. 1270-1284, 2012.

RAMOS, A. M.; GALLY, M.; GARCÍA, M. C.; LEVIN, L. Pectinolytic enzyme production bu *Colletotrichum truncatum* causal agente of soybean anthracnose. *Ver. Iberoam Micology*, v. 27, n. 4, p. 186-190, 2010.

REIGNAULT, P.H.; VALETTE-COLLET, O.; BOCCARA, M. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology*, v. 120, n. 1, p. 1-11, 2008.

RONCERO, M.B.; TORRES, J.F.; COLOM, J.F.; VIDAL, T. TCF Bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: Paper quality assessment. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 3, p. 305–314, 2003.

ROUND, A.N.; RIGBY, N.M.; MACDOUGALL, A.J.; MORRIS, V.J. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, v. 345, p. 487-497, 2010.

RUEGGER, M.J.S.; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, p. 205-211, 2004.

SAIKKONEN K.; FAETH S.H.; HELANDER M.L.; SULLIVAN T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Reviews Ecology and Systematics*, v.29, p.319–343, 1998.

SAGRI-BRAZIL, Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. Guaraná. 2010. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping&notid=21790>. Acesso: 10 de agosto de 2015.

SANTOS, C.; FRAGA, M.E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, v. 161, n. 2, p. 168-175, 2010.

SANTOS, C.; LIMA, N. A identificação de Fungos pela espectrometria de massa através da Técnica de MALDI-TOF ICMS. In: *Anais do VI Congresso Brasileiro de Micologia*, p. 566-574, 2010.

SANTOS, C.; VENTURA, J.A.; COSTA, H.; FERNANDES, P. M. B.; LIMA, N. MALDI-TOF MS to identify the pineapple pathogen *Fusarium guttiforme* and its antagonist *Trichoderma asperellum* on decayed pineapple. *Tropical Plant Pathology*, v. 40, p. 227-232, 2015.

SCHENA, L.; MOSCA, S.; CACCIOLA, S.O.; FAEDDA, R.; SANZANI, S.M.; AGOSTEOA, G.E.; SERGEEVA, V.; MAGNANO DI SAN LIO, G. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant. Pathology*, v. 63, p. 437-446, 2014.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research*, v.109, n° 6, p. 661-686, 2005.

SKAMNIOTI, P.; GURR, S.J. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell*, v. 19, p. 2674-2689, 2007.

SIDHU, A.K.; AGRAWAL, S.B.; SABLE, V.S.; PATIL, S.N.; GAIKWAD, V.B. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* a novel endophytic laccase producing

fungus from the leaves of a medicinal plant, Piper betle. International Journal of Scientific & Engineering Research, v. 5, n. 2, p. 1087-1096, 2014.

SILVA, F.; SHALFOUN, S.; BATISTA, L.; SANTOS, C.; LIMA, N. Use of polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. Annals of Microbiology, v. 65, p. 2119-2129, 2015.

SIMÕES, M. F.; SANTOS, C.; LIMA, NELSON. Structural Diversity of *Aspergillus* (Section *Nigri*) spores. Microscopy and Microanalysis, v. 19, p. 1151-1158, 2013.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S.A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH. New Biotechnology, v. 25, p. 437-441, 2009.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglasfir, with observations on uninfected epidermal cells. Canadian Journal of Botany, V. 66, N. 1, p. 45-54, 1988.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia: Acervuli and stromata. Common Wealth Mycological Institute: Kew, Surrey. 696 p., 1980.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. (Bailey JA, Jeger MJ, eds). CAB International, Wallingford, p. 1–26, 1992.

TAVARES, A.M.; ATROCH, A.L.; NASCIMENTO FILHO, F.J.; PEREIRA, J.C.R.; ARAÚJO, J.C.A. Cultura do Guaranazeiro no Amazonas. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental. Sistema de Produção. 4º Ed., 44 p., 2005.

TADYCH, M.; BERGEN, M.; JOHNSON, C.J.; POLASHOCK J.; VORSA N. Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to mature fruit: diversity and succession. Fungal Divers, v. 54, p. 101–116, 2012.

TAO, G.; LIU, Z.Y.; LIU, F.; GAO, Y.H.; CAI, L. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. Fungal Diversity, v. 61, p. 139–164, 2013.

TORTO-ALALIBO, T.; COLLMER, C.W.; LINDEBERG, M.; BIRD, D.; COLLMER, A.; TYLER, B.M. Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts described using the Gene Ontology. BMC Microbiolog, v. 9 (Suppl. 1):S3, 2009.

TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S. Doenças do guaraná (*Paullinia cupana* Ducke). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE J.A.M. (eds) Manual de Fitopatologia, Agronômica Ceres, São Paulo, v. 2, p. 459–462, 1997.

- VALERO, M.; GARCÍA, S.; GINER, M.; ARANZAZU, A.; RUIZ, J. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. *European Journal of Plant Pathology*, v. 3, p. 399-405, 2010.
- VAN VEEN, S.Q.; CLASS, E.C J.; KUIJPER, J. High-Throughput Identification of bacteria and yeast by Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 900-907, 2010.
- VELHO, A.C.; ALANIZ, S.; CASANOVA, L.; MONDINO, P.; STADNIK, M. J. New insight into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in Southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology*, v. 30, p. 1-16, 2015.
- VÉRAS, S.M.; GASPAROTTO, L. E.; MENEZES, M. Physio-morphological variability of *Colletotrichum guaranicola* on different substrates. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 40, p.297-305, 1997.
- WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol*, v. 73, p. 15–18, 2012.
- WHARTON, P.S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, v. 61, p. 3-22, 2004.
- WULFF, G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical Reviews*. v.102, p. 1-28, 2002.
- YOU, Y.H.; YOON, H.; KANG, S.M.; SHIN, J.H.; CHOO, Y.S.; LEE, I.J.; LEE, J.M.; KIM, J.G. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in suncheon bay. *Journal Microbiology Biotechnology*, v. 22, p. 1549–1556, 2012.
- ZHANG, D.X.; NAGABHYRU, P.; SCHARDL, C.L. Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants. *Plant Physiology*, v. 150, p. 1072–1082, 2009.
- ZHANG, Q.; WEI, X.; WANG J. Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspensa*. *Fitoterapia*, v. 83, p. 1500–1505, 2012.



Caracterização morfológica e genotipagem de  
*Colletotrichum guaranicola* endofítico e patogênico

---

**CAPÍTULO I**

## RESUMO

O Estado do Amazonas concentra a segunda maior área plantada de guaranazeiro no Brasil. Um fator que limita a produção e a expansão da guaranicultura no Amazonas é a antracnose. Alguns estudos têm investigado as relações endofitos X patógenos, porém não há relatos na literatura comparando isolados endofíticos e patogênicos de *Colletotrichum guaranicola*. Diante disso, este trabalho teve como objetivo caracterizar a variabilidade morfo-cultural e molecular de *C. guaranicola* patogênico e endofítico isolado do guaranazeiro. Os isolados patogênicos e endofíticos de *C. guaranicola* foram obtidos pelo método indireto, a partir de folhas coletadas em diferentes áreas de cultivo de guaranazeiro no Estado do Amazonas. Foram preparadas culturas monospóricas para todos os isolados. As colônias dos isolados foram caracterizadas quanto a coloração, aspecto do micélio e índice de crescimento micelial. Foram avaliadas as características morfométricas de conídios e apressórios. Foram inseridos como referência para comparação um isolado de *C. fragariae*, um de *C. gloeosporioides* e um de *C. brasiliense*. A coloração das culturas foi descrita conforme o sistema de *Munsell Color Company* de anotação de cores para comparação durante a avaliação visual das colônias eliminando assim a subjetividade nas avaliações. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições e 26 tratamentos (isolados). Foi realizada a genotipagem dos isolados usando a técnica de AP-PCR usando os primers arbitrários (GACA<sub>4</sub>, GTG<sub>5</sub> e M13). A extração do DNA genômico dos isolados foi feita pelo método fenol/clorofórmio. As características morfo-culturais dos isolados endofíticos e patogênicos deste estudo foram bastante distintas, principalmente quanto à coloração da colônia e ao tamanho dos conídios. A morfometria dos conídios e apressórios não foi eficaz por si só para diferenciação de espécie no gênero *Colletotrichum* devido possuir

várias espécies com características morfológicas similares. A genotipagem permitiu confirmar que todos os isolados pertencem ao gênero *Colletotrichum*, entretanto, não permitiu identificar os isolados a nível de espécie. Conforme literaturas recentes, recomenda-se a análise filogenética multilocus para identificação das espécies.

**Palavras-chave:** guaranazeiro; antracnose; morfocultural; molecular.

## ABSTRACT

The State of Amazonas concentrates the second largest acreage of guarana in Brazil. Anthracnose constitutes a limiting factor for the production and expansion of guaranicultura in the State of Amazonas. Some studies have investigated the relationship endophytes X pathogens, but there are no reports in the literature comparing endophytic and pathogenic *Colletotrichum guaranicola*. Thus, this study aimed to characterize the Morphocultural and molecular variability of *C. guaranicola* pathogenic and isolated endophytic from guarana. Pathogenic and endophytic isolates of *C. guaranicola* were obtained by the indirect method, from leaves collected in different areas of guarana cultivation in the state of Amazonas. Single spore cultures were prepared for all isolates. The colonies of the isolates were characterized according to color, the mycelium appearance and mycelial growth rate. The morphometric characteristics of conidia and appressoria were evaluated. An isolate of *C. fragariae*, a *C. gloeosporioides* and a *C. brasiliense* were inserted as a reference for comparison. Coloration of cultures has been described according to the Munsell Color System, a color annotation Company used for comparison during the visual assessment of the colonies, thereby eliminating subjectivity in the ratings. The experimental design was completely randomized with five replications and 26 treatments (isolated). Genotyping of the isolates was carried out using the AP-PCR using random primers (GACA4, GTG5 and M13). The extraction of genomic DNA isolates was taken by phenol / chloroform method. The morphocultural characteristics of endophytic and pathogenic isolates of this study were quite different, especially with coloration of the colony and size of the conidia. The morphometry of conidia and appressoria was not effective by itself to sort of differentiation in the genus *Colletotrichum* due has several species with similar morphological characteristics. Genotyping confirmed that all isolates belong to

the genus *Colletotrichum*, however, it was not possible to identify the isolated species level. According to recent literature, it is recommended to multilocus phylogenetic analysis for species identification.

**Keywords:** guarana; anthracnose; Morphocultural; molecular.

## 1. INTRODUÇÃO

No Estado do Amazonas é onde se concentra a segunda maior área plantada de guaranazeiro (*Paulinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) no Brasil, com 11.766 hectares, produção de 855 toneladas e com a produtividade média de 174Kg/há (IBGE, 2015). Um fator que limita a produção e a expansão da guaranicultura no Amazonas é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque, considerada a doença mais séria da cultura (PEREIRA; ARAÚJO, 2009).

Espécies de *Colletotrichum* patogênicas e endofíticas estão entre as que mais ocorrem em plantas terrestres e já foram registradas cerca de 2.200 espécies de plantas como hospedeira deste gênero (FARR; ROSSMAN, 2013). Este gênero foi recentemente eleito o oitavo mais importante grupo de fungos patogênicos de plantas no mundo, com base na percepção científica e importância econômica (DEAN et al., 2012). Também foi demonstrado que os *Colletotrichum* endofíticos podem conferir benefícios particulares de proteção ao cacau, reduzindo a incidência de doença e danos causados por outros patógenos de plantas (ARNOLD et al., 2003; HERRE et al., 2007).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a uma determinada hospedeira, bem como a determinação de sua variabilidade, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença. Os métodos convencionais de identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* são baseados em caracteres morfológicos e culturais como morfologia das colônias, conídios e apressórios, temperatura ótima para o crescimento micelial, taxa de crescimento, presença ou ausência de setas e do teleomorfo (SUTTON, 1992; PERES et al., 2005; CAI et al.,

2009). A identificação dentro desse gênero é complicada, devido as espécies apresentarem poucas características morfológicas distinguíveis e a fase teleomórfas são raramente formadas (HYDE et al., 2009; BONETT et al., 2010).

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos métodos para a detecção e identificação de patógenos de plantas, incluindo espécies de *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012; WEIR et al., 2012; JAMES et al., 2014; VELHO et al., 2015). Entre as técnicas moleculares, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem sido frequentemente utilizada por diversos autores (FAEDDA et al., 2011; MANAMGODA et al., 2013; RAMDEEN; RAMPERSAD, 2013). Estes métodos ajudam a superar o problemas associados com a identificação baseada unicamente em morfologia de fungos (SAWANT et al., 2012). Cai et al. (2009) afirmaram que a utilização de ferramentas de identificação molecular associadas com as técnicas morfológicas tradicionais tem sido a forma mais indicada para estudar complexos de espécies dentro do gênero *Colletotrichum*.

Estudos têm investigado as relações endofíticos e patógenos (FREEMAN et al., 2001; ROJAS et al., 2010), porém não há relatos na literatura comparando isolados endofíticos e patogênicos de *C.guaranicola*, além de patogênico ao guaranazeiro é também um endofítico foliar assintomático (COSTA NETO, 2009).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar a variabilidade morfocultural e genotipagem de *C. guaranicola* patogênico e endofítico isolados do guaranazeiro.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Realizar a caracterização morfológica e cultural de nove isolados endofíticos e quatorze isolados patogênicos de *C. guaranicola*;
- ✓ Identificar se existe diferença genética nos isolados de *C. guaranicola* através da técnica AP-PCR;
- ✓ Verificar o agrupamento dos isolados patogênico e endofítico usando a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos isolados

Os isolados de *C. guaranicola* foram obtidos a partir de folhas coletadas em áreas de cultivo de guaranazeiro nos municípios de Manaus, Maués, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, no Amazonas (Tabela 1).

Para o isolamento dos endofíticos foram usadas folhas sadias e sem danos, conforme a metodologia descrita por Petrini (1991), com modificações. As folhas foram inicialmente lavadas em água corrente e em seguida submetidas a desinfestação superficial em etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% por 1 minuto, novamente lavadas em etanol 70% por 30 segundos e, por último, três lavagens em água destilada esterilizada por 6 minutos.

Os isolados patogênicos foram obtidos de folhas com sintomas típicos de antracnose o isolamento foi feito conforme Alfenas e Maffia (2007). Foram retirados fragmento de 0,5 cm<sup>2</sup> da região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia os quais foram submetidos à desinfestação superficial em etanol 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos, seguidos de tríplice lavagem em água destilada.

Os fragmentos foram depositados equidistante em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g de Batata; 20 g de Dextrose; 17 g de Ágar; 1000 mL de água destilada), acrescido de Cloranfenicol 250g.L<sup>-1</sup> e posteriormente incubadas em câmaras de crescimento BOD (Tecnal) a 28 °C sem fotoperíodo durante 24-48 horas, até o surgimento de estruturas do fungo. Após este período, as hifas crescidas a partir dos fragmentos foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura utilizado anteriormente para individualização das colônias.

**Tabela 1.** Identificação, procedência e classificação dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Procedência	Classificação	Isolado	Procedência	Classificação
I 01	Manaus/AM	Patogênico	P 17	Maués/AM	Patogênico
I 02	Manaus/AM	Patogênico	P 18	Maués/AM	Patogênico
I 04	Rio Preto da Eva/AM	Patogênico	I 13	Manaus/AM	Endofítico
I 06	Rio Preto da Eva/AM	Patogênico	I 16	Maués/AM	Endofítico
I 07	Manaus/AM	Patogênico	I 17	Maués/AM	Endofítico
I 08	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 01	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
I 09	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 07	Maués/AM	Endofítico
I 10	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 09	Maués/AM	Endofítico
I 11	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 10	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
I 12	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 12	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
I 461	Manaus/AM	Patogênico	P 13	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
P 11	Maués/AM	Patogênico	-	-	-

### 3.2. Obtenção de culturas monospóricas

Foram preparadas culturas monospóricas para todos os isolados, de forma a assegurar uniformidade genética do patógeno. As culturas monospóricas foram obtidas retirando com alça de platina pequenas quantidades das estruturas do fungo e adicionadas em microtubos contendo 900 µL de água destilada e esterilizada (ADE). Dessa diluição foram retirados 100 µL e adicionados em microtubos contendo 900 µL de ADE, os quais foram submetidos a diluições fracionadas até a concentração  $10^{-3}$ , foi retirado uma alíquota de 100 µL, e distribuído uniformemente em placas de Petri contendo o meio Ágar-Água, e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 horas. Após este período, as placas foram observadas sob lupa para a repicagem dos fragmentos de hifa originados a partir de um único conídio para novas placas contendo o meio BDA. Todos os isolados foram preservados em ADE em microtubos de 2 mL pelo Método de Castellani (CASTELLANI, 1939).

### 3.3. Caracterização morfocultural

As colônias dos nove isolados endofíticos e quatorze patogênicos foram caracterizadas quanto à coloração, aspecto do micélio e o índice de crescimento micelial. Foram avaliadas as características morfométricas de conídios e apressórios. Foram inseridos referência para comparação um isolado de *C. fragarie* (*C. fra*) (CBS14231) um isolado de *C. gloeosporioides* (*C. glo*) (CBS 119203) e um de *C. brasiliense* (*C. bra*) (CBS128528).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA (Difco TM<sup>®</sup>) suplementado com cloranfenicol (250 mg.L<sup>-1</sup>) em temperatura de laboratório (± 26 °C). O diâmetro das colônias foi medido diariamente, com o auxílio de uma régua graduada, registrando as medidas das colônias, em sentidos diametralmente opostos, até que um dos tratamentos atingisse a borda da placa. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições e 26 tratamentos (isolados). Em seguida foi calculado o índice de crescimento micelial (ICM) conforme a fórmula descrita por Peres (2003):

$$ICM = \frac{C1 + C2 + \dots Cn}{N1 + N2 + \dots Nn}$$

Onde:

ICM= índice de Crescimento Micelial;

C1, C2 e Cn = crescimento das colônias na primeira, segunda e última avaliação;

N1, N2 e Nn = número de dias.

Os valores de ICM foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, usando programa SISTAT.

### **3.3.1. Avaliação da coloração dos isolados**

A coloração das culturas foi descrita conforme o sistema de *Munsell Color Company* (BALTIMORE, 1975) de anotação de cores para comparação durante a avaliação visual das colônias eliminando assim a subjetividade nas avaliações. A coloração das culturas foi feita quando as colônias estavam com 20 dias de idade. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições e 26 tratamentos (isolados).

### **3.3.2. Avaliação da morfometria dos conídios e apressórios**

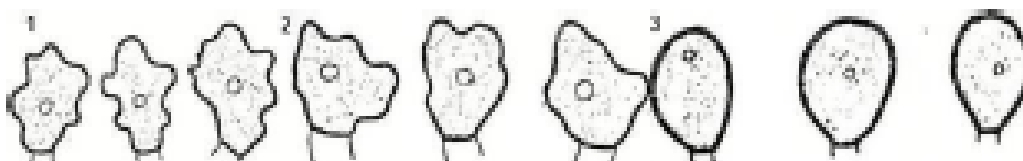
Para morfometria dos conídios dos isolados foram obtidos das colônias em meio de cultura BDA (Difco TM®) permanecendo durante um período de 15 dias sob luz contínua, com a finalidade de induzir produção de conídios do fungo. Após esse período, foi preparada uma suspensão de conídios adicionando 20 mL de água destilada esterilizada nas placas e com o auxílio de um pincel de cerdas macias, foram removidos os conídios dos conidióforos. Foram pipetados 100 µL dessa suspensão que foi aplicado sobre lâmina de microscopia e observada sob microscópio ótico equipado com câmera fotográfica (ZEISS Axio®) sob objetiva de 40 X. Foram avaliados 50 conídios de cada isolado escolhidos aleatoriamente. Foram tomadas as medidas de comprimento (C) e largura (L).

A morfologia dos conídios foi determinada de acordo com a descrição de Sutton (1992) e a escala proposta por Tozze Júnior (2007), sendo cada formato observado recebeu uma denominação numérica (Figura 2).



**Figura 2.** Formato dos conídios avaliados: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redonda na outra; (4) reto, com constrição; (5) falcado, com ápices afilados.

Para a caracterização quanto ao tamanho dos apressórios foi utilizada a metodologia descrita por Araújo et al. (2014) com modificações. Foi preparada uma suspensão de  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Foram depositadas três gotas de suspensão conidial em papel celofane transparente sob lâmina para microscopia e depositada em placa de Petri umedecida com água destilada esterilizada e incubadas em condições de ambiente de laboratório. A cada 24 horas as lâminas foram observadas até a formação dos apressórios, quando foi adicionado o corante lactofenol azul-algodão (100 mL de lactofenol, 1 mL de azul de algodão aquoso 1%, 20 mL de ácido glacial acético) sobre as lâminas, que foram observadas em microscópio óptico com câmera fotográfica (ZEISS Axio®) sob objetiva de 40 X. Foram observados 50 apressórios aleatoriamente, quanto à forma e o tamanho que foram tomadas as medidas vertical e logitudinal de cada apressório. Para determinação da morfologia dos apressórios foi usado o método descrito por Sutton (1980) e a adaptada de Cox e Irwin (1988) (Figura 3).



**Figura 3.** Formatos dos apressórios: 1. Lobados; 2. Levemente lobados; 3. Arredondados. (Adaptado de Sutton, 1980; Cox e Irwin, 1988)

### 3.4. Genotipagem dos isolados

Foi realizada a genotipagem dos isolados usando a técnica AP-PCR (MEDEIROS et al., 2010) usando primers arbitrários. Foram utilizados três oligonucleotídeos derivados de marcadores microssatélites: GACA<sub>4</sub> (5' GACAGACAGACAGACA 3'), GTG<sub>5</sub> (5' GTGGTGGTGGTGGTG 3') e M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') (Biosearch Biotechnologies).

#### 3.4.1. Extração de DNA

A extração do DNA genômico dos isolados foi feita pelo método fenol/clorofórmio (READER; BRODA, 1985), com adaptações de Bentes e Costa Neto (2011). Foram usadas culturas monospóricas de quatorze isolados patogênicos e nove isolados endofíticos de *C. guaranicola*, e as linhagens de referência de *C. fragarie*, *C. gloeosporioides*, *C. brasilienses* e dois isolados de *Fusarium* spp. para comparação.

Para obtenção do DNA fúngico, pequenos fragmentos de culturas monoconidiais foram depositados em meio líquido BD (Batata-Dextrose) em Erlenmeyers de 250 mL, onde permaneceram sob agitação moderada (150 rpm) contínua durante cinco dias em temperatura ambiente. O micélio produzido foi coletado por filtração em papel de filtro esterilizado, em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), e em seguida, armazenados a -20 °C até o momento da extração.

O DNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio, onde a maceração do micélio do fungo foi feita adicionando 100 µL de tampão CTAB 2% (Tris 2,42 g; NaCl 8,2 g; EDTA 0,74 g; Água Mili-Q® 100 mL) e sílica (dióxido de silício, partículas de 10-20 nm, Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) em microtubo de 2 mL, após a homogeneização foram adicionados 900 µL de tampão CTAB 2%, em seguida o

material foi incubado em banho-maria a 65 °C durante 30 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos.

Em seguida foram adicionados 700 µL de clorofol (24 partes de clorofórmio e uma parte de álcool isoamílico). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado. Para haver a precipitação do ácido nucléico, os microtubos foram colocados em temperatura de -20 °C por 12 horas, e após este período foram novamente centrifugados a 14000 rpm por cinco minutos.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1000 µL de etanol 70% durante cinco minutos por 2 vezes e, por último, lavado com 1 mL etanol absoluto por 3 minutos. O etanol absoluto foi descartado e os microtubos foram colocados abertos para secar em temperatura ambiente durante 30 minutos.

O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 30 µL de TE (Tris 10 mM e EDTA 5 mM pH 8,0) mais RNase na concentração de 50 µL/mL. As amostras foram mantidas a 37 °C durante 60 minutos em banho-maria. A avaliação da concentração e qualidade do DNA foi determinada utilizando espectrofotômetro (ND – 1000, Nanodrop®) e em gel de agarose 0,8% usando marcador de tamanho molecular de 50 pb (News England BioLabs®). Todas as amostras foram diluídas em água milli-Q autoclavada para uma concentração de 50 ng/µL e armazenadas a -20 °C.

#### **3.4.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR)**

A amplificação do DNA foi realizada em volume total de 25 µL em reações contendo 100 ng de DNA, utilizando o Kit pureTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare®) de acordo com as instruções do fabricante, usando 20 µL de água mili-Q

autoclavada, 2  $\mu$ L de DNA e 3  $\mu$ L do *primer*. Os ciclos de amplificação da PCR para os marcadores GTG<sub>5</sub> e M13 consistiram de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min seguido por 30 ciclos, cada ciclo foi constituído por desnaturação de 95 °C por 30 s, etapa de anelamento a 60 °C por 30 s e uma extensão por 72 °C por 90 s, seguido por uma extensão final de 5 min a 72 °C. Para o primer GACA<sub>4</sub>, consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30s, 48 °C por 30s, 72 °C por 90 s, com extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,8% corados com brometo de etídio na concentração de 0,2 $\mu$ L/100mL, e utilizando um marcador de 50 pb (New England Biolabs®) por 90 minutos, e o gel foi analisado e fotografado em transiluminador com luz ultravioleta para confirmação das bandas. Os dados obtidos a partir da amplificação com os marcadores foi construída uma matriz binária com base na presença ou ausência de bandas. A matriz foi analisada para similaridade de bandas usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average*) e calculada com o coeficiente de NEI e LI, utilizando software estatístico R (R *Development Core Team*, 2013). O software R também foi empregado para gerar a matriz dos valores cofenéticos e testar a adequação da análise de agrupamento aos dados originais.

### **3.5. Análise por MALDI-TOF MS**

A análise dos perfis protéicos dos fungos por MALDI-TOF MS foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras, MG. Os 23 isolados de *C. guaranicola* endofíticos e patogênicos foram previamente enviados para a UFLA, sendo anteriormente preservados em ADE em microtubos (*Eppendorf*) pelo Método de Castellani.



Os isolados foram reativados, transferindo-se os discos de micélio em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA (Difco TM<sup>®</sup>) suplementado com cloranfenicol (250 mg.mL<sup>-1</sup>) incubadas por três dias a temperatura ambiente ( $\pm$  26 °C). Em seguida, foi retirado uma pequena quantidade do material biológico contendo micélio jovem e/ou esporos e transferidos para um microtubo (*Eppendorf*). Acrescentou-se 12  $\mu$ L de uma solução aquosa contendo acetronitrila P.A. (47,5%); H<sub>2</sub>O dionizada (50%); e ácido trifluoroacético (2,5%). As amostras foram agitadas em vortex por um período de 1 minuto e centrifugadas a 4500 rpm por 1 minuto.

Posteriormente, transferiu-se 0,4  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra para as placas de aço inoxidável de MALDI-TOF MS e recobriu-se cada amostra com 0,5  $\mu$ L da solução matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4- hidroxí-cinâmico (CHCA) previamente centrifugado a 4500 rpm por 5 minutos (75 mg/mL de CHCA em água/etanol/acetonitrila (1:1:1) com 0,03% de ácido trifluoroacético). Durante a adição da solução matriz de CHCA, as amostras foram misturadas suavemente com a ponta da pipeta. A placa foi mantida à temperatura ambiente até a evaporação da fase líquida. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

A calibração externa do equipamento foi realizada utilizando a cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  com os valores bem definidos das massas moleculares (4,365.4, 5,096.8, 5,381.4, 6,241.4, 6,255.4, 6,316.2, 6,411.6, 6,856.1, 7,158.8, 7,274.5, 7,872.1, 9,742 e 12,227.3 Da). Os espectros foram gerados em um espectrômetro de MALDI-TOF MS UltrafleXtreme Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha). As análises estatísticas foram realizadas no software BioTyper 3.0 Package Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

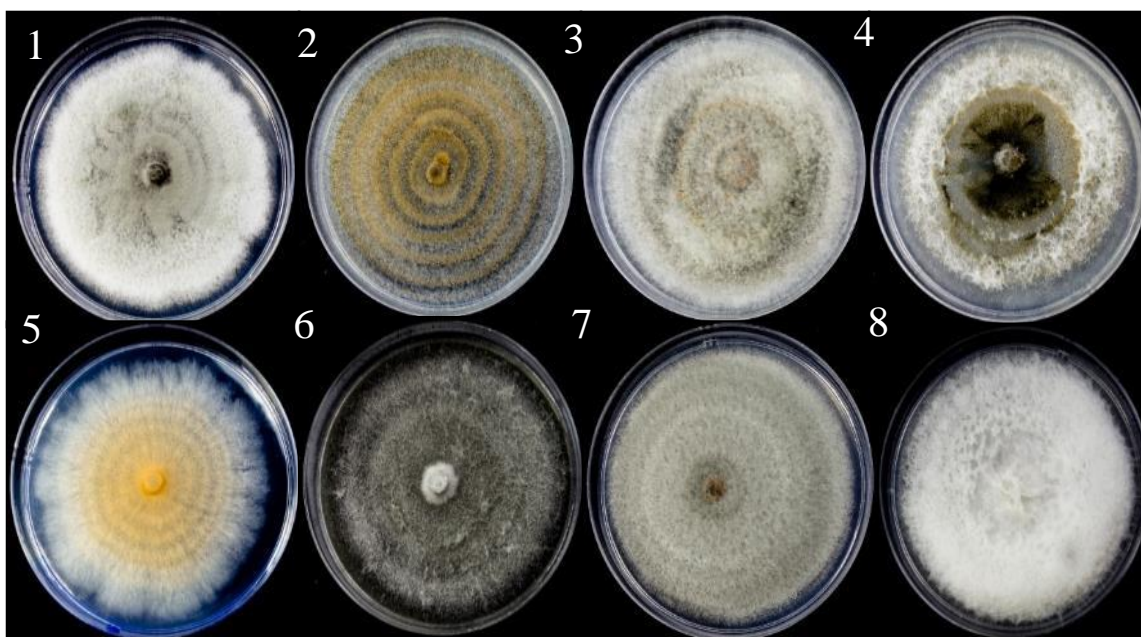
### 4.1. Caracterização morfocultural

Vinte e três isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos a partir de folhas de guaranazeiro, sendo quatorze isolados patogênicos e nove isolados endofíticos. A identificação morfológica dos isolados foi baseada nas espécies descritas por Sutton (1992) e Albuquerque (1961).

#### 4.1.1. Características culturais

A coloração da colônia dos 26 isolados variaram de branco a cinza escuro, e com bordas variando entre branco a preto, o que permitiu agrupá-los em oito grupos distintos (Tabela 2, Figura 4). O grupo 1 compreendeu três isolados com micélio de coloração cinza no centro e branco ao redor da colônia; dois patogênicos (I01 e I12) e um endofítico (I16); grupo dois compreendeu seis isolados com coloração amarelo avermelhado, com formação de anéis de coloração cinza escuro; quatro patogênicos (I02, I04, I06 e P17) e dois referências (*C. glo* e *C. bra*); grupo 3 compreendeu dois isolados com coloração cinza oliva claro, com formação de anéis de coloração amarelo avermelhado; dois patogênicos (I07 e I11); grupo 4 compreendeu um isolado patogênico (I08) com coloração marrom acinzentado no centro, com formação de anéis com coloração amarelo avermelhado; grupo 5 compreendeu de um isolado patogênico (I09) com coloração vermelho claro; grupo 6 compreendeu quatro isolados com coloração cinza escuro; um patogênico (I10) e três endofíticos (I13, I17 e P13); grupo 7 compreendeu seis isolados com micélio de coloração cinza; 1 patogênico (P11) e 5 endofíticos (P01, P07, P09, P10 e P12); e grupo 8 compreendeu três isolados com micélio de coloração branca; dois patogênicos (I461 e P18) e um referência (*C. fra.*). Não foi observado formação de setas. Albuquerque (1961) e Duarte et al. (1995)

também constataram ausência de setas nos isolados por eles estudados de *C. guaranicola* em meio de cultura.



**Figura 4.** Características culturais dos oito grupos dos isolados estudados com sete dias de cultivo. (1) micélio cinza no centro e branco ao redor da colônia; (2) micélio amarelo avermelhado, com formação de anéis de coloração cinza escuro; (3) micélio cinza oliva claro, com formação de anéis de coloração amarelo avermelhado (4) micélio marrom acinzentado no centro, com formação de anéis com coloração amarelo avermelhado; (5) micélio vermelho claro; (6) micélio coloração cinza escuro; (7) micélio de coloração cinza; (8) micélio de coloração branca.

Foi observado que os isolados endofíticos apresentaram predominância de coloração para o cinza, diferenciando apenas na intensidade da cor, os isolados patogênicos foram bastante heterogêneos. Comparando os resultados obtidos com as descrições de Sutton (1992) para as espécies de *Colletotrichum*, foi observado que os isolados endofíticos se assemelham ao descrito para *C. gloeosporioides*, entretanto, a maioria dos isolados patogênicos não se enquadram nessas características culturais, ficando semelhantes às características descritas por Damm et al. (2012) e Silva-Rojas e Ávila-Quezada (2011) para espécie de *C. boninense*, sendo um cinza pálido coberto com uma massa de conídios de coloração laranja. Isolados de *C. boninense* preliminarmente foi definido como sendo *C. gloeosporioides* sensu lato (VON ARX,

1957; SUTTON, 1980) devido suas características morfológicas serem bastantes similares como tamanho e formato dos conídios (FARR, et al. 2006; JOHNSTON, et al. 2005).

A heterogeneidade da coloração de isolados de *C. guaranicola* também foi observada por Duarte et al. (1995) variando de amarelo claro a âmbar em oito isolados patogênicos. Bentes e Barreto (2004) reavaliando a taxonomia de *C. guaranicola* observaram que a colônia do fungo apresentou coloração branca, com abundante produção de micélio, quando cultivado em meio de cultura BDA, a homogeneidade observada pode ser explicada pelo único isolado utilizado pelos autores.

Cruz (2014) estudando as características morfo-culturais de *C. guaranicola* patogênicos proveniente do Estado do Amazonas, observou que a maioria dos isolados apresentou colônia branca a creme-amarelada (verso), e os demais com coloração branca a cinza claro, semelhante à maioria dos isolados observados nesta pesquisa. O mesmo autor citou que as características culturais dos isolados por ele estudados se assemelharam as espécies de *C. gloeosporioides* e *C. boninense*. Velho et al. (2015) estudando 39 isolados patogênicos de *Colletotrichum* spp. provenientes de macieira verificou seis grupos distintos com base na coloração da colônia, sendo necessário a identificação molecular para diferenciação das espécies dentro do complexo.

#### **4.1.2. Índice de crescimento micelial (ICM)**

Os isolados com maior ICM foram quatro patogênicos (I08; I11; I 12; P18), dois endofíticos (I13; P13) e um isolado de referência (*C. fragarie*), com índices de crescimento superiores a 1,80 (Tabela 2). Damm et al. (2012a) relataram que *C. boninense* cresce a taxas bem menores quando comparados com *C. gloeosporioides*. Os isolados I01, I02, I09, P17 (patogênicos), I16 (endofíticos) e o isolado *C.*

*gloeosporioides* apresentaram o menor ICM, variando de 0,99 a 1,36 (Tabela 2). Houve diferenças significativas a 5% de probabilidade entre os isolados, não havendo distinção entre patogênicos e endofíticos.

#### **4.1.3. Características morfológicas dos conídios e apressórios**

Os conídios foram hialinos, unicelulares e com formato cilíndrico ou oblongo (dez patogênicos; sete endofíticos; e *C. glo* e *C. bra*); três apresentaram formato constricto (um patogênico; e dois endofítico); e dois clavados (um patogênico; e *C. fra*), não havendo distinção de endofítico e patogênico (Figura 5). O comprimento dos conídios patogênicos variou de 11,5 a 14,4  $\mu\text{m}$ , e a largura de 4,1 a 5,2  $\mu\text{m}$ ; e nos endofíticos variou de 9,4 a 12,6  $\mu\text{m}$ , e a largura entre 3,1 a 5,6  $\mu\text{m}$  (Tabela 3). O comprimento e a largura encontrados por Albuquerque (1961) quando descreveu a espécie de isolados patogênicos de *C. guaranicola* foi de 12 x 20  $\mu\text{m}$  de comprimento e 4 x 6  $\mu\text{m}$  de largura, intervalo que estão de acordo com a maioria dos isolados patogênicos, com exceção dos isolados I08 (11,5  $\mu\text{m}$  de comprimento) e I09 (11,9  $\mu\text{m}$  de comprimento), isolados agrupados conforme as características culturais nos grupos 4 e 5, respectivamente. Ao contrário do que foi observado nos isolados endofíticos o qual a maioria não ficou dentro do intervalo descrito, com exceção do isolado I16 (12,6  $\mu\text{m}$  de comprimento), sendo este classificado quanto às características culturais e índice de crescimento micelial com os isolados patogênicos.

Sutton (1992), classificou as espécies de *C. gloeosporioides* com conídios hialinos com formato cilíndricos e tamanho de 12 - 17 x 3,5 - 6  $\mu\text{m}$ , intervalo este observado nos isolados patogênicos desta pesquisa, exceto para os isolados I09 e I08 que foram classificados juntamente com demais isolados endofíticos, como sendo *C. gnaphalii*, espécie caracterizada por Sutton (1992) por possuir pequenos conídios com intervalo de 8 - 15 x 4 - 6  $\mu\text{m}$ . Segundo a classificação mais recente de Damm et al.

(2012b) o comprimento dos isolados endofíticos estariam dentro do intervalo de alguns isolados da espécie de *C. acutatum* (8,5 - 12  $\mu\text{m}$ ) e *C. limeticola* (9 - 29  $\mu\text{m}$ ), sendo este último uma subespécie de *C. acutatum*, entretanto, o formato falcado é uma característica que diferencia *C. acutatum*, formato este não encontrado nos isolados estudados. A espécie *C. boninense* anteriormente foi classificada como pertencente ao complexo de espécies do *C. gloeosporioides* e possivelmente estando dentro deste intervalo definido por Sutton (1992). Damm et al. (2013) afirmaram que a diferenciação entre os dois complexos de espécies *C. gloeosporioides* e *C. boninense* utilizando métodos morfológicos é bastante problemática.

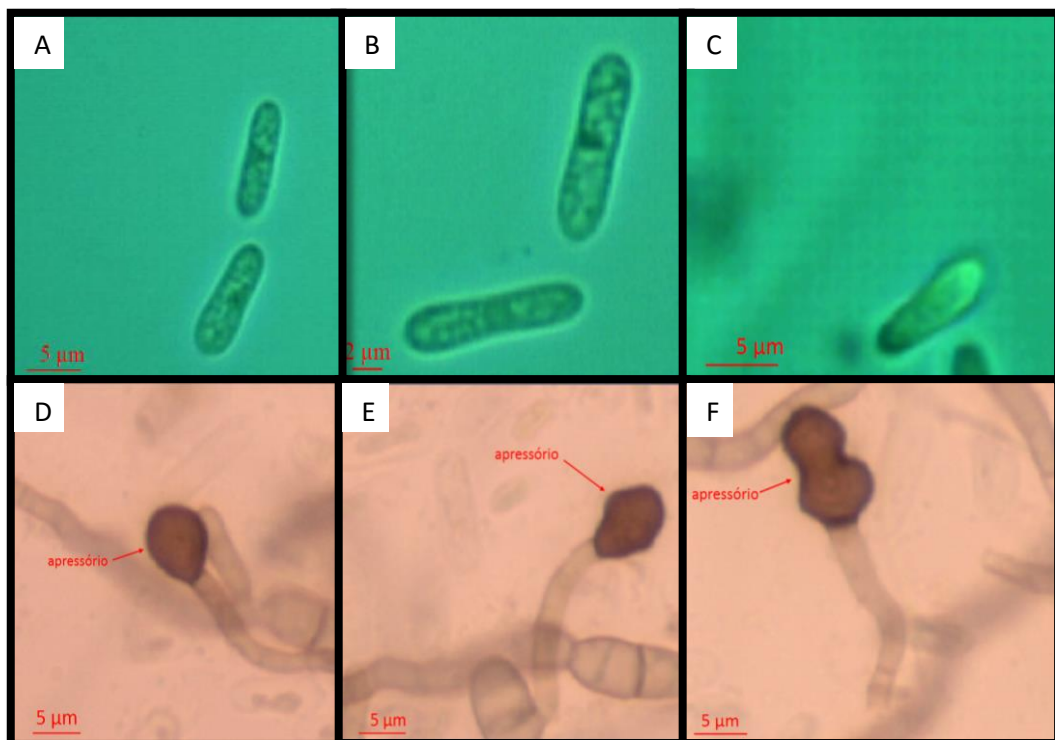
Moriwaki et al. (2003) através de técnicas moleculares e morfológicas, apresentaram elementos e provas suficientes para *C. boninense* ser considerado uma nova espécie, sendo descrita como tendo conídios mais robustos do que *C. gloeosporioides*, com tamanho de conídios variando de 13 a 15,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5,0 a 6,0  $\mu\text{m}$  de largura; neste intervalo foram observados apenas três isolados patogênicos (I04; I06; I07), conforme Tabela 3.

Silva-Rojas e Ávila-Quezada (2011) classificaram *C. boninense* com conídios de tamanho de 11,7 - 20,7  $\mu\text{m}$  de comprimento e 6,9 - 11,0  $\mu\text{m}$  em largura, e *C. gloeosporioides* com tamanho de 13,5 - 23,8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 4,3 - 6,8  $\mu\text{m}$  de largura, podendo confirmar que o tamanho do conídio não é indicado para diferenciar espécies devido o intervalo de inúmeras espécies de *Colletotrichum* se sobreporem no tamanho descrito por Sutton (1992), como as espécies de referências utilizadas neste estudo, *C. gloeosporioides* (13,4 x 5,2  $\mu\text{m}$ ), *C. fragariae* (15,8 x 4,9  $\mu\text{m}$ ) e *C. brasilienses* (13,4 x 4,9  $\mu\text{m}$ ). Weir et al. (2012) afirmaram que dentro de uma espécie o tamanho de conídios não é bastante consistente para diferenciá-los e que muitas vezes ocorre a sobreposição.

Segundo Phoulivong et al. (2010) os formatos dos conídios podem ser utilizados para diferenciar espécies de complexos, mas não podem separar espécies dentro de um complexo. Talhinhos et al. (2005) indicaram variabilidade nos tamanhos dos conídios dentro e entre isolados ao estudar a diversidade de espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela gafa da oliveira e concluíram que existe uma grande dificuldade de distinguir isolados a partir do tamanho dos conídios. Velho et al. (2015) afirmaram que a forma e o tamanho dos conídios são altamente variados entre os *Colletotrichum* e até mesmo dentro de cada espécie. Ngyen et al. (2010) estudando 39 isolados de *Colletotrichum* provenientes de café observaram que a maioria dos conídios dos isolados apresentaram uma enorme variação no comprimento e largura, não sendo possível classifica-los com base nas características morfológicas.

Dentre os isolados, a relação comprimento/largura variou nos patogênicos de 2,3 a 3,4  $\mu\text{m}$  e endofíticos de 1,8 a 3,9  $\mu\text{m}$  (Tabela 3). Vêras et al. (1997) estudando nove isolados de *C. guaranicola* patogênicos verificaram variação de C/L em meio BDA de 2,0 a 3,1  $\mu\text{m}$ , intervalo dentro do observado para a maioria dos isolados, com exceção dos patogênicos I01 (3,4  $\mu\text{m}$ ), I02 (3,2  $\mu\text{m}$ ) e I10 (3,2  $\mu\text{m}$ ); e endofíticos P07 (1,8  $\mu\text{m}$ ), P09 (1,9  $\mu\text{m}$ ), P10 (3,9  $\mu\text{m}$ ) e o isolado de referência *C. fra* (3,3  $\mu\text{m}$ ). Cruz (2012) observou maior amplitude em relação ao C/L de 39 isolados patogênicos de *C. guaranicola* variando de 1,88 a 4,75  $\mu\text{m}$ , intervalo este que inclui todos os isolados estudados (patogênicos e endofíticos). Os conídios de *C. boninense* são semelhantes aos de *C. gloeosporioides*, diferindo apenas em relação comprimento/largura e na presença de uma cicatriz proeminente na base do conídio (MORIWAKI, et al. 2003; DAMM et al., 2012a).

Os isolados endofíticos e patogênicos apresentaram apressórios de coloração escura (melanizado) e com a forma predominantemente arredondada (12 patogênicos; 7 endofíticos; e 3 referências) (Tabela 3; Figura 5), conforme observado por Bentes e Barreto (2004) ao estudar a taxonomia de *C. guaranicola*. O tamanho do comprimento e largura dos apressórios variou de 7,7  $\mu\text{m}$  x 11,1  $\mu\text{m}$  e 5,8  $\mu\text{m}$  x 7,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Para o isolado endofítico P07 não houve formação de apressórios (Tabela 3). Não há relatos sobre a morfometria dos apressórios na pesquisa de Albuquerque (1960) e Veras et al. (1997). De acordo com Moriwaki et al. (2003) *C. boninense* possui apressórios com dimensões de 8 - 12,5 x 5,5 - 9  $\mu\text{m}$ , comparando-se as dimensões dos isolados endofíticos e patogênicos, todos os isolados estão dentro do intervalo descrito, exceto o isolado patogênico I01.



**Figura 5.** Formato dos conídios: (A) oblongo ou cilíndrico; (B) constricto; (C) clavado; e Formato dos apressórios: (D) arredondado; (E) levemente lobado; (F) lobado.



Velho et al. (2015) encontraram uma forma uniforme nos apressórios na maioria dos isolados de *Colletotrichum* estudado, tendendo à forma oval predominante. Than et al. (2008) relataram que a morfologia dos apressórios foi bastante distinta em diferentes espécies de *Colletotrichum*. Andrade et al. (2007) citaram que a variabilidade no formato de apressórios de *Colletotrichum* é bem documentada, sendo um mesmo isolado capaz de apresentar tipos morfológicos distintos, o que dificulta a delimitação precisa entre espécies (MAFACIOLI, et al., 2006; TOZZE Jr., et al., 2006).

A morfologia por si só não é recomendada para diferenciação de espécie no gênero *Colletotrichum* devido possuir várias espécies com características morfológicas similares, tornando o ITS particularmente importante para a identificação da espécie em nível de complexo *Colletotrichum*. Por exemplo, os membros do complexo da espécie *C. boninense* (DAMM et al., 2012a) e *C. cliviae* (YANG, et al., 2009) são micro morfologicamente semelhantes às espécies do complexo *C. gloeosporioides*, mas são geneticamente distintos (CANNON et al., 2012). Xie et al. (2010) identificando isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de morango, enfatizou a inconsistência da identificação baseada somente em critérios morfológicos, por causa das características morfológicas serem altamente variáveis. Caracteres morfológicos pode variar com fatores ambientais e condições de incubação e, por conseguinte, estes parâmetros devem ser normalizados para identificação das espécies e usado com precaução (CAI et al., 2009).

De acordo com as características morfoculturais dos isolados endofíticos e patogênicos deste estudo, quando comparados com dados de estudos anteriores, foi percebido que todos os isolados possuem características do gênero *Colletotrichum*, entretanto, não coincidem com características de uma única espécie ou de um complexo

específico. Além disso, existe uma maior distinção na coloração da colônia e tamanho dos conídios entre os isolados endofíticos e patogênicos. Diante disso, depreende-se a importância da correta identificação da espécie associada a hospedeira. A identificação da espécie de *Colletotrichum* realizada por aspectos da cultura e características morfológicas e dimensões dos conídios e apressórios podem ser imprecisos para separar espécies e subespécies (CAI et al., 2011; KO KO et al., 2011) devido a grande plasticidade dessas características frente a variações ambientais (PHOTITA et al., 2005).

**Tabela 2.** Variabilidade cultural dos isolados de *Colletotrichum* spp. observados em meio BDA. (Continua)

<i>Isolado</i>	<i>ICM*</i> (%)	<i>Coloração da Colônia</i>	<i>Margem da Colônia</i>	<i>Reverso da Colônia</i>	<i>Margem do Reverso</i>	<i>Topografia da Colônia</i>
<b>Patogênicos</b>						
<i>I01</i>	0.99 e	Gray no centro, white ao redor	Branca	Formação de anéis com coloração light yellowish brown	Branca	Micélio presente, moderadamente abundante e cotonoso
<i>I02</i>	1.30 d	Reddish yellow, com formação de anéis com coloração dark gray	Branca	Reddish yellow, formação de anéis com coloração black	Branca	Micélio ausente, com abundante esporulação de cor laranja
<i>I04</i>	1.67 b	Reddish yellow, com formação de anéis com coloração dark gray	Branca	Reddish yellow, formação de anéis com coloração black	Branca	Micélio presente aéreo, escuro, com abundante de cor laranja
<i>I06</i>	1.70 b	Reddish yellow, com formação de anéis com coloração dark gray	Branca	Reddish yellow, formação de anéis com coloração black	Branca	Micélio presente, aéreo, branco, com abundante esporulação de cor laranja
<i>I07</i>	1.58 b	Light olive gray, com formação de anéis de coloração reddish yellow	Branca	Very Dark greenish gray, com light greenish gray	Light greenish gray	Micélio presente, aéreo, cinza com moderada esporulação de cor laranja e pontuações escuras
<i>I08</i>	1.87 a	Very dark grayish brown no centro, com formação de anéis com coloração reddish yellow	Branca	Very dark grayish brown no centro, coloração pale brown ao redor, e formação de anéis reddish yellow	Pale brown	Micélio presente, aéreo, branco e reduzido
<i>I09</i>	1.27 d	Light red	Light white	Light red	Branca	Micélio ausente, com abundante esporulação de cor laranja
<i>I10</i>	1.71 b	Dark gray	Pale Brown	Reddish yellow, com formação de anéis	Pinkish white	Micélio presente, aéreo, moderadamente abundante e

						escuro
<i>I11</i>	1.89 a	Light olive gray, com formação de anéis de coloração reddish yellow	Branca	Grayish brown, com formação de anéis pale brow e reddish yellow	Pale Brown	Presente, aéreo, abundante, com coloração levemente escura
<i>I12</i>	1.80 a	Gray no centro, white ao redor	Branca	Reddish yellow no centro, com formação de anéis pale brown gray	Pale Brown	Presente, cottonoso, abundante e levemente escuro.
<i>I461</i>	1.64 b	White	Branca	Light gray no centro, pale yellow ao redor	Branca	Presente, cottonoso, moderadamente abundante, moderadamente escuro
<i>P11</i>	1.62 b	Gray	Branca	Black, com formação de anéis de coloração olive gray	Branca	Presente, aéreo, moderadamente abundante, escuro
<i>P17</i>	1.33 d	Reddish yellow, com formação de anéis com coloração dark gray	Branca	Reddish yellow, com formação de anéis black	Branca	Ausente, com esporulação de cor laranja e pontuações de cor escura
<i>P18</i>	1.80 a	White	Branca	Pale Brown com formação de anéis de coloração reddish yellow	Branca	Presente, aéreo, cottonoso, abundante, branco
<b>Endofíticos</b>						
<i>I13</i>	1.86 a	Dark gray (4/1)	Branca	Black	Branca	Presente, aéreo, moderadamente abundante e escuro
<i>I16</i>	1.36 d	Gray no centro (7/1), white ao redor (N/9.5)	Branca	Reddish yellow no centro, com pontuações very dark gray e pale brown ao redor, com esporulação de cor laranja	Branca	Presente, aéreo, levemente escuro
<i>I17</i>	1.40 c	Dark gray (4/1)	Branca	Olive Gray no centro, com coloração pale yellow ao redor	Branca	Presente, aéreo, reduzido, moderadamente escuro
<i>P01</i>	1.71 b	Gray	Branca	Olive gray, com pontuações very dark	Branca	Presente, cottonoso,

				gray e reddish yellow no centro		moderadamente abundante, moderadamente escuro
P07	1.40 c	Gray	Pale Brown	Olive gray, com formação de anéis de coloração olive gray	Pale yellow	Presente, moderadamente claro reduzido,
P09	1.50 c	Gray	Pale Brown	Grayish Brown	Pale Brown	Presente, reduzido, escuro
P10	1.50 c	Gray	Pale Brown	Black	Pale Brown	Presente, aéreo, cottonoso, escuro
P12	1.70 b	Gray	Branca	Black com formação de anéis de coloração olive gray	Branca	Presente, cottonoso, moderadamente abundante, moderadamente escuro
P13	1.80 a	Dark gray	Black	Black	Black	Presente, reduzido, escuro
<b>Referência</b>						
C. glo	1.29 d	Reddish yellow, com formação de anéis com coloração dark gray	Branca	Reddish yellow no centro, black ao redor	Branca	Presente, aéreo, moderadamente escuro, esporulação de cor laranja no centro
C. fra	1.80 a	White	Branca	Reddish yellow no centro, light brown com pale brown	Branca	Presente, aéreo, cottonoso, abundante, branco
C. bra	1.42 c	Reddish yellow, com formação de anéis com coloração dark gray	Pale Brown	ReddishYellow, com pontuações black	Pale Brown	Ausente, com esporulação de cor laranja

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de significância de 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Características morfológicas dos isolados patogênicos, endofíticos e de referência de *Colletotrichum*.

Isolado	Conídio			Apressório		
	Formato	Tamanho (µm) *	Relação (C/L)	Formato	Tamanho (µm) **	Relação (C/L)
<b>Patogênico</b>						
<i>I01</i>	obl./cilin.	13,6 x 4,1	3,4	lev.lob/arred.	7,7 x 5,8	1,3
<i>I02</i>	obl./cilin.	14,4 x 4,5	3,2	lev.lob/arred.	8,5 x 6,5	1,3
<i>I04</i>	obl./cilin.	13,3 x 5,1	2,6	lev.lob/arred./lob	10,6 x 7,2	1,5
<i>I06</i>	obl./cilin.	13,8 x 5,0	2,8	lev.lob/arred.	9,7 x 7,5	1,6
<i>I07</i>	obl./cilin.	13,8 x 5,2	2,7	lev.lob/arred./lob	8,6 x 6,8	1,3
<i>I08</i>	obl./cilin.	11,5 x 4,7	2,5	lev.lob/arred.	8,6 x 6,7	1,3
<i>I09</i>	Constricto	11,9 x 5,2	2,3	lev.lob/arred.	7,6 x 6,1	1,3
<i>I10</i>	obl./cilin.	13,2 x 4,2	3,2	lev.lob/arred./lob	9,8 x 7,2	1,4
<i>I11</i>	obl./cilin.	13,1 x 4,8	2,7	lev.lob/arred.	9,9 x 7,8	1,3
<i>I12</i>	obl./cilin.	13,4 x 4,8	2,8	lev.lob/arred.	9,8 x 7,7	1,3
<i>I461</i>	obl./cilin.	12,2 x 4,4	2,8	lev.lob/arred.	9,9 x 7,3	1,4
<i>P11</i>	obl./cilin.	12,5 x 4,8	2,6	lev.lob/arred.	9,6 x 6,7	1,4
<i>P17</i>	obl./cilin.	13,0 x 4,6	2,9	lev.lob/arred.	8,0 x 6,2	1,3
<i>P18</i>	Clavado	12,5 x 5,1	2,5	lev.lob/arred./lob	10,8 x 7,1	1,5
<b>Endofíticos</b>						
<i>I13</i>	obl./cilin.	11,4 x 5,0	2,3	lev.lob/arred./lob	9,0 x 6,7	1,4
<i>I16</i>	obl./cilin.	12,6 x 5,6	2,3	lev.lob/arred./lob	8,2 x 6,9	1,2
<i>I17</i>	obl./cilin.	11,9 x 5,1	2,4	lev.lob/arred./lob	8,6 x 6,8	1,3
<i>P01</i>	obl./cilin.	11,4 x 5,0	2,5	lev.lob/arred./lob	11,1 x 7,2	1,6
<i>P07</i>	obl./cilin.	9,5 x 5,4	1,8	Não formado	-	-
<i>P09</i>	Constricto	9,4 x 5,0	1,9	lev.lob/arred./lob	9,9 x 7,0	1,4
<i>P10</i>	Constricto	11,8 x 3,1	3,9	lev.lob/arred./lob	9,2 x 7,0	1,3
<i>P12</i>	obl./cilin.	11,3 x 4,6	2,7	lev.lob/arred.	10,3 x 7,3	1,5
<i>P13</i>	obl./cilin.	11,3 x 4,4	2,6	lev.lob/arred.	10,1 x 6,4	1,6
<b>Referência</b>						
<i>C. glo</i>	obl./cilin.	13,4 x 5,2	2,6	lev.lob/arred.	9,7 x 6,4	1,5
<i>C. fra</i>	clavado	15,8 x 4,9	3,3	lev.lob/arred.	11,0 x 7,6	1,5
<i>C. bra</i>	obl./cilin.	13,4 x 4,9	2,7	lev.lob/arred./lob	8,8 x 6,5	1,4

\*Média das dimensões de 50 conídios;

\*\* Média das dimensões de 50 apressórios;

Formato dos conídios: obl. = oblongo; cilin. = cilíndrico

Formato dos apressórios: lev.lob. = levemente lobado; lob. = lobado; arred. = arredondado.

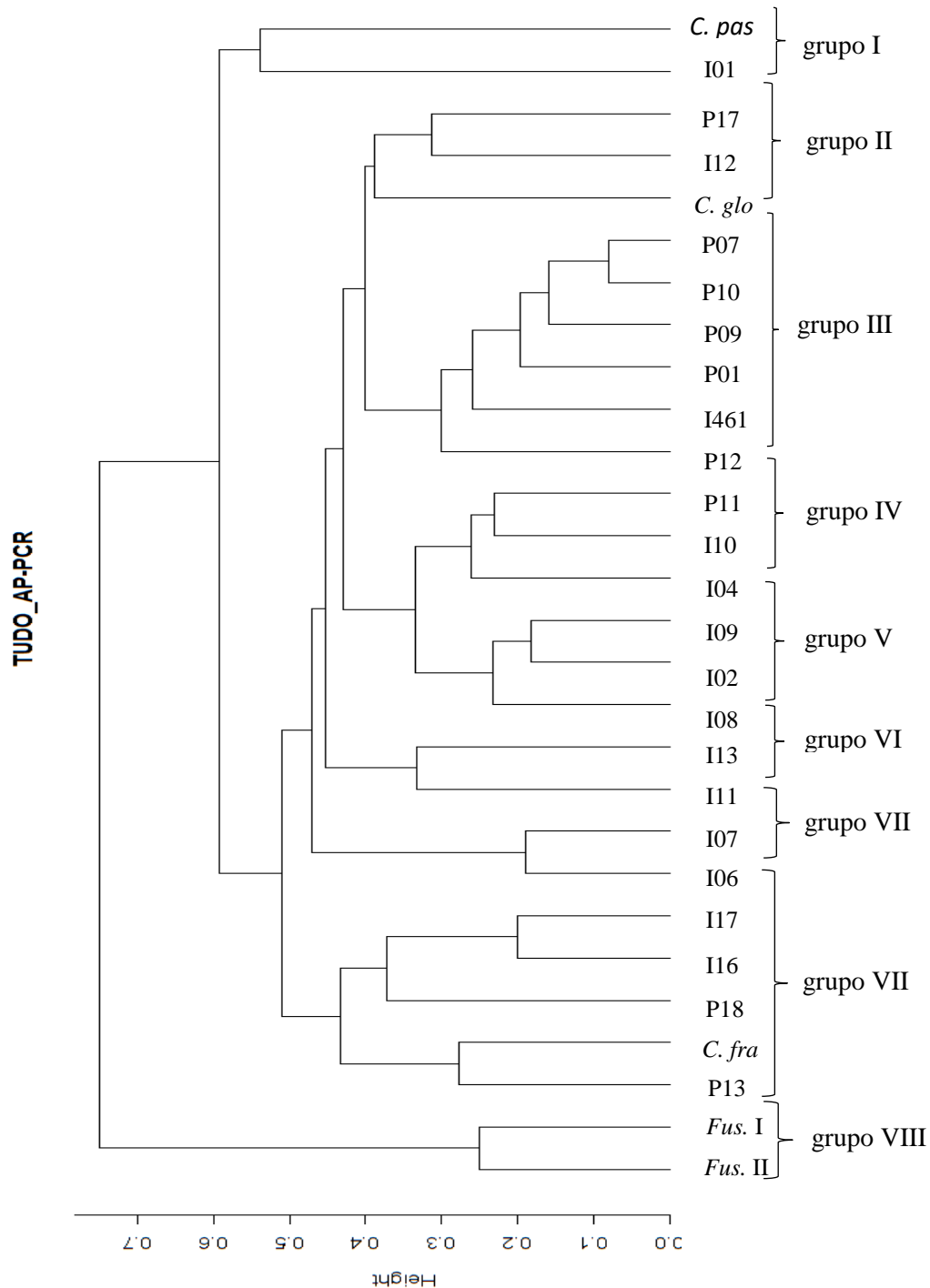
## 4.2. Genotipagem

A genotipagem dos isolados foi realizada com três oligonucleotídios arbitrários (GACA<sub>4</sub>, GTG<sub>5</sub> e M13). Não foram analisadas as bandas consideradas fracas. Os *loci* AP-PCR analisados encontravam-se no intervalo de 250 a 1550 pb. O oligonucleotídio GTG<sub>5</sub> foi o que gerou maior número de bandas polimórficas, seguido do M13 e GACA<sub>4</sub>.

O dendrograma gerado a partir dos perfis de amplificação do GTG<sub>5</sub>, GACA<sub>4</sub> e M13 (Figura 6) apresentou coeficiente de correlação fonética de 0,86 e similaridade genética de 99% para os isolados de *Colletotrichum* spp. e 100% para os isolados de *Fusarium* spp., além disso mostrou oito grupos distintos, um contendo os *Fusarium* spp. (*Fus. I* e *Fus. II*), que foram utilizados como critério de comparação, e os demais contendo os *Colletotrichum* spp., sendo o grupo I contendo um isolado patogênico (I01) e um referência (*C. Pas.*); grupo II sendo dois isolados patogênicos (P17 e I12) e um referência (*C. glo.*); grupo III foi o que maior englobou os isolados endofíticos contendo cinco isolados (P01, P07; P09; P10 e P12) e um isolado patogênico (I461); grupo IV com cinco isolados patogênicos (I02, I04, I 08, I09, I10 e P11); grupo V com um isolado patogênico (I11) e um isolados endofítico (I13); grupo VI com dois isolados patogênicos (I07 e I06); grupo VII com três isolados endofíticos (I16, I17 e P13), um patogênico (P18) e um isolado de referência (*C. fra.*).

A maioria dos isolados endofíticos, ficaram agrupados em um único grupo (grupo III), essa semelhança também pode ser observada no grupo formado pela análise das características morfoculturais (grupo 7). Não foi possível fazer uma correlação com as análises morfocultural e molecular com os isolados patogênicos. Bentes e Costa Neto (2011) estudando a variabilidade genética de *C. guaranicola* usando marcadores AFLP, constataram que os isolados patogênicos estudados pertencem à mesma espécie, no

entanto, foi observada variabilidade intra-específica. Cruz (2014) observou a partir da análise filogenética que os isolados patogênicos de *C. guaranicola* foram agrupados em dois grupos distintos, sendo alguns agrupados no complexo *C. boninense*, próximo a *C. netchii* e outros foram agrupados no complexo *C. gloeosporioides*, próximo a *C.*



**Figura 6.** Dendrograma construído pelo método UFGMA, usando o coeficiente de NEI e LI a partir dos perfis ISSR com iniciador GTG<sub>5</sub>, GACA<sub>4</sub> e M13 obtido de 26 isolados de *Colletotrichum* spp. e dois isolados de *Fusarium* spp.



Tao et al. (2013) estudaram 36 isolados de *Colletotrichum* endofíticos provenientes de um único hospedeiro *Bletilla ochracea*, com base na análise de filogenia e características morfológicas identificaram 17 espécies de *Colletotrichum*, sendo sete novas espécies (*C. bletillum*, *C. caudasporum*, *C. duyunensis*, *C. endophytum*, *C. excelsumaltitudum*, *C. guizhouensis* e *C. ochracea*) e oito espécies já descritas anteriormente (*C. boninense*, *C. cereale*, *C. destructivum*, *C. karstii*, *C. liriopes*, *C. miscanthi*, *C. tofieldiae* e *C. parsonsiae*) e dois micélios estéreis. Lima et al. (2012) estudando 39 isolados endofíticos de pimenteira observaram que a partir da análise filogenética a existência de três complexos: *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. simmondsii*. Manamgoda et al. (2013) investigou a ocorrência de espécies de *Colletotrichum* como fungos endofíticos em duas espécies de gramíneas (*Pennisetum purpureum* e *Cymbopogon citratus*) através da análise filogenética, e observaram a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum*, sendo *C. fructicola*, *C. tropicale* e *C. siamense* com *P. purpureum*, e *C. fructicola* e *C. siamense* com *C. citratus*. Os mesmos autores descreveram a ocorrência de uma nova espécie, *C. endophytica* spp. Novembro, associado com *P. purpureum*.

No estudo de Peres et al. (2003) foi avaliada a variabilidade morfocultural e genética por meio de marcadores AFLP, de fungos associados à podridão peduncular em mamoeiro (*Carica papaya* L.), incluindo *C. gloeosporioides*, evidenciou uma ampla variabilidade morfológica entre os isolados, não havendo relação entre as características morfológicas e as análises moleculares. Thaung (2008) citou que os dados morfológicos de alguns *Colletotrichum* não estavam ocasionalmente de acordo com os dados moleculares, e explicou que essa discordância pode ser atribuída à capacidade limitada para detectar as variações genéticas, e recomendou o uso de outras técnicas alternativas para dissipar as dúvidas e demonstrar a conformidade entre a análise morfológica com a

molecular. Du et al. (2005) e Crouch et al. (2009) relataram que as espécies de *Colletotrichum* através de estudos moleculares e morfológicos são complexos de espécies morfológicamente indistinguíveis, sendo fundamental a identificação molecular.

Than et al. (2008) afirmaram que a caracterização no gênero *Colletotrichum* tem que ser associado com a filogenia, análise morfocultural e fisiológico. Nguyen et al. (2010) ao combinar caracterização morfológica e molecular conseguiram identificar três espécies diferentes, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. boninense*, associadas à antracnose a doença de *Coffea* spp. no Vietname, além disso verificaram que todos os isolados encontrados foram patogênicos às bagas verdes de café depois da inoculação, afirmando que mais de uma espécie de *Colletotrichum* ataca o mesmo hospedeiro. Phoulivong et al. (2010) ao fazerem análise filogenética de vinte e cinco isolados de *Colletotrichum*, constataram evidências de que uma planta pode muitas vezes hospedar mais de uma espécie de *Colletotrichum*, como também foi observado por Watanabe et al. (2016) que os isolados *C. siamense* e *C. truncatum*, são patogênicos para *Mandevilla* spp. provenientes do Japão.

Rojas et al. (2010) estudando diferentes isolados endofíticos e patogênicos de *C. gloeosporioides*, concluíram que apenas os caracteres moleculares foram consistentes em delinear de forma única e diferenciadora quando comparado com a identificação morfológica, ou seja, não sendo possível diferenciar os isolados patogênicos e endofíticos, além disso, constatou a partir dos dados de filogenia que os endofíticos identificados anteriormente como *C. gloeosporioides* tratavam-se de uma outra espécie, *C. tropicale* sendo esta uma espécie endofítica comum na floresta Panamá, que ocorre de forma assintomática em uma ampla gama de hospedeiros.

Baayen et al. (2002) investigaram linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia citricarpa* e *Guignardia* spp. isoladas de várias espécies vegetais na África, América, Ásia e Austrália comparando-as através de parâmetros morfológicos e moleculares. Os resultados morfológicos e as análises dos resultados de seqüenciamento das regiões ITS e AFLP agruparam os isolados em quatro conjuntos. A alta variabilidade genética encontrada entre os quatro grupos pesquisados apontou para a existência de pelo menos três espécies distintas de *Guignardia*, morfológicamente muito semelhantes, co-existindo em *Citrus* spp.

Observando os resultados obtidos da genotipagem e a análise morfológica realizadas, percebeu haver diferenças entre os isolados estudados, e a possibilidade de existir mais de uma espécie tanto nos isolados endofíticos quanto nos patogênicos, entretanto, a genotipagem não permitiu identificar a nível de espécie, e confirmar se fazem parte de um complexo como observado por Cruz (2014) ou se existe diferentes espécies de *Colletotrichum*, podendo até mesmo ocorrer a existência de uma nova espécie ainda não identificada, como foi observado por Tao et al. (2013) e Manamgoda et al. (2013).

Segundo Velho et al. (2015) a análise molecular multilocus parece ser essencial para a correta identificação da espécie *Colletotrichum*. Shena et al. (2014) afirmaram que as sequências da região ITS, anteriormente propostas como o código de barras oficial para o DNA fúngico, por si só não são aceitas porque não podem separar filogeneticamente as espécies. Manamgoda et al. (2013) afirmaram que utilizando a combinação de ACT, CAL, GAPDH, e ITS permitiu identificar a maioria dos isolados a nível de espécie para o gênero *Colletotrichum*. Weir et al. (2012) resolveram o complexo *C. gloeosporioides* em 22 espécies utilizando filogenia multilocus. Como também até agora, houve um enorme progresso significativo no complexo das espécies

*C. acutatum* (DAMM et al., 2012b), *C. boninense* (DAMM et al., 2012a), e algumas espécies crípticas em *Colletotrichum* que foram divulgadas usando análise filogenética multilocus (PHOULIVONG et al., 2010b; ROJAS et al., 2010; WEIR et al., 2012). Portanto, sugere-se um estudo mais aprofundado utilizando a análise filogenética multilocus para identificação das espécies, considerando a grande diversidade observada na genotipagem e na análise morfológica.

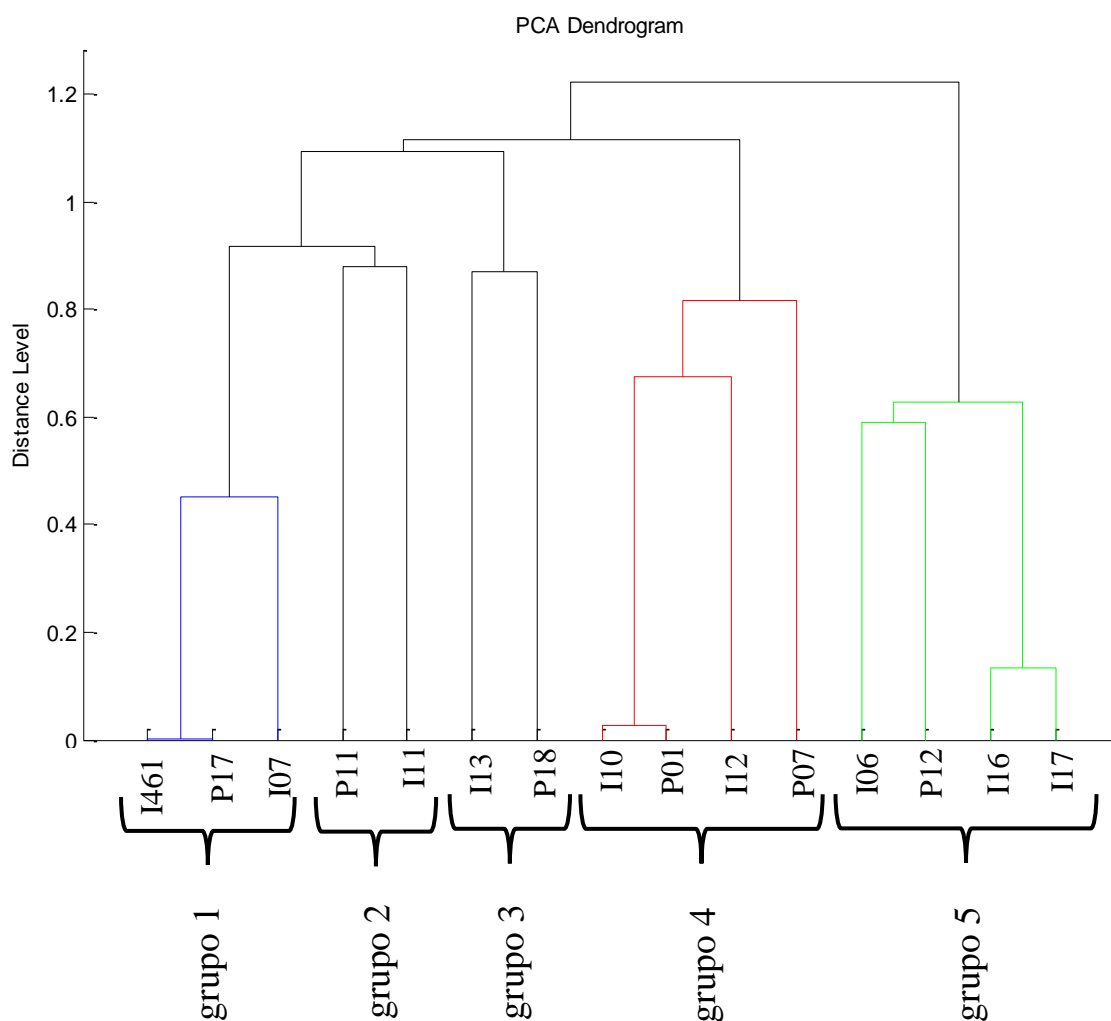
### **4.3. MALDI-TOF MS**

O dendrograma gerado por espectrometria de massa MALDI-TOF foi composto de 15 isolados, sendo oito patogênicos e sete endofíticos. Foram analisados 23 isolados de *C. guaranicola*, porém oito isolados não foram possíveis produzir espectros devido à dificuldade de extração de suas proteínas ribossômicas.

Wieser et al. (2012) citaram que a identificação de fungos usando a técnica MALDI-TOF deve ser padronizada e que as várias formas de crescimento do fungo, tais como micélio e conídios, podem complicar a análise devido a diferença na composição das proteínas, sendo necessários ajustes e otimizações para um melhor desempenho do MALDI-TOF MS. Além disso, os mesmos autores destacaram que em alguns casos, uma amostra pode ter uma parede celular rígida, dificultando a obtenção das proteínas ribossomais para análise, além de não proporcionar um perfil mais bem definido. Realmente, nos resultados obtidos frutos das análises por MALDI-TOF MS de oito dos isolados estudados na presente tese, apresentaram essa limitação na extração de proteínas, como referido anteriormente. Possivelmente, essa dificuldade foi devida à rigidez da parede celular fúngica.

Para a identificação das subespécies, métodos de agrupamento são convencionalmente usados, e os resultados são visualizados através de dendrogramas (SAUER et al., 2008). Sendo assim, o dendrograma da análise de MALDI-TOF

permitiu separar os isolados em cinco grupos, conforme pode ser observado na figura 7. O primeiro grupo formado representa três isolados patogênicos (I461; P17; I 07). O segundo grupo é composto por dois isolados patogênicos (P11 e I13). O terceiro grupo compõe um isolado patogênico (I13) e um endofítico (P18). O grupo 4 com dois isolados patogênicos (I10 e I12) e dois isolados endofíticos (P01 e P07), já o grupo 5, conta com três isolados endofíticos (P12; I16 e I17) e um isolado patogênico (I06).



**Figura 7.** Dendrograma baseado em análises de espectrometria de massas MALDI-TOF dos isolados de *Colletotrichum guaranicola* patogênico e endofítico.

A maioria dos dados obtidos não corroboram os dados obtidos pelas análises de biologia molecular, exceto os resultados dos isolados do grupo 3 (I13 e P18) que foram similares aos do grupo VI, o P01 e o P07 foram agrupados no grupo III e o I16 e I17 que foram agrupados juntos no grupo VIII. Os resultados aqui obtidos são realmente relevantes, pois chamam a atenção para a possibilidade de a técnica de MALDI-TOF MS não ser suficientemente robusta e eficaz na separação de isolados de *C. guaranicola*. Esta observação torna-se mais acentuada quando se tem em consideração que tanto no Brasil quanto em outros países, a referida técnica já é utilizada como uma ferramenta de rotina na identificação de micro-organismos. Sendo mesmo usada como uma das metodologias de identificação na abordagem polifásica de identificação de micro-organismos (SANTOS et al., 2010; DIAS et al., 2011; SIMÕES et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2015; CHANG et al., 2016).

Segundo Silva et al. (2015) o uso da abordagem polifásica, incluindo características fenotípicas, análise molecular e espectral por MALDI-TOF MS faz-se necessário e indispensável para a caracterização de fungos do gênero *Aspergillus* secção *Flavi*, sendo possível ao final da pesquisa dividir os isolados em três grupos: *A. flavus*, *A. parasiticus*, e *A. tamarii*.

De acordo com Chang et al. (2016) a técnica MALDI-TOF MS foi essencial para identificação ao nível de espécie de isolados de *F. verticillioides* isolados de milho no Estado de Pernambuco. Quando comparados com os dados de biologia molecular, os autores concluíram que a técnica de MALDI-TOF MS foi tão rigorosa quanto as metodologias moleculares usadas. Oliveira et al. (2015) identificaram 70 isolados a partir da técnica de MALDI-TOF MS, e concluíram que o uso da ferramenta proporcionou a identificação correta ao nível de espécie do complexo *Sporothrix*.

A técnica de MALDI-TOF MS é bastante robusta na identificação de fungos ao nível de espécie. Contudo, em determinados casos é possível a diferenciação desses micro-organismos ao nível de cepa (SANTOS e LIMA, 2010; DIAS et al., 2011). Leli et al. (2013) afirmaram que através da técnica de MALDI-TOF MS, foi possível identificar corretamente 100 (91,7%) dos isolados fúngicos por eles analisados. Neste caso, 85 (77,9%) ao nível de espécie, e 15 (13,8%) no nível de gênero.

De Respinis et al. (2010) avaliaram a técnica de MALDI-TOF na identificação do gênero *Trichoderma* e compararam posteriormente os resultados com a análise de sequenciamento. Esses autores observaram resultados aproximados entre os dados obtidos pela técnica de MALDI-TOF MS e pela biologia molecular. De acordo com os dados apresentados pelos autores, a técnica de MALDI-TOF MS apresenta-se como um complemento útil para determinação de limites de espécie, considerando que existe uma grande dificuldade na diferenciação de espécies do gênero *Trichoderma*.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na presente tese, a análise por espectrometria de massas pela técnica de MALDI-TOF MS demonstrou que os isolados endofíticos foram agrupados com isolados patogênicos. Ou seja, não houve distinção entre os isolados endofíticos e patogênicos. Não foi possível correlacionar os resultados obtidos com a genotipagem, tendo em vista que a técnica molecular utilizada neste estudo não permitiu identificar os isolados ao nível de espécie. Neste caso, por tratarem-se de espécies ainda não descritas para a ciência, o que figuraria uma limitação nas informações disponíveis nos bancos de dados usados, tanto para a biologia molecular, quanto para o MALDI-TOF MS.

Neste sentido, o nome do patógeno do guaranazeiro foi mantido, uma vez que *C. guaranicola* ainda não pode ser separado em novas espécies a partir da metodologia utilizada. A utilização de outros métodos moleculares estão sendo alvo de estudos para

identificar espécies no gênero *Colletotrichum*, sendo sugeridos atualmente a identificação através da análise filogenética multilocus, por causa do alto nível de similaridade genética entre algumas espécies de *Colletotrichum* (WEIR et al., 2012; MANAMGODA et al., 2013; VELHO et al., 2015). Com isso, para a confirmação precisa desses resultados, faz-se necessário o sequenciamento dos isolados a fim de validar e correlacionar os dados espectrais de MALDI-TOF MS obtidos. De acordo com Santos et al. (2010) os dados da análise molecular e MALDI-TOF devem gerar resultados congruentes para validar as identificações obtidas.



## 5. CONCLUSÃO

As características morfoculturais dos isolados endofíticos e patogênicos deste estudo são heterogêneas não permitindo separar isolados patogênicos e endofíticos com base nessas características;

A genotipagem permitiu confirmar que todos os isolados pertencem a um único gênero *Colletotrichum*, entretanto, não permitiu identificar os isolados a nível de espécie para o gênero. Conforme literaturas recentes, recomenda-se a análise filogenética multilocus para identificação das espécies;

A espectrometria de massas pela técnica de MALDI-TOF MS demonstrou que os isolados endofíticos foram agrupados com isolados patogênicos, não havendo distinção entre patogênicos e endofíticos.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F.C. Antracnose do guaraná. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Serviço de Informação Agrícola, p. 22, 1961.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 382, 2007.
- ANDRADE, E.; UESUGI C.; UENO B.; FERREIRA M. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. Fitopatol. Bras. v. 32, p.21-23, 2007.
- ARAÚJO, L.; GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytoparasitica, v.42, p. 631–640, 2014.
- ARNOLD A. E.; MEJÍA L. C.; KYLLO D.; ROJAS E. I.; MAYNARD Z.; ROBBINS N., HERRE E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proc Natl Acad Sci USA, v. 100, n. 26, p. 15649–15654, 2003.
- ARX, J.A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathologische Z., v. 29, p. 413– 468, 1957.
- BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL,G.C.; et al. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), Phytopathology, St. Paul, v.92, n. 5, p. 464-477, 2002.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. England: CAB Internacional Wallingford, p. 388, 1992.
- BALTIMORE, M. Munsell Color chart, 1975, p. 24, 1975.
- BENTES, J.L.S.; COSTA NETO, P.Q.C. Variability of *Colletotrichum guaranicola* using AFLP markers. Acta Amazônica, v. 41, p. 251–256, 2011.
- 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.
- CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.; et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity, v. 39, p.183-204, 2009.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: Prusky D, Freeman S, Dickman M (eds) *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS Press, St Paul, p. 1–20, 2000.

CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR B.S. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, v. 73, p. 181–213, 2012.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHANG, S.; CARNEIRO-LEÃO, M.P.; OLIVEIRA, B.F.; LIMA, N.; SANTOS, C.; et al. Polyphasic Approach Including MALDI-TOF MS/MS Analysis for Identification and Characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian Corn Kernels. *Toxins*, v. 8, n.3, doi: 10.3390, 2016.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B.; WHITE, J.F.; HILLMAN, B.I. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. *Mycologia*, v. 101, p.717-732, 2009.

CRUZ, A. A. Características morfo-culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque. Procedentes do Estado do Amazonas. Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, p. 105, 2014.

COX, M. L; IRWIN, A. G. Conidium and aprssorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. *Australian Systematic Botany*, Collingwood, v. 1, n.2, p. 139 -149, 1988.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud Mycol*, v. 73, p. 1–36, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, v. 73, p. 37–113, 2012b.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; LIU, F.; BARRETO, R.W.; GUATIMOSIM, E.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: important pathogens of field and weeds. *Fungal Divers*, v. 61, p. 29–59, 2013.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, v. 13, p. 414–430, 2012.

DE RESPINIS, S.; VOGEL, G.; BENAGLI, C.; TONOLLA, M.; PETRINI, O.; SAMUELS, G.J. MALDI-TOF MS of Trichoderma: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, v.9, p. 79-100. 2010.

DIAS, N.; SANTOS, C.; PORTELA, M.; LIMA, N. Toenail onychomycosis in a Portuguese geriatric population. *Mycopathologia*, v.172, p. 55-61. 2011.

DU, M.Z.; SCHARDL, C.L.; VAILLANCOURT, L.J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia*, v. 97, p. 641-658, 2005.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; CORRÊA, M.P.F. Variações morfológicas e fisiológicas em isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 141-144, 1995.

FAEDDA, R.; AGOSTEO, G.E.; SCHEN, A L.; MOSCA, S.; FRISULLO, S.; MAGNANO DI SAN LIO, G.; CACCIOLA, S.O. *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 50, p. 283–302, 2011.

FARR, D.F.; AIME, M.C.; ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E. Species of *Colletotrichum* Agavaceae. *Mycological Research*, v. 110, p. 1395–1408, 2006.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Available at: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. ARS, USDA, 2013.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology*, v. 91, p. 986-992, 2001.

HERRE, E.A.; MEJÍA, L.C.; KYLLO, D.A.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; BUTLER, A.; VAN BAEL, S.A. Ecological implications of antipathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, v. 88, p. 50–558, 2007.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; et al. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity*, v. 39, p. 147-183, 2009.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal – Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Indicadore, IBGE, 2015. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br> >. Acesso em: 12 jan. 2016.

JAMES, R.S.; RAY, J.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G. *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola*, and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, p. 1-6, 2014.

JOHNSTON, P. R.; PENNYCOOK, S.R.; MANNING, M.A. Taxonomy of fruit-rotting fungal pathogens: what's really out there? *New Zealand Plant Protection*, v. 58, p. 42–46, 2005.

LELI, C.; CENCI, E.; CARDACCIA, A.; MORETTI, A.; et al. Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, n. 4, p. 205–209, 2013.

KO KO T.W. et al. The need for re-inventory of Thai phytopathogens. *Chiang Mai Journal of Science*. v.38, p.1-13, 2011.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D.J.; SANTOS, A.F.; VIDA J.B. Caracterização morfo-fisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. *Summa Phytopathologica*, v. 32, p.113-117, 2006.

MANAMGODA, D. S.; UDAYANGA, D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Divers*, v. 61, p. 107–115, 2013.

MEDEIROS, L.V.; MACIEL, D.B.; MEDEIROS, V.V.; HOULLOU KIDO, L.M.; OLIVEIRA, N.T. *pelB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. *Genet Mol Res*, v. 9, p. 661–673, 2010.

MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. from Japan. *Mycoscience*, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 47-53, 2003.

NGUYEN, P. T. H.; VINNERE PETERSSON, O.; OLSSON, P.; LILJEROTH, E. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam *European Journal of Plant Pathology*, v. 127, p. 73–87, 2010.

OLIVEIRA, M.M.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; LIMA, N.; et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Research in Microbiology*, v. 166, n. 2, p. 102–110, 2015.

PEREIRA, J. C. R.; ARAÚJO, J. C. A. Escala diagramática para quantificar a antracnose do guaranazeiro. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 2, 2009. (Embrapa Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico, 70).

PEREIRA, L.; DIAS, N.; SANTOS, C.; LIMA, N. The use of MALDI-TOF ICMS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* V. 32, p. 11–17. 2014.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Life styles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, v. 89, p. 784–796, 2005.

PERES, A.P.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Variabilidade morfo-cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. *Lavras: Ciências Agrotécnicas*, v.27, n.5, p.1053-1062, 2003.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag, p. 179-197. 1991.

PHOTITA, W.; TAYLOR, P.W.J.; FORD, R.; et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, v.18, p.117–133, 2005.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; PARINN, N.; CHEN, H.; ABD-ELSALAM, K.A.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. A new species of *Colletotrichum* from *Cordyline fruticosa* and *Eugenia javanica* causing anthracnose disease. *Mycotaxon*, v. 114, p. 247–257, 2010.

RAMDEEN, S.; RAMPERSAD, S. N. Intraspecific Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato based on in silico multilocus PCR-RFLP finger printing. *Mol Biotechnol.* v. 53, p. 170–181, 2013.

READER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 1, p. 17-20, 1985.

ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J.; VAN BAEL, S. A.; et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, v. 102, n. 6, p. 1318–1338, 2010.

SANTOS, C.; FRAGA, M.E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, v.161, p. 168-175. 2010.

SANTOS, C.; LIMA, N. A identificação de Fungos pela Espectrometria de Massa através da Técnica de MALDI-TOF ICMS. In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, p. 566-574. Brasília. 2010.

SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; KUBE, M; et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE*, v. 3, n. 7, e2843, 2008.

SAWANT, I.S.; NARKAR, S.P.; SHETTY, D.S.; UPADHYAY, A.; SAWANT, S.D. Emergence of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato as the dominant pathogen of anthracnose disease of grapes in India as evidenced by cultural, morphological and molecular data. *Australasian Plant Pathology*, v. 41, p. 493-504, 2012.

SCHENA, L.; MOSCA, S.; CACCIOLA, S.O.; FAEDDA, R.; SANZANI, S.M.; AGOSTEOA G.E.; SERGEEVA V.; MAGNANO DI SAN LIO G. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathol. Plant. Pathology*, v. 63, p. 437-446, 2014.

SILVA-ROJAS, H.V.; ÁVILA-QUEZADA, G.D. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, v. 60, p. 899–908, 2011.

SILVA, F.C.; CHALFOUN, S.M.; BATISTA, L.R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section Flavi strains isolated from food commodities in Brazil. *Ann. Microbiol.*, v. 65, p. 2119–2129, 2015.

SIMÕES, M.F.; PEREIRA, L.; SANTOS, C.; LIMA, N. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: Malik, A., Grohmann, E., Alves, M. Management of microbial resources in the environment. Springer, p. 91-117, 2013.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 1980.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey J. A., Jeger M. J. (eds) *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford, p. 1–26, 1992.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTIN, J. AND OLIVEIRA, H. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 2987-2998, 2005.

TAO, G.; LIU, Z.Y.; LIU, F.; GAO, Y.H.; CAI L. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with description of seven new species. *Fungal Divers*, v. 61, p. 139–164, 2013.

THAN, P.P.; JEEWON, R.; HYDE, K.D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P.W.J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp) in Thailand. *Plant Pathology*, v. 57, p. 562-572, 2008.

THAUNG, M.M. Coelomycete systematic with special reference to *Colletotrichum*. *Mycoscience*, v. 49, p. 345-350, 2008.

TOZZE JÚNIOR, H. J. Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 81p, 2007.

TOZZE, JR.; H.J., MELLO, M.B.A.; MASSOLA, JR. N.S. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops. *Summa Phytopathologica*, v. 32, p. 71-79, 2006.

VELHO, A.C.; ALANIZ, S.; CASANOVA, L.; MONDINO, P.; STADNIK, M. J. New insight into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology* xxx, p. 1-16, 2015.

VÉRAS, S.M.; GASPAROTTO, L. E.; MENEZES, M. Physio-morphological variability of *Colletotrichum guaranicola* on different substrates. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 40, p. 297-305, 1997.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 965-974, 2012.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol*, v. 73, p. 115–18, 2012.

XIE, L.; ZHANG, J.Z.; WAN, Y.; HU, D.W. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *Journal of Zhejiang University Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, v.11, p. 61–70, 2010.

YANG, Y.L.; LIU, Z.Y.; CAI, L.; HYDE, K.D.; YU, Z.N.; MCKENZIE, E.H.C. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. *Fungal Diversity*, v. 39, p. 123–146, 2009.



Atividade enzimática e processo inicial de  
infecção de *Colletotrichum guaranicola*  
patogênicos e endofíticos

---

**CAPÍTULO II**

## RESUMO

O fungo *Colletotrichum* pode causar doenças e também ocorrer de forma assintomática em diversos órgãos aéreos de uma ampla gama de plantas hospedeiras. Estudo envolvendo a origem, forma de penetração e colonização de fungos endofíticos ainda são poucos discutidos, principalmente envolvendo a ação de enzimas neste processo de penetração. Com este trabalho, objetivou-se identificar se existe diferença na atividade enzimática de *C. guaranicola* endofítico e patogênico relacionada com o processo de infecção em *Paullinia cupana*. Foram avaliadas as atividades protease, amilase, pectinase, polifenol oxidase (POL), lipase e celulase de 14 isolados patogênicos e 9 isolados endofíticos de *C. guaranicola*, obtidos a partir de folhas de guaranazeiro sadias e com sintomas de antracnose. Como testemunha, foram usadas placas apenas com discos de meio de cultura sem o fungo. O delineamento experimental para cada ensaio foi inteiramente casualizado com 23 tratamentos (isolados) e 5 repetições. A avaliação foi semi-quantitativa pela medição do halo de degradação formado em cada ensaio. Foi estudado o processo de infecção de *C. guaranicola*, sendo utilizado um isolado patogênico (I06) e um endofítico (P10), em folhas de guaranazeiro de clone suscetível à antracnose, visando detectar diferenças nos eventos de pré-penetração e colonização dos tecidos que possam ser relacionados com mecanismo de patogenicidade do fungo. Os conídios foram avaliados quanto à germinação e a formação de apressórios, sendo avaliados 100 conídios de cada isolado escolhidos aleatoriamente. De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença enzimática entre os isolados patogênicos e endofíticos. Portanto, estes resultados sugerem a necessidade de intensificar-se a busca por metodologias referentes a quantificação exata dessas enzimas, para posteriormente correlacioná-las com a patogenicidade. Os dados de pré-germinação mostraram haver diferença entre os isolados endofíticos e patogênicos. A colonização dos tecidos pelo isolado patogênico foi evidenciada pelo surgimento dos sintomas 48 h.a.i. e, nas amostras inoculadas com o isolado endofítico, foi observada a presença de apressórios na superfície da epiderme 48 h.a.i., não sendo observada a colonização de células.

**Palavras chave:** Histologia; antracnose; enzimas; patogenicidade.

## ABSTRACT

The *Colletotrichum* and fungus can cause diseases and also occur asymptotically in various aerial organs of a wide range of host plants. Study of the origin, form of penetration and colonization of endophytic fungi are still few discussed, mostly involving the action of enzymes in the penetration process. This study aimed to identify whether there are differences in the enzymatic activity of *C. guaranicola* endophytic and pathogenic related to the infection process in *Paullinia cupana*. Protease activities were evaluated, amylase, pectinase, polyphenol oxidase (POL), lipase and cellulase pathogenic isolates 14 and 9 endophytic *C. guaranicola* obtained from leaves of healthy guarana and anthracnose symptoms. As a control, plates were used with only medium disks of culture without the fungus. The experimental design for each test was completely randomized with 23 treatments (isolated) and 5 repetitions. The evaluation was semi-quantitatively by measuring the halo formed of degradation in each assay. It was studied *C. Guaranicola* infection process, and used a pathogenic isolate (I06) and an endophytic (P10), in leaves of guarana of susceptible clone to anthracnose, to detect differences in the pre-penetration events and colonization of tissues they can be related to pathogenicity of the fungus mechanism. Spores were evaluated for germination and the formation of appressoria, being evaluated 100 conidia of individual chosen at random. According to the results, there was no difference between the enzyme and pathogenic isolates endophytic. Therefore, these results suggest the need to step up the search for methodologies for the exactly quantification of these enzymes, subsequently correlates them with the pathogenicity. The pre-germination data showed no difference between endophytic and pathogenic isolates. The colonization of the tissue by isolated pathogen was shown by the appearance of symptoms 48 h.a.i. and in isolated samples inoculated with endophyte was observed in the presence of appressoria epidermal surface 48 h.a.i., the colonization of cells was not observed.

**Keywords:** Histology; anthracnose; enzymes; pathogenicity.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*) engloba muitas espécies causadoras de doenças em uma gama de hospedeiras, incluindo culturas importantes (BAILEY; JEGER, 1992; NGUYEN et al., 2010). Dentre as doenças causadas por este grupo de fungos está a antracnose do guaranazeiro, causada por *C. guaranicola* Albuquerque, um dos principais fatores limitantes para a expansão da produção de guaraná no Estado do Amazonas (ARAÚJO et al., 2007; BENTES; COSTA NETO, 2011). O manejo da doença tem sido feito com o uso de clones resistentes recomendados pela EMBRAPA, com podas fitossanitárias e uso de fungicidas (ARAÚJO et al., 2007; EMBRAPA, 2014).

Os fungos endofíticos são aqueles que colonizam o tecido interno das plantas sem causar danos aparentes (PETRINI et al., 1992; CARVALHO et al., 2016). O fungo *Colletotrichum* pode causar doenças e ocorrer de forma assintomática em diversos órgãos aéreos de uma ampla gama de plantas hospedeiras (HYDE et al., 2009; DOYLE et al., 2013). Em folhas de guaranazeiro já foi relatado o fungo *Colletotrichum* tanto na forma endofítica quanto patogênica (COSTA NETO, 2009).

A patogenicidade está vinculada à capacidade do micro-organismo de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar os compostos presentes nas plantas (MARTINEZ et al., 2009). Durante a penetração e colonização os fungos fitopatogênicos são capazes de secretar uma variedade de enzimas, que irão atuar na degradação das cutículas e das paredes celulares, auxiliando na colonização dos tecidos e conseqüentemente o aparecimento de sintomas (KIKOT et al., 2009). Deste modo as enzimas degradadoras estão provavelmente envolvidas na maioria das doenças de plantas conhecidas. Estudo envolvendo a origem, forma de penetração e colonização de fungos endofíticos ainda são poucos, principalmente envolvendo a ação de enzimas neste processo de penetração.

Schulz e Boyle (2005) levantaram uma hipótese que a colonização assintomática é consequência da interação antagônica balanceada entre o vegetal e os fungos, e que os endofíticos produzem exoenzimas necessárias para colonizar o hospedeiro e a maioria é capaz de também produzir micotoxinas fitotóxica. Wagner e Lewis (2000) e Sieber (2007) citaram que a entrada de micro-organismos endofíticos é similar ao processo dos patogênicos, onde os estágios iniciais de desenvolvimento do fungo durante o processo de infecção são essencialmente o mesmo para todas as espécies de *Colletotrichum* (JEFFRIES et al., 1990; PRUSKY et al., 2000).

A colonização endofítica tem sido relatada como sendo intracelular e limitada a poucas células, intracelular e localizada ou ainda inter e intracelular sistêmica e pode se desenvolver em qualquer órgão do vegetal (MARINHO et al., 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005; JOHRI, 2006).

Como uma forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos se faz necessário, dentre outros fatores, a detecção de enzimas extracelulares, a fim de obter diferenças quando comparadas com fungos que são causadores de doenças. Anand et al. (2008) esclareceram que os fatores relacionados à patogenicidade irão depender exclusivamente da estratégia de invasão e colonização utilizada pelo patógeno e podem estar diretamente ligados com a capacidade de um agente patogênico em produzir enzimas específicas que irão determinar o grau de degradação da parede celular durante patogênese, podendo sua inibição afetar o desenvolvimento da doença. O estudo comparativo da atividade enzimática de *C. guaranicola* patogênico e não patogênico *in vitro* e sua relação com o processo de infecção, podem esclarecer mecanismos enzimáticos relacionados com a patogenicidade, fornecendo subsídios para o estabelecimento de estratégias de manejo do patógeno e para o conhecimento dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a atividade enzimática de *C. guaranicola* endofítico e patogênico que possa estar relacionada com o processo de infecção em guaranazeiro.

### **2.2. Objetivo específicos**

- ✓ Avaliar a atividade enzimática extracelulares (amilases, celulasas, pectinases, proteases, polifenol-oxidase e lipases) de isolados de *C. guaranicola* patogênico e endofítico em substratos sólidos específicos;
- ✓ Caracterizar o processo de pré-penetração, penetração e colonização de isolados de *C. guaranicola* patogênico e endofítico quando inoculados em folhas de guaranazeiro.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, e no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal da Faculdade de Ciências agrárias da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

#### 3.1. Atividade enzimática dos isolados de *Colletotrichum guaranicola*

Foi avaliada a atividade enzimática de quatorze isolados patogênicos e nove isolados endofíticos de *C. guaranicola*, obtidos a partir de folhas de guaranzeiro sadias (endofíticos) e com sintomas de antracnose (patogênico), coletados nos municípios de Manaus, Rio Preto da Eva, Maués e Presidente Figueiredo no Estado do Amazonas (Tabela 4). O isolamento dos fungos patogênicos e endofíticos foram realizados conforme descrito no Capítulo 1 no item 3.1.

**Tabela 4.** Isolados de *Colletotrichum guaranicola* usados nos testes enzimáticos.

Isolado	Procedência	Classificação	Isolado	Procedência	Classificação
I 01	Manaus/AM	Patogênico	P 17	Maués/AM	Patogênico
I 02	Manaus/AM	Patogênico	P 18	Maués/AM	Patogênico
I 04	Rio Preto da Eva/AM	Patogênico	I 13	Manaus/AM	Endofítico
I 06	Rio Preto da Eva/AM	Patogênico	I 16	Maués/AM	Endofítico
I 07	Manaus/AM	Patogênico	I 17	Maués/AM	Endofítico
I 08	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 01	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
I 09	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 07	Maués/AM	Endofítico
I 10	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 09	Maués/AM	Endofítico
I 11	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 10	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
I 12	Presidente Figueiredo/AM	Patogênico	P 12	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
I 461	Manaus/AM	Patogênico	P 13	Presidente Figueiredo/AM	Endofítico
P 11	Maués/AM	Patogênico			

Foram avaliadas as atividades de protease, amilase, pectinase, polifenol oxidase (POL), lipase e celulase. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo BDA (Difco™) durante sete dias em BOD (Tecnal) à temperatura de 27 °C sem

fotoperíodo, em seguida transferidos para os meios específicos de cada enzima. Todos os meios específicos descritos nos itens abaixo foram preparados e autoclavados a 120 °C durante 20 minutos, com exceção de alguns substratos como o ácido gálico e o Tween 20, que foram autoclavados à parte, a 120° C, 1 atm, por 10 minutos; após serem resfriados, foram acrescentados ao meio original e vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 12 mL do meio específico. Como testemunha, foram usadas placas de Petri apenas com discos de meio de cultura sem os fungos.

#### **a) Protease**

A atividade protease foi baseada na metodologia descrita por Valente et al. (2002). Discos de 5 mm de diâmetro de BDA (Difco™) contendo micélio fúngico, foram repicados individualmente para o centro da placa de Petri contendo um meio que possui leite desnatado (*skimmilk*) na sua constituição (25 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,125 g de KCl; 0,05 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,025g de CaCl<sub>2</sub>; 6,25 mL de leite desnatado a 22,5%; 2,5 g de glucose; 250 mL de água destilada; e 3 g de ágar; pH 5,4), e incubados em temperatura ambiente (25± 2 °C) durante um período de cinco dias.

A avaliação foi feita pela observação de halos concêntricos mais claros ao redor da colônia indicando a atuação de proteases extracelulares. Foram tomadas as medidas em dois diâmetros ortogonais das colônias e do halo de degradação com auxílio de uma régua milimetrada.

#### **b) Amilase**

Para avaliação da produção de enzimas amilolíticas, foi utilizado a metodologia descrita por Valente et al. (2002), usando o amido solúvel como substrato principal em meio de cultura (1,25 g de amido solúvel; 0,5 g de extrato de levedura; 0,25 g de



$K_2HPO_4$ ; 0,125 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 25  $\mu g$  de tiamina HCl; 4,25 g de ágar; e 0,25 mL da solução de micronutrientes (0,127 g de  $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ; 0,178 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,074 g de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ; 0,008 g de  $CuSO_4$ ; 0,01 g de  $CoSO_4$ ; 0,01 g de  $H_3BO_3$ ; e 100 mL de água destilada; pH  $7,3 \pm 0,2$ ). Discos de micélio (5 mm diâmetro) dos 23 isolados que foram repicados individualmente placas contendo o meio acima e posteriormente, foram incubados em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) durante cinco dias. Após este período foi feita a revelação do halo de degradação do amido vertendo 5 mL de solução aquosa de iodo (1%  $I_2$  e 2% KI). Após 10 minutos, a solução foi descartada e a atividade detectada pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada (DEB et al., 2013). As medições foram realizadas conforme descrito na atividade protease, descrito no item a. A solução de iodo foi utilizada como revelador uma vez que esta solução confere cor azul-arroxeadada quando se associa a moléculas de amido, e não reage com os produtos que resultam da hidrólise deste (VALENTE et al., 2002).

### c) **Pectinase**

Para detectar a produção de pectinases em meio sólido, foi utilizado meio contendo pectina (0,25 g  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,5 g de  $KH_2PO_4$ ; 0,75 g de  $Na_2HPO_4$ ; 0,025 g de  $FeO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,13 mg de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 125 mL água destilada; 2,94 g de citrato de sódio; 1,25 g de pectina; pH 4,5), conforme Valente et al., (2002). Discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram transferidos para o meio e foram incubados por 5 dias em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), e após o período de incubação as placas foram imersas com solução de revelação vermelho de congo (0,05%) e deixadas por 30 minutos à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), em seguida a solução foi descartada e atividade detectada através da formação de um halo claro circundado por uma zona vermelha. As medições foram realizadas conforme descrito na atividade protease no item a. A

revelação com vermelho congo permite a observação de halos de produção de pectinase que só podem ser observados com o uso de um revelador, sendo identificado pela formação de um halo alaranjado em contraste com o meio de cultura vermelho após a adição da solução reveladora (REDDY; SREERAMULU, 2012).

#### **d) Lipase**

O meio para detecção de lipase foi constituído de 10 mL de Tween-20 (monolaurato de sorbitol), 8 g de peptona; 0,1 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 20 g de ágar; 990 mL de água destilada (TRIGIANO et al., 2010). Os discos de micélio de cada isolado foram transferidos para as placas de Petri contendo o meio lipolítico, sendo incubadas a  $25 \pm 2$  °C durante 5 dias. Após o período de incubação dos isolados neste meio, a atividade foi observada com a presença de um precipitado floculento branco visível embaixo e à frente da camada micelial, onde ocorre a formação de cristais de cálcio. A avaliação da área de degradação da proteína foi realizada conforme descrito na atividade protease, no item a. O Tween é uma gordura sintética com uma cadeia de sorbitol, esterificados em vários ácidos graxos. A enzima lipase hidrolisa a ligação éster entre o carbono do sorbitol e o carbono carbonil do ácido graxo para formar sorbitol e um ácido graxo livre. Alterações em pH e ligação de cálcio com ácidos graxos livres se combinam para produzir o precipitado branco e floculento suspenso no meio, os cristais de cálcio (TRIGIANO et al., 2010; MIGOTTO et al., 2013).

#### **e) Polifenol oxidase**

A atividade polifenol oxidase teve como principal constituinte o ácido gálico e foi composto de 1 L água destilada; 15 g de extrato de malte; 20 g de ágar; e 5 g de ácido gálico (TRIGIANO et al., 2010). Disco de micélio de cada isolado foi transferido

para o centro de cada placa de Petri contendo o meio de cultura. As placas foram cobertas com papel de alumínio para evitar a exposição à luz, e incubadas a 25 °C durante 48 horas. A atividade foi expressa como um bloco de inóculo escurecido ou meio de ensaio escurecido no período de 24h a 48h. As medições foram realizadas conforme descrito na atividade protease, no item a. Segundo Trigiano et al. (2010), a polifenol oxidases oxida grupos hidroxila adjacentes em ácido gálico e cria quinonas, as quais são instáveis e espontaneamente são polimerizadas para formarem produtos pigmentados. O aparecimento de substâncias escuras é proveniente da polimerização oxidativa das quinonas (BINDSCHEDLER et al., 2002).

#### **f) Celulase**

Os isolados foram cultivados em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (3,0 g de NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>; 0,5 g de KCl; 10,0 mg de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 10 g de CMC; 20,0 g de ágar e 1 L de água destilada), conforme metodologia de Nogueira e Cavalcanti (1996). Estes foram incubados por quatro dias a 28° C contendo discos de micélio de diâmetro de 5mm de diâmetro, em seguida submetidas a choque térmico por 16h a 50° C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g.L<sup>-1</sup>) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M. A atividade foi detectada através da formação de uma zona clara circundado por uma zona vermelha. A zona clara em forma de halos indica a ação enzimática da celulase, enquanto a parte não afetada pela enzima foi corada de vermelho (MULLINGS, 1985). A avaliação da área de degradação foi avaliada conforme a atividade protease, descrita no item a.

### **g) Delineamento Experimental**

O delineamento experimental dos ensaios foi inteiramente casualizado com 23 tratamentos (isolados) e cinco repetições. A avaliação foi semi-quantitativa pela medição do halo de degradação formado em cada ensaio. Os valores do halo de degradação foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, usando o programa SISTAT®.

### **3.2. Processo de infecção de *Colletotrichum guaranicola* endofítico e patogênico**

Foi estudado o processo inicial de infecção de tecidos de *C. guaranicola* patogênico e endofítico, em folhas de guaranazeiro de clone suscetível (clone 300) à antracnose, visando detectar diferenças nos eventos de pré-penetração e colonização dos tecidos que possam ser relacionados com mecanismo de patogenicidade do fungo.

#### **3.2.1 Teste de patogenicidade e seleção dos isolados**

Os isolados foram obtidos conforme descrito no Capítulo 1 no item 2.1, conforme a Tabela 1. Inicialmente foi realizado um teste de patogenicidade visando selecionar um isolado patogênico e um endofítico para os estudos seguintes.

Foram usados 23 isolados (14 patogênicos e nove endofíticos), que foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Difco™) durante dez dias em temperatura de laboratório ( $25 \pm 2$  °C) sob luz constante para induzir a produção de conídios.

Foram utilizadas mudas sadias de guaranazeiro, mantidas em casa de vegetação no Setor de Produção da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM. A inoculação foi feita em folhas jovens estágio fenológico 1 a 3, conforme Nascimento Filho e Moreira (dados não publicados) citado por Bentes e Matsuoka (2002). Foram depositados quatro

discos de 0,5 mm de diâmetro, de meio de cultura contendo a colônia dos fungos, na face adaxial das folhas, sem a presença de ferimentos. Foram inoculadas três folhas de cada muda. Após inoculação as mudas permaneceram na câmara úmida feita com saco de plástico transparente umedecido, durante 48 horas. A avaliação foi feita durante sete dias, de acordo com a ausência ou presença de sintomas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, cada repetição constitui uma planta e 23 tratamentos (isolados). A testemunha constou de plantas que receberam os discos com meio de cultura BDA sem o patógeno ou endófito. Após o período de avaliação foi realizado reisolamento dos fungos endofíticos e patogênicos para confirmar a presença dos mesmos nos tecidos da planta. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do Teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

### **3.2.2 Quantificação do evento de pré-penetração**

A quantificação dos eventos de pré-penetração, germinação de conídios e a formação de apressórios, foi feita em folhas de guaranazeiro inoculadas com um isolado patogênico (I06) e um endofítico (P10), selecionados no ensaio anterior.

A inoculação foi feita conforme descrito no item acima. As amostras inoculadas foram coletadas no período de 12, 24 e 48 horas após a inoculação (h.a.i). Após este período já é possível observar sintomas em plantas inoculadas com o isolado patogênico, evidenciando a colonização dos tecidos.

As amostras coletadas foram cortadas em fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup> e diafanizados conforme metodologia descrita por Longo et al. (1994), que consiste em colocar as amostras submersas em cloral hidratado (250 g.100 mL<sup>-1</sup> de água destilada) durante cinco dias, seguido por uma tríplice lavagem em água destilada. As amostras foram

colocadas em lâminas para microscopia e clareadas, foram coradas com azul de algodão mais lactofenol (100 mL de lactofenol, 1 mL de azul de algodão aquoso 1%, 20 mL de ácido glacial acético) (MUNALUT; MARAITE, 1998).

Os conídios foram avaliados quanto à germinação e a formação de apressórios, sendo avaliados 100 conídios de cada isolado escolhidos aleatoriamente, no microscópio de luz Carl Zeiss® e fotografados com a câmera AxioCAM ERc 5s na objetiva de 40.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição uma planta. A testemunha constou de plantas que receberam os discos com meio de cultura BDA sem o patógeno ou endófito. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade usando o programa SISVAR.

### **3.2.3 Colonização dos tecidos**

Para observar a colonização dos tecidos as amostras inoculadas foram coletadas 48 h.a.i., cortadas em fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup> e fixados em FAA 70% (formaldeído - ácido acético - álcool etílico) por 48 horas, conservados em álcool etílico a 70%. Para o emblocamento em resina (Historesin® Leica) as amostras foram desidratadas em série alcoólica a vácuo (30%; 50%; 80%; 100%). Os fragmentos desidratados foram submetidos sucessivamente a álcool e resina (1:1 v/v) durante 2 horas, a álcool e resina (1:3 v/v) por mais 2 horas, e posteriormente em resina pura por 48 horas, e foram emblocadas em moldes de silicone, devidamente identificados.

As amostras foram seccionadas em micrótopo rotativo em secções transversais a uma espessura de 6 µm. Os cortes histológicos foram montados sob lâminas para microscopia e corados com azul de toluidina 0,1% (Bórax p.a. – 0,1 g; Toluidina – 0,1

g; 100 mL pH 4,0, tampão citrato (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). As lâminas foram observadas em microscópio de luz modelo Nikon Eclipse com objetiva de 40X.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Atividade Enzimática

A atividade lipase foi detectada através da precipitação floculenta branca abaixo da camada micelial que é decorrente da formação de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da enzima e pela completa degradação dos sais de lipídios (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Os isolados que apresentaram maior halo de degradação foram I06 e P18 (patogênicos), P07 (endofítico), que diferiram estatisticamente dos demais isolados. O halo indicador da degradação não foi observado em sete isolados patogênicos e três isolados endofíticos (Tabela 05).

Luz et al. (2006) estudando a atividade enzimática de fungos endofíticos dentre eles o *Colletotrichum* spp., obtiveram resultados semelhantes quando testaram a atividade lipolítica em diferentes isolados endofíticos de *Colletotrichum* spp, onde cinco isolados apresentaram resultados positivos e seis isolados resultados negativos, para produção de lipase. Brady et al. (2006) citaram que a principal função da enzima lipase na virulência está relacionada à degradação de lipídeos para aquisição de nutrientes. A lipase parece estar associada com a adesão do esporo à superfície do hospedeiro e com a penetração do fungo pela cutícula, desempenhando papel importante na patogenicidade (KOLATTUKUDY, 1985; BERTO et al., 1999). De acordo com Griffin (1994) as lipases que atacam fosfolípidos representam um complexo enzimático com potencial importante na patogenicidade, pois degradam um componente celular de grande valor que é a membrana plasmática do hospedeiro.

Todos os isolados apresentaram resultados positivos para amilase, com halo de degradação variando de 3,63 a 5,26 cm (Tabela 5). Os maiores halos de degradação foram observados em seis isolados patogênicos e um endofítico. De maneira similar,



Assis et al. (2010) estudando a produção de enzimas extracelulares por isolados patogênicos de *C. gloeosporioides* em meios sólidos específicos observaram que todos os isolados apresentaram halo de degradação para atividade de amilase. De acordo com Soares et al. (2010) e Griffin (1994) os fungos podem utilizar o amido como fonte de energia para o crescimento e esporulação. Além disso, a maioria dos fitopatógenos possui a capacidade de produzir amilases, as quais atuam nas moléculas de amido, polissacarídeo que constituem a principal fonte de reserva nas células vegetais, degradando este polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas das plantas (PASCHOLATI, 2011). No presente trabalho, com a metodologia utilizada, os isolados patogênicos e os endofíticos produziram a enzima amilase.

A atividade polifenol oxidase é caracterizada pela formação de um halo escuro no entorno da colônia. Dentre os 23 isolados, 14 apresentaram resultado positivo (oito patogênicos e seis endofíticos), não havendo distinção entre patogênicos e endofíticos, e o diâmetro do halo variou de 0,21 a 0,96 cm (Tabela 5). As lacases são glicoproteínas polifenol oxidase que estão envolvidas na degradação da lignina (LEONOWICZ et al., 2001). Coll et al. (1993) citaram que as lacases atuam em diferentes processos biológicos fúngico como a esporulação, na produção de pigmentos durante o desenvolvimento do corpo de frutificação e na patogênese. Lin et al. (2012) estudando diferentes isolados de *C. orbiculare*, observaram a relação entre a produção de lacases e a melanização de apressórios, sendo que a melanização está diretamente relacionada com o processo de penetração e conseqüentemente a colonização do fungo na hospedeira.

Segundo Armesto (2013) a maior expressão das atividades da amilase e da lacase nos fungos, pode estar relacionado à alta necessidade destas no processo de

colonização dos tecidos, tendo em vista que amilase estar relacionada diretamente ao requerimento de energia e a lacase (polifenol oxidase) ligada ao processo de penetração, evidenciando a alta necessidade destas para o metabolismo fúngico.

Somente 12 isolados mostraram habilidade em produzir a enzima celulolítica, com a formação de um pequeno halo de degradação (seis endofíticos e seis patogênicos) (Tabela 5). A visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas do meio de cultura podem interferir no corante proporcionando resultados falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (NEIROTTI; AZEVEDO, 1988). Acosta-Rodríguez et al. (2005) citaram que os resultados da atividade celulolítica obtidos para o fungo *C. lindemuthianum* foi mais eficiente em meio suplementado com celulose, tornando-se detectável após três dias de incubação, do que o meio que tinha na sua constituição a carboximetilcelulase – CMC, atingindo cerca de 35% do resultado obtido com a celulose, após 13 dias de crescimento. Possivelmente, o uso de CMC na composição do meio de cultura utilizado neste trabalho, pode ter influenciado na formação da enzima ou o tempo de avaliação não foi o suficiente para constatação da formação do halo. Existem evidências sobre a importância da celulase no processo de infecção na hidrólise da celulose, resultando na produção final de glicose, que é fonte de energia para os fungos no processo de infecção na planta (RUEGGER;TAUK-TORNISIELO, 2004).

Todos os isolados tiveram resultados positivos quanto a produção de enzimas pectolíticas, não havendo diferenças entre isolados patogênicos e endofíticos. A formação de um halo claro em torno da colônia após revelação foi indicador da existência da enzima. O halo variou de 0,10 a 0,56 cm (Tabela 5). A presença da atividade em todos os isolados deve ser explicada pelo fato do patógeno possuir uma ou

mais pectinases pré-formadas, que quando em contato com polímeros de ácido galacturônico na lamada média e parede primária, liberam monômeros ou oligômeros desses polímeros, os quais irão funcionar como sinais para a formação de novas pectinases (ARMESTO, 2013).

As enzimas pectinolíticas, capazes de degradar a pectina, levam a maceração dos tecidos das plantas, e são as primeiras enzimas secretadas pela maioria dos fungos patogênicos ao atacar a parede celular da planta (IDNURM; HOWLETT, 2001; NAKAJIMA; AKUTSU, 2014). Bezerra et al. (2012) citaram que tanto fungos patogênicos quanto endofíticos produzem enzimas pectolíticas, sendo importantes no processo fitopatogênico, na simbiose planta e micro-organismo e na decomposição da matéria orgânica.

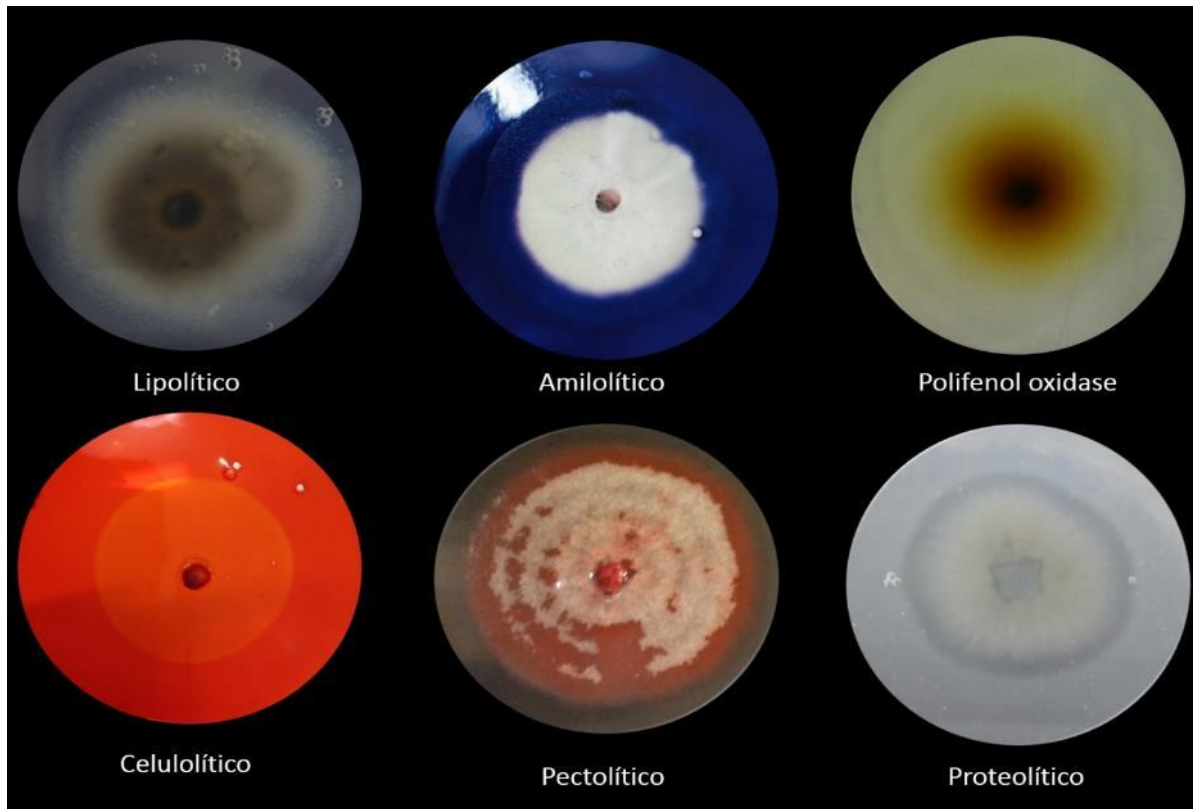
Hernández-Silva et al. (2007) comparando raças patogênicas e não patogênicas de *C. lindemuthianum* observaram que existe diferenças significativas em relação à produção de pectina liase, sendo que ambas produziram a enzima, entretanto, o patogênico produziu duas vezes mais em comparação com a raça não patogênica. A avaliação da atividade de várias enzimas de degradação da parede celular mostrou que a atividade de pectato liases em *C. kahawae* em café, um aumento significativo durante a fase necrotrófica, o que parece indicar que estas enzimas podem desempenhar um papel na patogenicidade (LOUREIRO et al., 2012). Torres (2010) detectou a atividade de poligalacturonases (PG) em isolados de *C. acutatum* e observou que quanto maior os níveis desta enzima, maior eram as lesões causadas por este em plantas de tamarilho.

A enzima proteolítica foi evidente em todos os isolados estudados, com halos de degradação variando de 0,17 a 0,36 cm (Tabela 05), apesar deste resultado positivo, nenhum fator de virulência foi encontrado ainda sobre as proteases secretadas. Não houve diferença estatísticas, entre os isolados patogênicos e endofíticos. Gonzáles et al.

(2006) explicaram que as enzimas proteases são abundantes nos fungos, primeiramente porque a protease gera aminoácidos para sustentar o crescimento dos fungos, e segundo lugar contribuem para degradação da parede celular vegetal. Os mesmos autores também relataram que a protease pode ajudar o crescimento de hifas no interior do tecido da planta, e podem também ser secretada pelo fungo como uma medida de contra-ataque aos mecanismos de defesa da planta. Dunaevsky et al. (2006) concluíram que a hidrólise eficaz das proteínas localizadas na parede celular a partir da enzima proteolítica produzida pelo fungo *C. gloeosporioides* indicava possível envolvimento na penetração do fungo nas células vegetais.

A maioria dos micro-organismos fitopatogênicos produzem enzimas proteolíticas que em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese (VALUENA; MOSOLOV, 2004). As enzimas degradadoras da parede celular (EDPCs) podem ter diferentes finalidades para o patógeno durante a infecção, tais como a penetração e ramificação dentro do tecido hospedeiro, a liberação de nutrientes ou interferência com a resposta de defesa da planta (RONCERO et al., 2000).

Não foi possível neste estudo distinguir isolados patogênicos e endofíticos, com base na produção de enzimas extracelulares. É possível que o método usado por ser semi-quantitativo, não permitiu observar as diferenças quantitativas entre os isolados. É sabido que a quantidade e a velocidade de produção de enzimas podem interferir no processo de infecção, resultando um sucesso ou não no estabelecimento do patógeno na hospedeira. Estudos futuros utilizando métodos quantitativos de avaliação da atividade enzimática podem auxiliar a esclarecer o envolvimento dessas enzimas no processo de infecção de *C. guaranicola*, e diferenciar isolados endofíticos e patogênicos.



**Figura 8.** Resultados positivos das atividades enzimáticas com formação de halo de degradação das enzimas estudadas.

**Tabela 5.** Atividade enzimática de isolados de *Colletotrichum guaranicola* por difusão em substratos sólidos específicos.

Atividade enzimática (HALO DE DEGRADAÇÃO – MM)						
Isolado	Lipase	Amilase	Polifenol oxidase	Celulase	Pectinase	Protease
PATOGENICO						
I 01	0.00 c	3.63 d	0.96 a	0.26 a	0.33 a	0.30 a
I 02	0.00 c	4.96 a	0.83 a	0.05 c	0.23 b	0.24 a
I 04	0.32 b	4.56 b	0.00 d	0.03 c	0.43 a	0.32 a
I 06	0.57 a	4.70 b	0.43 b	0.05 c	0.23 b	0.36 a
I 07	0.00 c	3.96 c	0.20 c	0.10 b	0.23 b	0.33 a
I 08	0.28 b	4.23 c	0.00 d	0.00 d	0.26 b	0.27 a
I 09	0.00 c	3.63 d	0.00 d	0.00 d	0.30 b	0.21 a
I 10	0.00 c	4.76 b	0.00 d	0.00 d	0.43 a	0.17 a
I 11	0.32 b	5.20 a	0.21 c	0.00 d	0.10 b	0.30 a
I 12	0.26 b	5.00 a	0.43 b	0.00 d	0.10 b	0.28 a
I 461	0.00 c	4.60 b	0.55 b	0.00 d	0.20 b	0.25 a
P 11	0.30 b	5.00 a	0.81 a	0.05 c	0.40 a	0.26 a
P 17	0.00 c	4.96 a	0.00 d	0.00 d	0.30 b	0.20 a
P 18	0.50 a	5.26 a	0.00 d	0.00 d	0.30 b	0.23 a
ENDOFÍTICO						
I 13	0.00 c	5.13 a	0.00 d	0.06 b	0.16 b	0.34 a
I 16	0.34 b	4.36 c	0.26 c	0.00 d	0.36 a	0.20 a
I 17	0.30 b	4.00 c	0.43 b	0.00 d	0.16 b	0.17 a
P 01	0.41 b	4.70 b	0.33 c	0.06 b	0.16 b	0.28 a
P 07	0.53 a	4.36 c	0.28 c	0.05 c	0.23 b	0.32 a
P 09	0.00 c	4.16 c	0.00 d	0.08 b	0.20 b	0.26 a
P 10	0.27 b	4.10 c	0.45 b	0.05 c	0.56 a	0.24 a
P 12	0.41 b	4.73 b	0.76 a	0.03 c	0.36 a	0.27 a
P 13	0.00 c	4.03 c	0.00 d	0.00 d	0.26 b	0.21 a
cv (%)**	5,09	2,35	8,22	2,07	7,71	5,48

\*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott, ao nível de significância de 5% de probabilidade.

\*\* Coeficiente de variação

## 4.2. Processo de infecção e colonização de *Colletotrichum guaranicola* endofítico e patogênico

### 4.2.1 Teste de Patogenicidade

Todos os 14 isolados patogênicos e nove isolados endofíticos foram submetidos ao teste de patogenicidade para seleção dos isolados para os processos de infecção e colonização. Nenhum isolado endofítico apresentou sintomas após os sete dias de inoculação. De acordo com os dados da análise estatística, foi constatado diferenças significativas no tamanho da área lesionada ocasionados pelos indivíduos patogênicos testados (Tabela 6). O isolado I06 demonstrou ser o mais agressivo, sendo selecionados juntamente com o isolado endofítico P10 para o processo inicial de infecção e colonização em folhas de guaranazeiro.

**Tabela 6.** Área lesionada (cm) em folhas de guaranazeiro inoculadas com discos de micélio contendo o patógeno *Colletotrichum guaranicola*.

Isolado	Área da lesão (cm)	Isolado	Área da lesão (cm)
I01	1,56 e	I10	2,96 b
I02	2,40 c	I11	2,26 c
I04	2,73 b	I12	2,80 b
I06	3,53 a	I461	1,90 d
I07	2,93 b	P11	2,26 c
I08	2,53 c	P17	2,36 c
I09	2,26 c	P18	2,46 c
**CV%	4,86		

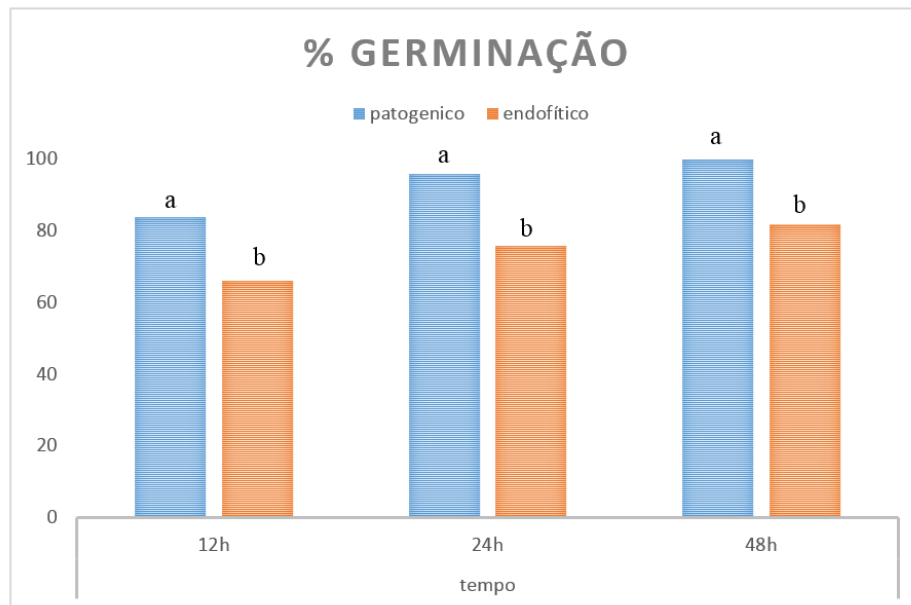
\*Médias originais seguidas de 3 repetições. Mesma letra não difere entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de significância de 5% de probabilidade.

\*\* Coeficiente de variação

### 4.2.2 Eventos de pré-penetração

Houve diferença quanto à germinação e formação de apressórios entre os isolados endofíticos e patogênicos. Foi observado 12 h.a.i., 84% de germinação de

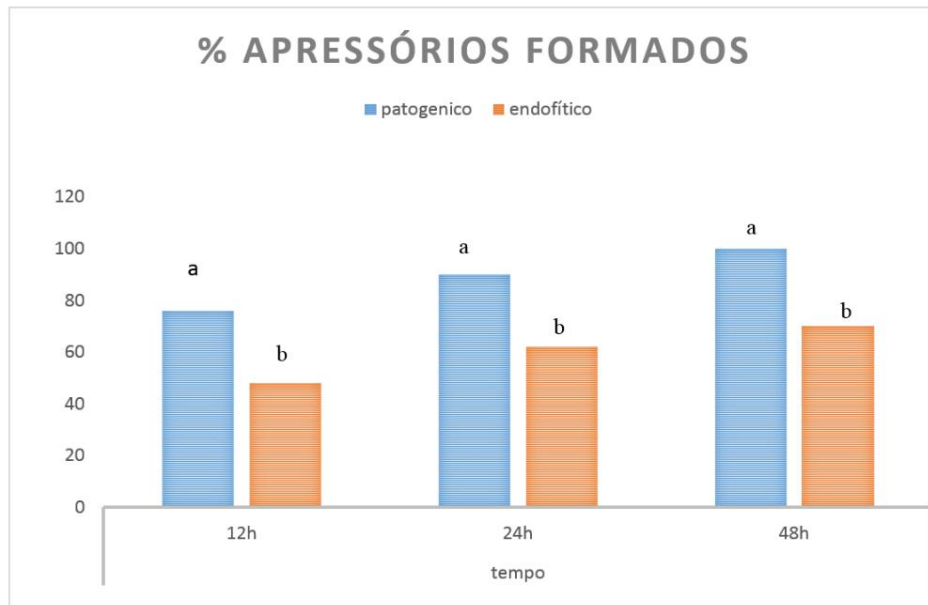
conídios dos isolados patogênicos e 66% nos isolados endofíticos. No período de 48 h.a.i. os isolados patogênicos já haviam alcançado 100% de germinação e os endofíticos 82%. O patogênico e o endofítico diferiram entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade em todos os períodos estudados (Figura 9).



**Figura 9.** Germinação de conídio de *Colletotrichum guaranicola* patogênicos e endofíticos.

Quanto à formação de apressórios, 76% dos conídios de isolados patogênicos formaram apressórios 12 h.a.i. e alcançaram 100% às 48 h.a.i. Para os isolados endofíticos foi observado 48% às 12 h.a.i. e 70% às 48 h.a.i. (Figura 10).





**Figura 10.** Formação de apressórios de *Colletotrichum guaranicola* endofíticos e patogênicos.

Não foi observada diferença quanto a morfologia dos apressórios entre os isolados endofíticos e patogênicos. Os apressórios apresentaram formato globoso a subgloboso com presença de melanina.

De acordo com Menezes (2006) durante a formação do apressório há síntese de proteínas requerida para a produção de melanina que confere a cor escura (castanha) da estrutura, tornando-o infectivo. Além disso, o sucesso da penetração na planta hospedeira, pela maioria dos fungos, seja patogênico, seja endofítico, depende da diferenciação de região do micélio em apressório, que por força mecânica penetra diretamente nas células da epiderme. Em alguns fungos a melanina tem participação nesse processo, pois apressórios não pigmentados são não funcionais, tornando o fungo incapaz de penetrar na planta (BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997). Reboledo et al. (2015) afirmaram que a presença de melanina favorece a penetração na cutícula e parede celular.

Bentes e Matsuoka (2002) observaram o início da germinação dos conídios de *C. guaranicola* patogênico no período entre 6 a 12 h.a.i., atingindo o máximo de

germinação no período de 24 h.a.i. (94,7%), também observaram que a formação de apressórios atingiu o máximo com 24 h.a.i. (94%). Lins et al. (2007) observaram a germinação de conídios de *C. dematium* inoculados em folhas de cafeeiro após 12 h.a.i. Segundo Araújo e Stadnil (2011) a germinação e a formação de apressórios no gênero *Colletotrichum* ocorrem entre 3 e 48 h após a deposição do conídio, e sua velocidade é fortemente influenciada por fatores ambientais e sinais químicos e/ou físicos presentes na superfície do hospedeiro.

Segundo Bailey et al. (1992), materiais exógenos, tais como ácidos orgânicos e sideróforos, na gota do inóculo, podem influenciar a germinação. Os mesmos autores citaram que na presença de nutrientes, o índice de germinação de esporos é acentuado, porém, baixas concentrações inibem a formação de apressórios. A duração do período de molhamento influencia o estabelecimento da infecção (SOARES et al., 2008), como também é influenciada pelas características da superfície de acolhimento, temperatura, umidade e intensidade da luz (EMMETT; PARBERY, 1975; LEANDRO et al., 2002).

Estrada et al. (2000) constataram que a formação de apressórios de isolados de *C. gloeosporioides* de mangueira era altamente inibida em curtos períodos de molhamento e mostraram incremento significativo quando o período passava de 12 para 24 horas de molhamento. Leandro et al. (2002) afirmaram que a temperatura e a duração do período de molhamento podem afetar a germinação e desenvolvimento de apressórios de *C. acutatum* endofítico de folhas de morango.

Os sintomas foram observados apenas em folhas inoculadas com o isolado *C. guaranicola* patogênico, em 48 h.a.i. Os sintomas apareceram como pequenas manchas intensas de coloração avermelhada, indicando a morte das células. O reisolamento do fungo vem corroborar a hipótese de que os diferentes isolados de *C. guaranicola*, em

guaranazeiro, pode permanecer em associação endofítica, sem manifestar sintomas, e também de forma patogênica, ocasionando surgimento de sintomas em 48 horas após inoculação.

#### **4.2.3 Colonização**

A colonização dos tecidos pelo isolado patogênico foi evidenciada pelo surgimento dos sintomas 48 h.a.i. Não foi observado sintomas nas plantas inoculadas com o isolado endofítico (P10) até sete dias após a inoculação, quando foi encerrada a avaliação.

Cortes semifinos de tecidos foliar 48 h.a.i., mostraram que neste período o isolado patogênico havia efetivamente colonizado células da epiderme e do parênquima paliádico. Foi observada a presença de hifas intracelulares e a degradação de células do parênquima (Figura 11).

Os processos de pré-penetração e colonização de *C. guaranicola* patogênico em guaranazeiro, se assemelharam com os de outras espécies de *Colletotrichum* (BAILEY et al., 1992; LINS et al., 2007; RANATHUNGE et al., 2012). Nas amostras inoculadas com o isolado endofítico, foi observada a presença de apressórios na superfície da epiderme. Não foi observada colonização de células no período de 48 h.a.i., nos cortes semi-finos analisados (Figura 11). É possível que a colonização dos tecidos pelo endofítico ocorra em período posterior a 48 h.a.i., e por isso o evento não tenha sido observado neste estudo. O atraso na colonização dos tecidos pelo endofítico em comparação com o patogênico, pode estar relacionado com mecanismos de patogenicidade, que tornam o isolado patogênico mais eficiente em degradar as barreiras naturais de hospedeira e colonizar as células.

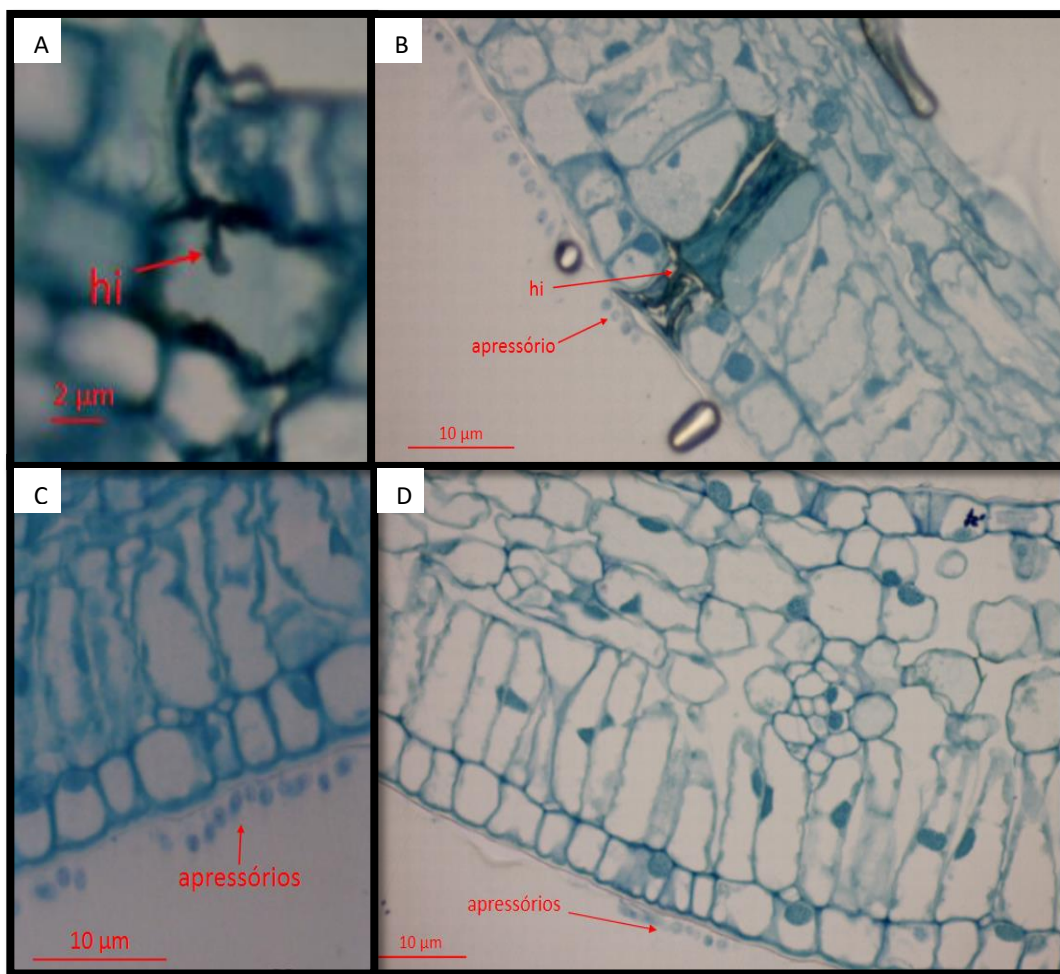
Os resultados observados nesta pesquisa foram similares ao trabalho de Horowitz et al., (2002) que estudando a colonização de isolados patogênicos e endofíticos de *C. acutatum*, observaram que os patogênicos se desenvolveram rapidamente nos tecidos da hospedeira, ocasionando necrose dos tecidos quatro dias após inoculação, e os endofíticos apresentaram germinação dos conídios, formando tubo germinativo e em seguida dando origem aos apressórios que não conseguiram penetrar no tecido da folha, resultando inicialmente em crescimento epifítico sem invasão na planta, sendo posteriormente observado a penetração aproximadamente 7 d.a.i., e foi restrito aos espaços intercelulares da camada subcuticular da hospedeira, sem causar qualquer dano visível.

Uma fase endofítica foi relatada no processo de infecção de *C. truncatum* em pimentão, havendo infecção e conseqüentemente colonização no tecido da hospedeira seis dias após a inoculação; cada fase de infecção pode ser dependente do genótipo do hospedeiro, condições ambientais, mudanças bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos; e os fatores de virulência de patógenos (AUYONG et al., 2011).

Freeman e Rodrigues (1993) afirmaram que a mutação de um único gene transformou uma linhagem patogênica do fungo *C. magna* em uma linhagem endofítica, mostrando que a diferença entre estes dois grupos pode ser muito tênue. Segundo Sieber (2007) um estado de repouso, é assumido após a infecção de fungos endofíticos, podendo explicar a demora no processo de pré-penetração e colonização. Alguns autores relataram latência de *Colletotrichum* spp. observadas a partir dos apressórios formados na superfície do hospedeiro, mesmo sem penetração do fungo, o que explica como muitas destas espécies persistem sobre tecidos de plantas (BINYAMINI; SCHIFFMANN, 1972; VERHOEFF, 1974; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

Os eventos envolvidos na pré-penetração e penetração das espécies de *Colletotrichum* parecem ser análogos, porém, existem diferenças entre as espécies nos mecanismos de adesão, melanização e produção de cutinases para penetração na cutícula da planta, podendo ser também uma hipótese em relação a diferença dos patogênicos e endofíticos, já que não foram quantificados a melanina e a enzima cutinase presentes em ambos, portanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados (PERFECT et al., 1999).

Horowitz et al. (2002) concluíram que em plantas assintomáticas, o patógeno pode proliferar na superfície do órgão inoculado, e depois de vários dias, ele entra nas camadas da epiderme, onde permanece em repouso sem causar danos para as células ou tecidos circundantes. Segundo os autores o fungo parece atingir um equilíbrio com a planta de tal forma que ela faz não desenvolver hifas maciças e o seu crescimento se restringe a camada celular superior sob a cutícula sem causar danos às células. Nesta fase, o fungo obtém nutrientes da planta nos espaços do apoplasto em quantidades suficientes para mantê-lo viável (FREEMAN; HOROWITZ, 2001).



**Figura 11.** Processo de colonização de *Colletotrichum guaranicola* patogênico e endofítico em folhas suscetíveis de guaranazeiro (clone 300) no período de 48 horas após a inoculação. A) Hifas (hi) do *C. guaranicola* patogênico colonizando os tecidos da planta hospedeira; B) Processo de infecção do isolado patogênico com presença de apressórios na superfície e hifas de penetração; C) e D) Apressórios do endofítico na superfície da folha da planta hospedeira.

## 5. CONCLUSÃO

- ✓ Todos os isolados de *C. guaranicola* patogênico e endofítico são capazes de produzir as enzimas pectinase, amilase e protease, e a maioria dos isolados produziram polifenol oxidase, celulase e lipase.
- ✓ Não houve diferença enzimática que distinguem os isolados patogênicos e endofíticos pelos métodos utilizados.
- ✓ Houve diferença quantitativa e temporal entre os isolados endofíticos e patogênicos quanto à germinação de conídios e formação de apressórios.
- ✓ *C. guaranicola* patogênico foi capaz de infectar e colonizar os tecidos da hospedeira em menor período que o isolado endofítico.

## 6. REFERÊNCIAS

- ACOSTA-RODRIGUEZ, I.; PINON-ESCOBEDO, C.; ZAVALA-PARAMO, M. G.; LOPEZ-ROMERO E.; CANO-CAMACHO, H. Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 87, p. 301–310, 2005.
- ANAND, T. et al. Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *alternaria alternata* causing fruit rot of chillies. *Journal of Plant Protection Research, Poznan-Warsaw*, v. 48, n. 4, p. 437- 451, 2008.
- AUYONG, N.; OLLIVIER-LANVIN, K.; LEMAY, M.A. Preferred locomotor phase of activity of lumbar interneurons during air-stepping in subchronic spinal cats. *J Neurophysiol*, v. 105, p.1011–1022, 2011.
- ARAÚJO, J.C.B.; PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; ARRUDA, M.R.; MOREIRA, A. Antracnose do guaranazeiro e seu controle. Comunicado Técnico 46, Junho, 2007.
- ARMESTO, C. Variabilidade biológica e molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* em cafeeiros / Cecília Armesto. – Lavras : UFLA, p. 101, 2013.
- ASSIS T.C., MENEZES M., ANDRADE D.E.G.T., COELHO R.S.B. Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using total proteins and esterase electrophoretic patterns and extracellular enzyme production. *Summa Phytopathol*, v. 27, p. 208-212, 2010.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England: CAB Internacional Wallingford, p. 388, 1992.
- BELL, A.A; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology, Paio Alto*, v.24, p. 411-451, 1986.
- BENTES, J.L.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*, v. 27, p. 71-77, 2002.
- BENTES, J.L.S.; NETO, P.Q.C. Variability of *Colletotrichum guaranicola* using AFLP markers. *Acta Amazônica*, v. 41, p. 251–256, 2011.
- BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease*, v.83, n.7, p.596- 608, 1999.
- BERTO, P.; COMMENIL, P.; BELINGHERI, L.; DE-HORTER, B. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiology Letters*, v.180, p.183–189, 1999.
- BEZERRA, J.D.P.; LOPES, D.H.G.; SANTOS, M.G.S.; SVEDESE, V.M.; et al. Riqueza de micro-organismos endofíticos em espécies da família Cactaceae. *Boletín de*



la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas, v. 9, p.19-23. 2012.

BINDSCHEDLER, L.F.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, v.53, p.1357-1376, 2002.

BINYAMINI, N.; SCHFFMANN, N.M. Latent infection in avocado fruit due *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*, v.62, n.6, p.592-594, 1972.

CARVALHO, J.M.; PAIXÃO, L.K.O.; DOLABELA, M.F.; et al. Phytosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). *Acta Amazonica*, v. 46, n.1, p. 69-72, 2016.

COLL, P.; TABERNERO, C.; SANTAMARIA, R.; PEREZ, P. Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycete PM 1 (CECT2971). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, n. 12, p. 4129-4135, 1993.

COSTA NETO. P.Q. Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke). 2009. 108p. Tese. Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Paio Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

DEB, P.; TALUKDAR, A.S.; MOHSINA, K.; SARKER, P.K.; SAYEM, S.M.A. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springerplus*, v.2, p. 154-166, 2013.

DOYLE, V.P.; OUDEMANS, P.V.; REHNER, S.A.; LITT, A. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America. *PLoS One*, v. 8, n.5, e 62394, 2013.

DUNAEVSKII, Y. E.; TSIBINA, T. A.; BELYAKOVA, G. A.; DOMASH, V. I.; SHARPIO, T. P.; ZABREIKO, S. A.; BELOZERSKII, M. A. Proteinase inhibitors as antistress proteins in higher plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 344-348, Jul. 2005.

EMBRAPA. Boas Práticas de Cultivo de Guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Embrapa Amazônia Ocidental, Relatório de Impacto das Tecnologias – Embrapa Amazônia Ocidental, p. 36, 2014.

EMMETT, R.W.; PARBERY, D.G. Appressoria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 13, p. 147-167, 1975.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology*, v. 91, p. 986-992, 2001.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualism. *Science*, v. 260, p. 75-78, 1993.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology*, v. 96, p. 982-992, 2006.

GRIFFIN, D.H. *Fungal physiology*. 2<sup>a</sup> ed. New York. John Wiley & Sons, Inc. 1994.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.

HERNANDEZ, J.A.; IGARASHI, R.Y.; SOBOH, B.; CURATTI, L.; DEAN, D.R.; LUDDEN, P.W.; RUBIO, L.M. NifX and NifEN exchange NifB cofactor and the VK-cluster, a newly isolated intermediate of the iron-molybdenum cofactor biosynthetic pathway. *Molecular Microbiology*, Hoboken, v. 63, n. 1, p. 177-192, 2007.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, Lancaster, v. 92, n. 7, p. 743-749, 2002.

IDNURM A.; HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, v. 2, p. 241-255. 2001.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, v. 39, p. 343-366, 1990.

JOHRI, B.N. Endophytes to the rescue of plants. *Current Science*, v. 90, p. 1315-1316, 2006.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. Review. *J. Basic Microbiol.*, Berlin, n. 3-4, p. 185-227, 2001.

LIN, S.Y. et al. LAC2 encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, St. Paul, v. 25, n. 12, p. 52-61, 2012.

LINS, S.R.O.; ALVES, E.; ABREU, M. S. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 32, n.6, p. 488-495, 2007.

LONGO, N.; NALDINI, B.; DROVANDI, F.; GONNELLI, T.; TANI, G. Penetration and early colonization in basidiospore-derived infection of *Melampsora pulcherrima* (Bub.) Maire on *Mercurialis annua* L. *Caryologia*, v. 47, p.207-222, 1994.

LOUREIRO, S.E.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, J. E.M. Viability of conidium and blastopores of *sporothrix insectorum* (hoog & evans) stored at different temperatures. *Arq. Inst. Biol.*, v. 70,n.1, p. 89-91, 2003.

LUZ, J.S.; SILVA, R.L.O.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Revista Caatinga*, v. 19, n.2, p.128-134, 2006.

KIKOT, G.E.; HOURS, R.A.; ALCONADA, T.M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *Journal Basic Microbiol.*, v. 49, p. 231–241, 2009.

KOLATTUKUDY, P.E. Enzymatic Penetration of the Plant Cuticle by Fungal Pathogens  
*Annual Review of Phytopathology*, v. 23, p. 223-250, 1985.

MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, nº 2, p. 280 - 283, 2005.

MARTÍNEZ-PACHECO, M. M.; SAUCEDO-LUNA, J.; FLORES-GARCÍA, A.; MARTÍNEZ-MUÑOZ, R. E.; CAMPOS-GARCÍA, J. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. is a potential cellulases producer microorganism. *Rev. Lat. Am. Microbiol.*, v.51, p. 23–31, 2009.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. Fitopatologia Brasileira*, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

MIGOTTO, B.C.; FERREIRA, A.B.M.; BUENO, C.J. *Cylindrocladium spathiphylli* de espatifilo (*Spathiphyllum wallisii* Rengel): detecção de enzimas extracelulares em isolados normais e alterados por temperatura. *summa phytopathology*, v.39, n.2, 2013.

MULLINGS, R. Measurement of saccharification by cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 7, p. 586-591, 1985.

MUNAUT, F.; MARAITE, H. Conidium germination and appressorium penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathology*, v. 146, p.19-26, 1998.

NAKAJIMA, M.; AKUTSU, K. Virulence Factors of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, v. 80, p. 15-23, 2014.

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J.L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicolasp*. *Revista de Microbiologia* 19:78-81. 1988.

NGUYEN, P. T. H.; VINNERE PETTERSSON, O.; OLSSON, P.; LILJEROTH, E. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam European Journal of Plant Pathology, v. 127, p. 73–87, 2010.

NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. Revista de Microbiologia, v. 27, p. 7-9, 1996.

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne: Termarcarphy Pty, 1981.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas In:

AMORIM, L.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 1, p. 543-592. 2011.

PETRINI, O; SIEBER, T. N; TOTI, L; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. Natural Toxins, v. 1, p.185-196, 1992.

PERFECT, S.E.; HUGLES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum* - A model genus for studies on pathology and fungal-plant interations. Fungal Genetics and Biology, Orlando, v.27, p.186-198, 1999.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. *Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interation. Minnesota: APS Press, p. 393, 2000.

RANATHUNGE, N.P.; MONGKOLPORN, O.; FORD, R.; TAYLOR, P.W.J. *Colletotrichum truncatum* Pathosystem on Capsicum spp: infection, colonization and defence mechanisms. Australasian Plant Pathology, v. 41, p. 463–473, 2012.

REBOLLEDO, M.C.; DINGKUHN, M.; COURTOIS, B.; GIBON, Y.; et al. Phenotypic and genetic dissection of component traits for early vigour in rice using plant growth modelling, sugar content analyses and association mapping. Journal of Experimental Botany. doi:10.1093/jxb/erv258, 2015.

REDDY, P.L.; SREERAMULU, A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research, v. 1, n.3, p. 186-193, 2012.

M. ISABEL G. RONCERO, M. I. G.; DI PIETRO, A.; RUIZ-ROLDÁN, M. C.; HUERTAS-GONZÁLEZ, M. D.; et al. Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. Rev. Iberoam Micol, v. 17, p. 47-53, 2000.

RUEGGER, M.J.S.; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, v. 27, p. 205-211, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. Mycological Research, v.109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, v. 21, p. 75-89, 2007.

SOARES, A.R.; LOURENÇO, S.S.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, n. 4, 2008.

SOARES, I.A.; et al. Identification of the amyolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n.3, p. 700- 705, 2010.

TORRES, C.P. Producción in vitro de pectinasas por *Colletotrichum acutatum*. *Acta Agronomica*, Palmira, v. 59, n. 1, p. 80-90, 2010.

TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. *Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 576, 2010.

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 3468–3473, 2000.

VALENTE, L.; SANTOS, I. M.; LIMA, N. Implementação de técnicas para avaliação do potencial degradativo de compostos naturais por fungos. *Ecologia dos Fungos*, Micoteca da Universidade do Minho, Braga, p. 67-82, 2002.

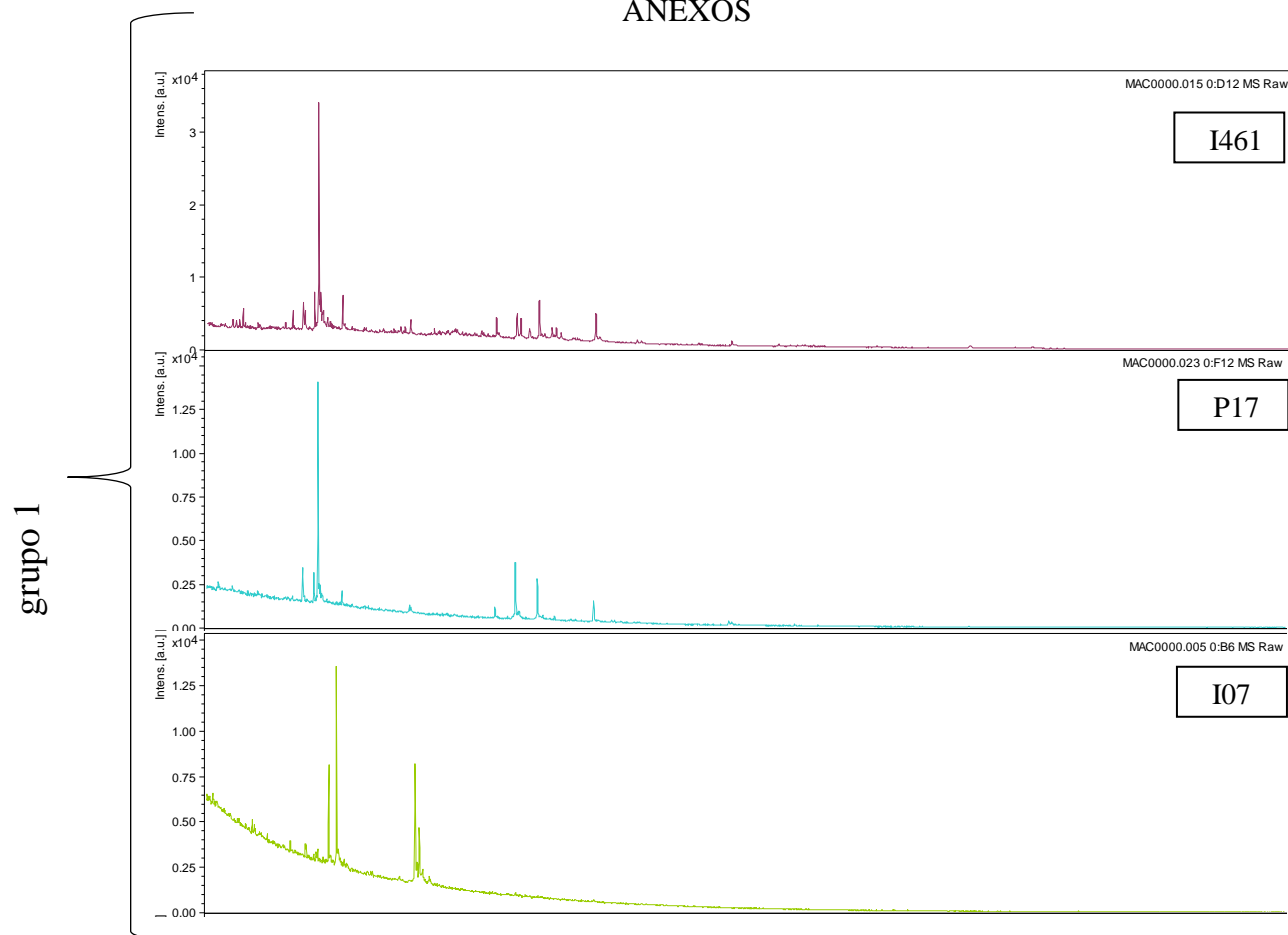
VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.

VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v.12, p. 99-110, 1974.

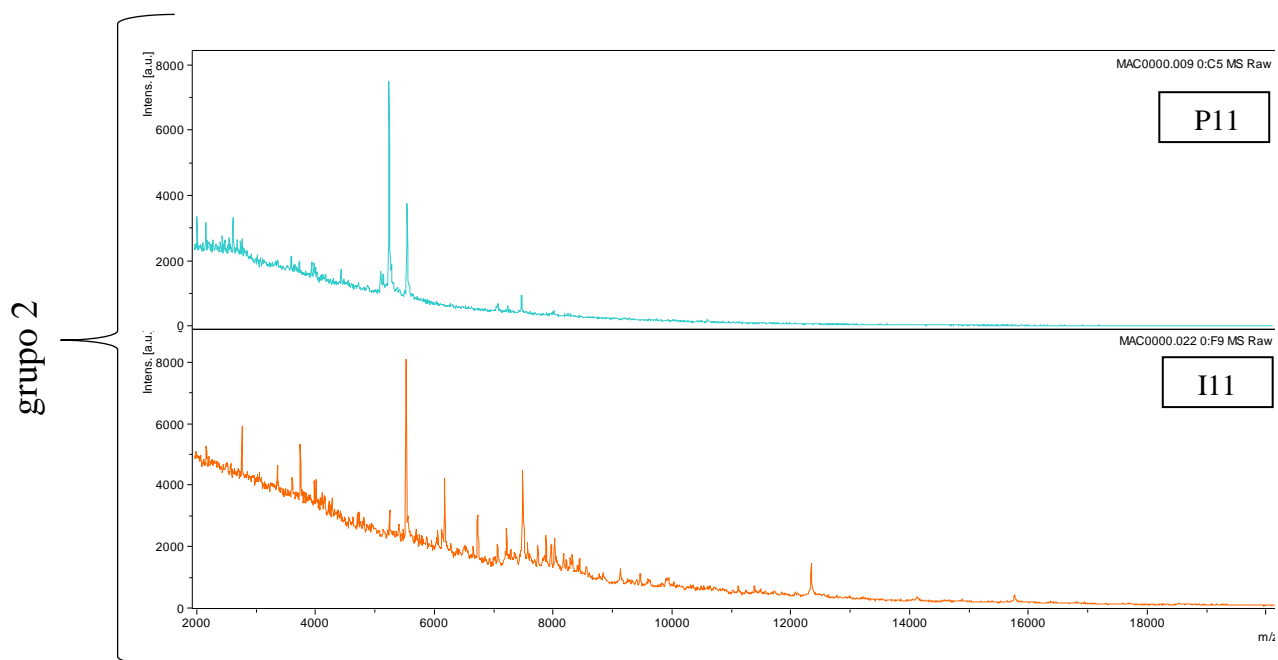
## CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Não foi possível diferenciar os isolados de *C. guaranicola* patogênicos e endofíticos a nível de espécie com base na caracterização morfológica, genotipagem e MALDI-TOF;
- ✓ No processo inicial de infecção e colonização houve diferença no período de 48 horas após a inoculação entre o endofítico e patogênico;
- ✓ Os isolados patogênicos e endofíticos produziram as enzimas estudadas, não sendo possível correlacionar a produção de enzimas ao fator de patogenicidade.

# ANEXOS



**Figura 12.** Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados *C. guaranicola* agrupados no grupo 1.



**Figura 13.** Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados *C. guaranicola* agrupados no grupo 2.

grupo 3

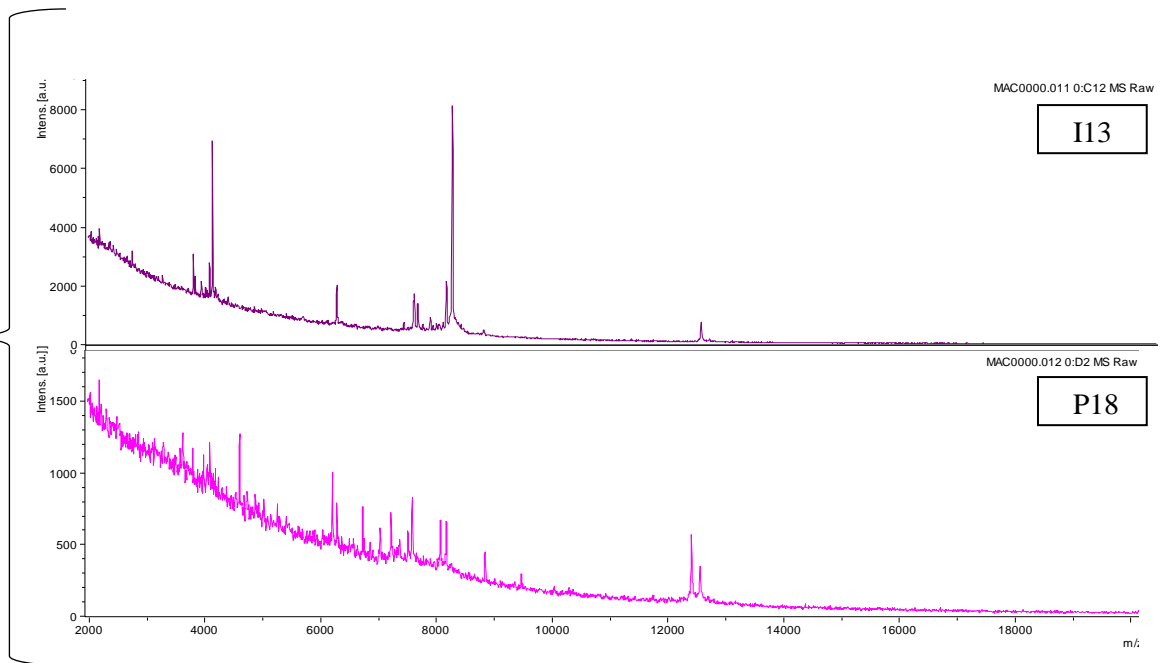


Figura 14. Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados *C. guaranicola* agrupados no grupo 3.

grupo 4

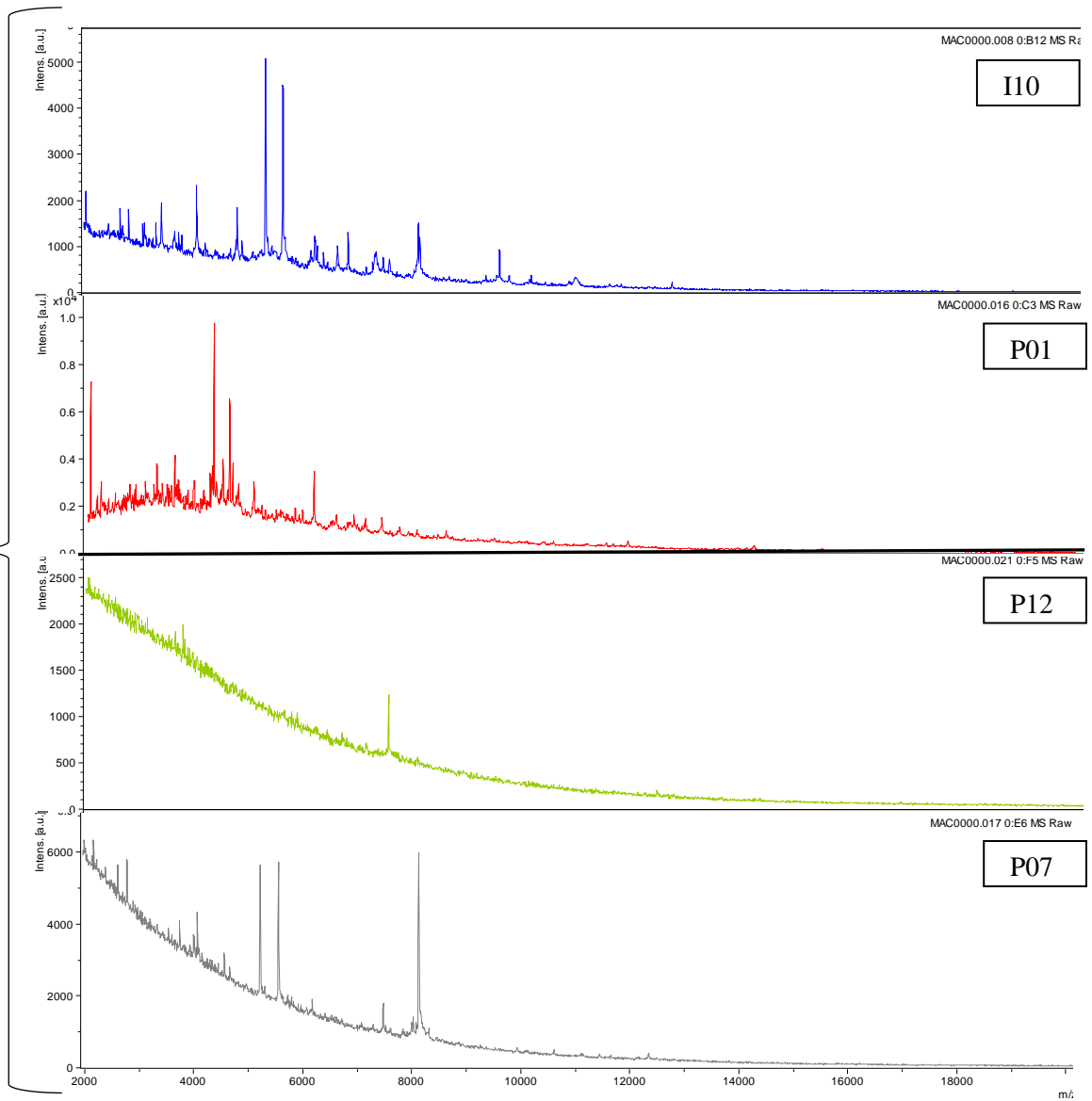
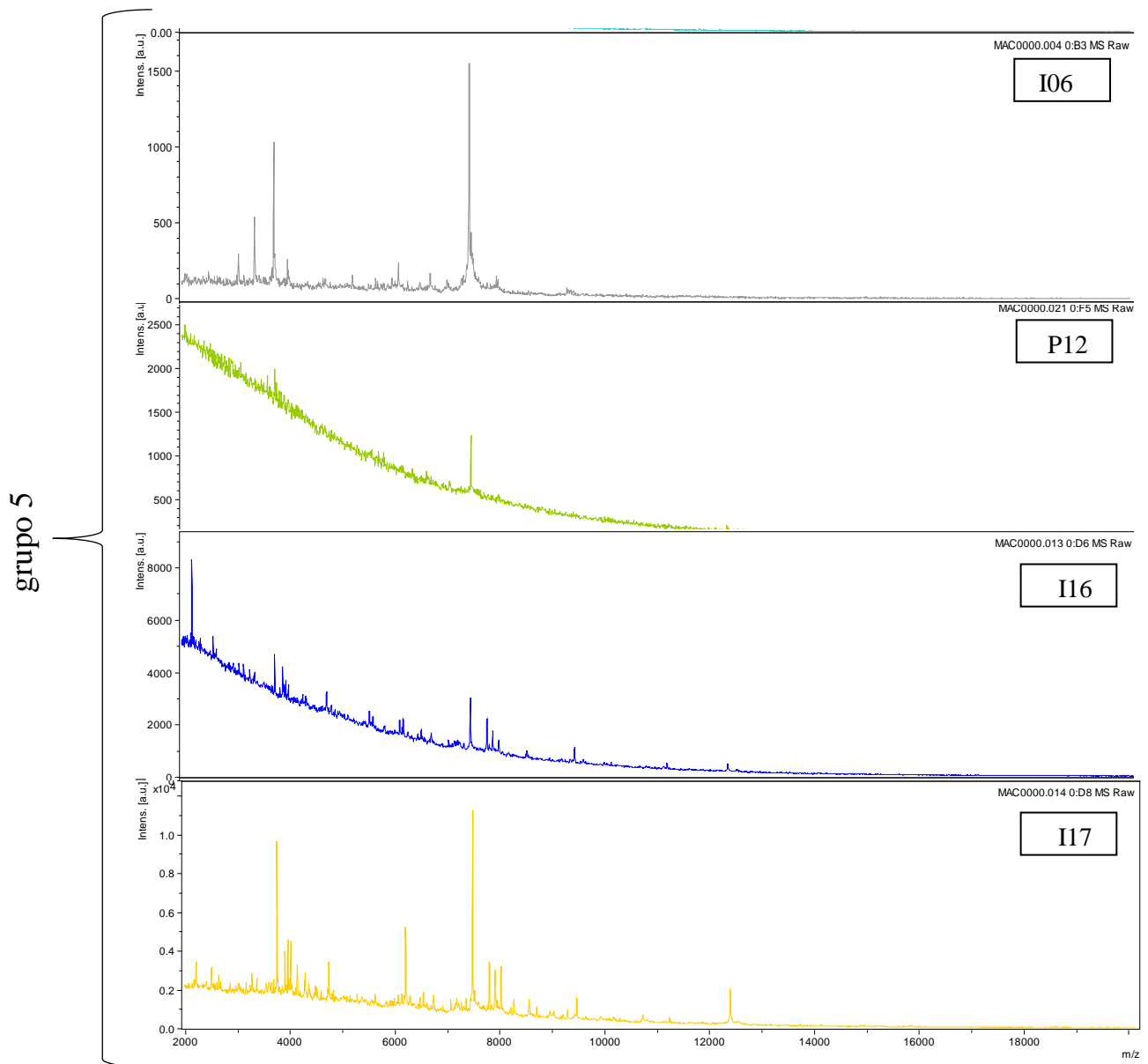


Figura 15. Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados *C. guaranicola* agrupados no grupo 4.





**Figura 16.** Espectro de MALDI-TOF MS dos isolados *C. guaranicola* agrupados no grupo 5.