

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA,
SEROLÓGICA E ELETROFORÉTICA DE *Colletotrichum
gloeosporioides* "SENSU" ARX, ISOLADOS DE PIMENTÃO
(*Capsicum annuum* L.) E JILÓ (*Solanum gilo* Raddi), E SEU
CONTROLE QUÍMICO**

ROSA MARIA FERREIRA VIANNA PEREIRA

Bióloga

Orientador: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

**Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia**

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1995**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Pereira, Rosa Maria Ferreira Vianna

Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de *Colletotrichum gloeosporioides* "Sensu" Arx, isolados de pimentão (*Capsicum annuum* L. e jiló (*Solanum gilo* Radd.), e seu controle químico. Piracicaba, 1995.

151p. ilus.

Tese - ESALQ

Bibliografia.

1. Antracnose do jiló - Controle químico 2. Antracnose do pimentão - Controle químico 3. Jiló - Doença - Controle químico 4. Pimentão - Doença - Controle químico I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

DDC 635.643
632.44

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA,
SEROLÓGICA E ELETROFORÉTICA DE *Colletotrichum
gloeosporioides* "SENSU" ARX, ISOLADOS DE PIMENTÃO
(*Capsicum annuum* L.) E JILÓ (*Solanum gilo* Raddi), E SEU
CONTROLE QUÍMICO**

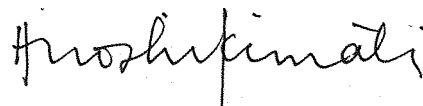
ROSA MARIA FERREIRA VIANNA PEREIRA

Aprovada em: 23/06/95

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
Prof. Dr. Clélio Lima Salgado
Prof. Dr. Luiz Eduardo A. Camargo
Prof. Dr. Chukichi Kurozawa
Pesq. Dr^a Margarida Ito

ESALQ/USP
ESALQ/USP
ESALQ/USP
UNESP/Botucatu
IAC/Campinas



**Prof. Dr. HIROSHI KIMATI
- Orientador -**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Taxonomia do <i>Colletotrichum</i>	3
2.2. Critérios de Caracterização	7
2.2.1. Morfológico-Culturais	7
2.2.2. Patogenicidade e Eletroforese	10
2.2.3. Serologia	13
2.3. Controle Químico e Sensibilidade "in vitro"	18
3. MATERIAL E MÉTODO	25
3.1. Patógeno: Obtenção e Conservação	25
3.2. Desenvolvimento Diametral Médio de Colonias de Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	27
3.3. Desenvolvimento Diametral Médio de Colonias de Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , em diferentes temperaturas	28
3.4. Características Conidiais	29
3.5. Características do Apressório	30
3.6. Teste de Patogenicidade	31

	Página
3.7. Teste de Eficiência in vitro de Fungicidas Para os Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de Pimentão e Jiló	32
3.7.1. Efeito de Doses Crescentes dos Fungicidas benomyl, prochloraz, triadimenol, tebuconazole e diniconazole	34
3.7.1.1. Benomyl	34
3.7.1.2. Prochloraz, triadimenol, tebuconazole e diniconazole	35
3.7.2. Efeito dos Fungicidas imebenconazole, iminoctadine, pyremetanil, carbendazin, tricyclazole, fluquinconazole, flutolanil, fludioxonil, cyprodinil e fenbuconazole, sobre o Crescimento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	36
3.8. Efeito do Tratamento Preventivo e Curativo de Fungicidas Sistêmicos no Controle da Antracnose na Cultura do Pimentão	37
3.8.1. Planta hospedeira e substrato	37
3.8.2. Inoculação e Fungicidas	37
3.9. Caracterização Serológica de Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	41
3.9.1. Extração de antígenos para reação	41

3.9.1.1. Para o método de dupla-difusão em ágar	41
3.9.1.2. Para o teste de ELISA	42
3.9.2. Obtenção de antissoros	42
3.9.2.1. Obtenção de antissoros	42
3.9.2.2. Antissoro para imunógeno de conídio	43
3.9.3. Testes sorológicos	44
3.9.3.1. Teste de dupla difusão em gel de ágar- Ouchterlony	45
3.9.3.2. Teste de ELISA Indireto	45
3.10. Eletroforese	47
3.10.1. Crescimento dos isolados de <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> em meio líquido	47
3.10.2. Extração de proteínas dos isolados	48
3.10.3. Determinação da concentração de proteínas nas amostras	48
3.10.4. Preparo do gel de poliacrilamida	49
3.10.5. Aplicação das amostras e corrida eletroforética	50
3.10.6. Coloração	51
3.10.7. Preservação dos geis	51
3.10.8. Análise do perfil Eletróferico	52

4. RESULTADOS	53
4.1. Desenvolvimento Diametral Médio das Colonias dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . . .	53
4.2. Desenvolvimento Diametral Médio de Colonias dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , sob Diferentes Temperaturas	55
4.3. Características Conidiais e do Apressório dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . . .	61
4.4. Teste de Patogenicidade	65
4.5. Eficiência "in vitro" do Fungicida Benomyl . . .	67
4.6. Eficiência "in vitro" dos Fungicidas diniconazole, procloraz, tebuconazole e triadimenol	72
4.6.1. Diniconazole	72
4.6.2. Procloraz	79
4.6.3. Tebuconazole	82
4.6.4. Triadimenol	85
4.7. Eficiência "in vitro" dos Fungicidas imebenconazole, iminoctadine, pyremetanil, carbendazin, tricyclazoe, fluquinconazole, flutalonil, fledioxonil, cyprodinil e fenguconazole	88
4.8. Eficiência do Tratamento Preventivo e Curativo de de 4 Fungicidas Sistêmicos no Controle da Antracnose na Cultura do Pimentão	93

4.9. Caracterização Serológica de Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	96
4.10. Caracterização dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por Eletroforese	101
5. DISCUSSÃO	105
5.1. Critérios Morfológicos e Fisiológicos	105
5.2. Patogenicidade, Serologia e Eletroforese	110
5.3. Sensibilidade a fungicidas	117
5.3.1. Sensibilidade "in vitro"	117
5.3.2. Sensibilidade "in vivo"	121
6. CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
APÊNDICE	145

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Escala de notas para área(%) do fruto de pimentão com lesão de antracnose	40
Figura 2 - Crescimento dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sob diferentes temperaturas, aos 10 dias de incubação	58
Figura 3 - Diâmetro (cm) das lesões de antracnose, em frutos de pimentão e jiló, após a inoculação com isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	68
Figura 4 - Efeito de doses crescentes de benomyl sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolados de pimentão e jiló, aos 10 dias de incubação	68
Figura 5 - Crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , em meio com doses crescentes de benomyl, aos 10 dias de incubação	73

	Página
Figura 6 - Efeito de doses crescentes do fungicida diniconazole sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	78
Figura 7 - Efeito de doses crescentes do fungicida prochloraz sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	81
Figura 8 - Efeito de doses crescentes do fungicida tebuconazole sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	84
Figura 9 - Efeito de doses crescentes do fungicida triadimenol sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	87
Figura 10 - Crescimento micelial dos isolados 1p, 7p, 5p observados "in vitro" nos tratamentos: testemunha, benomyl, prochloraz, triadimenol, tebuconazole e diniconazole	92

	Página
Figura 11 - Crescimento (%) micelial dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em meio com: flutolanil, fludioxonil, fluquinconazole, cyprodinil, carbendazin, tricyclazole, pyrimetanil, imebenconazole e iminoctadine, à 100 ppm	92
Figura 12 - Sintoma de fitotoxidez de tebuconazole em plantas de pimentão var. Agrônômico G10	95
Figura 13 - Efeito dos tratamentos preventivos e curativos dos fungicidas benomyl, diniconazole, tebuconazole e triadimenol sobre a incidência de lesões de antracnose em plantas de pimentão	97
Figura 14 - Leitura (a 405 nm) da reação entre antígenos reagentes e antissoros obtidos de micélio de isolados de pimentão e jiló. Teste de ELISA	100

Figura 15 - Diagrama dos perfis eletroforéticos de esterase e sua mobilidade relativa (R_m) dos isolados 31j, 32j, 30j, 35j 36j, 50p, 51p, 25p, 10p, 1p e 7p.	103
Figura 16 - Diagrama de densitometria (540 nm) do padrão de esterase dos isolados 31j, 32j, 30j, 35j, 36j, 50p, 51p, 25p, 10p, 1p e 7p.	104

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Relação dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* estudados e sua procedência . 26

Tabela 2 - Fungicidas utilizados nos experimentos 33

Tabela 3 - Fungicidas testados no experimento 1 38

Tabela 4 - Diâmetro médio (cm) das colonias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* 54

Tabela 5 - Diâmetro médio (cm) das colonias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos sob diferentes temperaturas, aos 5 dias de incubação.. 56

Tabela 6 - Diâmetro médio (cm) das colonias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos sob diferentes temperaturas, aos 10 dias de incubação. 57

	Página
Tabela 7 - Comprimento, largura e amplitude (μm) de conídios dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	63
Tabela 8 - Comprimento, largura (μm) e forma de apressórios dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	64
Tabela 9 - Diâmetro médio (cm) de lesões, em frutos destacados de pimentão e jiló, inoculados com diferentes isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	66
Tabela 10 - Diâmetro médio (cm) das colônias dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , desenvolvidos sob diferentes doses de benomyl, aos 5 dias de incubação	69
Tabela 11 - Diâmetro médio (cm) das colônias dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , desenvolvidos sob diferentes doses de benomyl, aos 10 dias de incubação	70

Tabela 12 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0,1, 10 e 100 ppm de diniconazole	77
Tabela 13 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de prochloraz	80
Tabela 14 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de tebuconazole	83
Tabela 15 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de triadimenol	86

Página

Tabela 16 - Crescimento (%) em relação à testemunha dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , desenvolvidos "in vitro", com 100 ppm dos fungicidas: flutalonil (Flt), Fludioxonil (Fld), fluquinconazole (Flq), iminoctadine (Imn), imebenzonazole (Imb), fenbuconazole (Fnb), cyprodinil (Cyp), carbendazin (Carb.), tricyclazole (Tric) e pyremetanil (Pyr) . . .	89
Tabela 17 - Média das incidências de lesões e das notas atribuídas aos frutos de pimentão tratados com os fungicidas benomyl, diniconazole, tebuconazole e triadimenol	94
Tabela 18 - Resultados do teste de ELISA Indireto (A 405 nm) da reação dos antissoros de micélio dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de antígenos obtidos de micélio dos isolados de pimentão e jiló, na concentração de 500 μ p em equivalentes de SAB/ml	99

*Enquanto o sábio arreiga o pensamento
Nos fenômenos teus, ó Natureza,
Ou solta árduo problema, ou sobre a mesa
Volve o sutil geométrico instrumento;*

*Enquanto, alçando a mais o entendimento,
Estuda os vastos céus, e com certeza
Reconhece dos astros a grandeza,
A distância, o lugar e o movimento;*

*Enquanto o sábio, enfim, mais sabiamente
Se remonta nas asas do sentido
À corte do Senhor onipotente,*

*Eu louco, eu cego, eu mísero, eu perdido,
De ti só trago cheia, ó Jônia, a mente;
Do mais e de mim mesmo ando esquecido.*

*Bocage (*1765-†1805)*

À todos que dedicam sua vida à busca da
verdade, da perfeição...

Aqueles que se expuseram , se envolveram,
correndo o risco das inevitáveis marcas.
Pelo sucessos e insucessos.

A meus pais

Wenceslau e Zuleika

Ofereço

Às minhas filhas

Juliana e Ana Isabel

Dedico

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, orientador e silencioso amigo.
- À Universidade do Amazonas e ao Departamento de Ciências Fundamentais e Desenvolvimento Agrícola, pela oportunidade.
- Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que possibilitou a minha formação.
- Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.
- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia pela colaboração.
- À empresa Agroflora pelo fornecimento de sementes e mudas.

- À Erna Elisabeth Bach, pesquisadora científica do Instituto Biológico, pelo auxílio nos trabalhos de serologia e eletroforese.

- À Dra. Lilian de Arruda Bacchi pelo auxílio na análise estatística.

- Aos colegas e amigos Prof^ª Therezinha de Jesus P. Fraxe, Prof^ª Henrique dos Santos Pereira e Prof^ª José Odair Pereira, companheiros da Universidade do Amazonas, pelo apoio e incentivo.

- Aos caros amigos do Departamento de Fitopatologia: Amauri Siviero, Paulo Albuquerque, Marco Galli, Roberto Venceslau de Carvalho, Agnelo, Daniela, Maristella, Heloísa, Roberto M. Castro, Marise, entre outros, por todos os bons momentos compartilhados.

- A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA,
SEROLÓGICA E ELETROFORÉTICA DE *Colletotrichum*
gloeosporioides "SENSU" ARX, ISOLADOS DE PIMENTÃO
(*Capsicum annuum* L. E JILÓ (*Solanum*
gilo RADD.)), E SEU CONTROLE QUÍMICO

Autora: Rosa Maria Ferreira Vianna Pereira

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Com o objetivo de reestudar formas de *Colletotrichum*, que ocorrem em pimentão (*Capsicum annuum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Radd), com auxílio de serologia e eletroforese, bem como pesquisar e selecionar, "in vitro" e em casa de vegetação, novos produtos químicos para controle de antracnose, foram feitos experimentos que pudessem contribuir para elucidar as relações entre *Colletotrichum gloeosporioides* e seus hospedeiros.

Os isolados obtidos de pimentão e jiló se diferenciaram pela morfologia do apressório, sendo os primeiros lobados e de paredes finas e os outros com forma arredondada e de parede grossa. A largura dos conídios mais que o comprimento é um fator de distinção entre os dois grupos.

Os dois grupos de isolados de *C. gloeosporioides* mostraram especificidade fisiológica:

- A temperatura ótima de crescimento para os isolados de pimentão ficou estabelecida entre 24-26°C, sendo que no teste de patogenicidade foram agressivos aos frutos destacados de pimentão e jiló;

- A temperatura ótima de crescimento para os isolados de jiló ficou compreendida entre 18-21°C, sendo que exibiram especialização fisiológica na patogenicidade.

O teste de ELISA-indireto mostrou que os determinantes antigênicos entre os grupos foram semelhantes e a distinção entre os isolados foi observada através da eletroforese do padrão esterase, com a presença de uma banda diferenciadora.

Alguns fungicidas, à exceção do benomyl, mostraram potencial no controle da antracnose, como o tebuconazole e sobre o crescimento micelial, como o tricyclazole, pyremetanil, carbendazin e cyprodinil.

MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL, SEROLOGICAL
AND ELECTROPHORETIC CHARACTERIZATION, AND
CHEMICAL CONTROL OF *Colletotrichum*
gloeosporioides SENSU ARX, ISOLATED FROM
BELL PEPPER (*Capsicum annuum* L.) AND JILO
(*Solanum gilo* Radd.)

Author: Rosa Maria Ferreira Vianna Pereira
Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Cultures of *Colletotrichum* isolated from bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and jilo (*Solanum gilo* Radd) were characterized using serological and electrophoretical methods in an attempt to better understand the relationships between *Colletotrichum gloeosporioides* and its hosts. Also, the effectiveness of new chemical compounds in controlling antracnose was evaluated both in greenhouse and *in vitro* experiments.

Isolates from bell pepper and jilo differed with respect to apressorium morphology. In the former, apressorium were lobated and thin-walled whereas in the latter, they were round-shaped and thick-walled. Conidia width rather than length also could be used to distinguish the two groups.

Physiological specificity was noted between the two groups of isolates:

- Isolates from bell pepper were aggressive to detached fruits of both bell pepper and jilo, and had an optimal growing temperature between 24-26°C.
- Isolates from jilo showed physiological specificity, being aggressive only to detached fruits of jilo, and had an optimal growing temperature between 18-21°C.

Indirect ELISA tests indicated similar antigenic determinants between isolate groups. However, the two groups could be distinguished based on the electrophoretic banding pattern of esterase.

Some fungicides, with the exception of benomyl, inhibited the micelial growth of the fungus "in vitro" (tricyclazole, pyremetanil, carbendazin e cyprodinil), and showed potential controlling effect of antracnose (tebuconazole).

1. INTRODUÇÃO

A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* sensu Arx (1957), é uma das principais doenças do pimentão (*Capsicum annuum* L.) e outras solanáceas, sendo particularmente importante em frutos maduros. Via de regra, acarreta perdas devido à infecção latente (JEFFRIES et al., 1990) e, quando o fruto amadurece, se manifesta na forma de lesões circulares, deprimidas e com diâmetro variável. Este tipo de infecção não é normalmente visível até a época da colheita e como o período de latência pode ser longo, as perdas podem ser proporcionalmente maiores que as do campo, devido a gastos com a condução da cultura, colheita, transporte e armazenamento.

Apesar de fungos do gênero *Colletotrichum* terem sido bastante estudados, ainda permanecem muitas dúvidas com relação a vários aspectos biológicos; um deles se refere às complexas relações entre as várias espécies envolvidas e seus espectros de hospedeiro.

Taxonomicamente, o sistema de classificação morfológica e sintética de ARX (1957), seguido por muitos pesquisadores, tem sido contestado por outros, havendo uma

tendência a reestudos à luz de novas metodologias, como a serologia e eletroforese que completam os estudos morfológicos e fisiológicos. Efetivamente, dentro dos amplos limites morfológicos definidos para a espécie *C. gloeosporioides*, ARX (1957) deve ter amalgamado fungos diferentes dentro desta espécie.

Pelo exposto, o presente trabalho objetivou um reestudo de formas de *Colletotrichum* que ocorrem em pimentão e jiló (*Solanum gilo* Radd), com auxílio de serologia e eletroforese.

Tendo em vista a importância da doença e ausência de trabalhos sobre o controle químico, realizou-se também a pesquisa de seleção "in vitro" e de casa de vegetação de novos produtos químicos. Simultaneamente, procurou-se, com os testes "in vitro", detectar eventuais diferenças na sensibilidade das formas de *Colletotrichum* que poderão ajudar na diferenciação taxonômica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia do *Colletotrichum*

A preocupação com a posição taxonômica do agente causal da antracnose do pimentão (*Capsicum annuum* L.) remonta à década de vinte, quando HIGGINS (1926) revisou a descrição dos patógenos daquela doença, ao mesmo tempo que lançou novas propostas para melhor elucidar o problema. Em seus trabalhos com aquela cultura, fez testes de inoculação em frutos verdes e maduros, reisolou e identificou os agentes estudados, caracterizando as espécies: *Gloeosporium piperatum* E. & E. (acérvulos sem setas), *Colletotrichum nigrum* E & E. (acérvulos com muitas setas) e *Glomerella piperata* (Stoneman) Von Schrenk & Spaulding, um ascomiceto com peritécios. Considerou que o primeiro atacava os frutos em qualquer estágio de desenvolvimento, embora fosse raro nos cultivos de pimentão; a segunda e a terceira espécies considerou como parasitas de frutos feridos. Assim, através dos resultados obtidos, refutou a opinião de DASTUR¹ (citados por HIGGINS,

¹ DASTUR, J.F. *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. and V. Sch. and its conidial forms, *Gloeosporium piperatum* E. and E. and *Colletotrichum nigrum* E. and Hals. on Chillies and *Carica papaya*. Ann. App. Biol. 6:245-268, 1920.

1926), de que *Gloeosporium piperatum* e *Colletotrichum nigrum* representam o mesmo fungo e que ambos são idênticos a *Glomerella cingulata*.

HIGGINS (1926) não se referiu ao trabalho de Sydow¹ (citado por ROBERTS et al. 1990), que em 1913 descreveu o agente causal da antracnose da pimenta (*Capsicum frutescens* L.) como *Vermicularia capsici*, mais tarde reclassificado como *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler e Bisby por DUKE² (citado por CHUPP, 1964).

Observa-se que até então, o gênero *Colletotrichum*, estabelecido por Corda, em 1831, caracterizado por conídios hialinos, fusiformes e por acérvulos com setas, era confundido ou sobreposto aos gêneros *Vermicularia* Tode e *Gloeosporium* Desm. & Mont. (BAXTER et al., 1985).

Entretanto, na década de cinquenta, a similaridade entre *Colletotrichum* e *Gloeosporium* e entre *Vermicularia* e *Colletotrichum* já estava bem estabelecida (JEFFRIES et al., 1990), já que se observou que espécies enquadradas como *Gloeosporium*, devido à ausência de setas, as produziam em certos substratos e *Vermicularia* e *Colletotrichum* também foram consideradas como sendo o mesmo fungo (BAXTER et al. 1985).

¹Sydow, H. Beiträge zur Kenntnis der Pilzflora des südlichen Ostindiens I. *Ann Mycol.* XI:329-330, 1913.

²DUKE, M.N. The genera *Vermicularia*. *Mycologia*, 17:213-217, 1928

Foi ARX (1957) que rearranjou o gênero *Colletotrichum*, tendo concluído que fungos anamórficos *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium* pertenciam ao mesmo gênero. O conceito do gênero *Colletotrichum* foi então ampliado, embora o número de espécies tenha sido reduzido de centenas para onze. Aquele autor indicou o nome *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. para a fase conidial de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld e V. Schvent, caracterizado por conídios cilíndricos ou elípticos. O gênero *Vermicularia capsici* foi enquadrado como uma das 600 sinonímias de *C. gloeosporioides*. *Colletotrichum capsici* (Syd. Butl et Bisby), foi redefinido como sinonímia de *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grove, considerado como tendo conídios falcados, fase telemórfica *Glomerella tucumanensis* (Speg.) v. Arx e E. Muell.

SMITH et al. (1958) referem-se aos agentes da antracnose de *Capsicum frutescens* L. como *Colletotrichum piperatum* (E. & E.) E. & H. e *C. capsici*, contradizendo HIGGINS (1926). SMITH et al. (1958) não fazem nenhuma referência aos trabalhos de ARX (1957).

SIMMONDS (1965), reestudando espécies de *Colletotrichum* na Austrália, discutiu características culturais, reações de temperatura, tamanho e forma de conídios e amplitude de hospedeiros. Baseando-se nestes resultados, propôs novas designações para *C. gloeosporioides*. Segundo este autor, algumas espécies vegetais podem ser hospedeiras

para mais de uma espécie de *Colletotrichum*, citando como exemplo o pimentão. De fato, em testes de patogenicidade, obteve respostas positivas para *C. gloeosporioides* var. *gloeosporioides*, *C. gloeosporioides* var. *minor*, *C. acutatum*, *C. dematium* e *C. atramentarium*. Concluiu que apesar dos estudos de ARX (1957) terem sido feitos para simplificar a classificação do *Colletotrichum*, tornar-se-ia inevitável que algumas espécies necessitariam ser separadas em novos agrupamentos.

As sugestões elaboradas por SIMMONDS (1965) vieram reforçar as de SUTTON (1962), o qual afirmou que as sinonímias propostas por ARX (1957) haviam sido baseadas em justificativas experimentais insuficientes e em citações ou exames inadequados do material original. A questão que ARX (1957) quis eliminar, a de nomear fungos morfologicamente semelhantes de acordo com o seu hospedeiro, foi resgatada por SIMMONDS (1965).

Mais recentemente, SUTTON (1980) considerou que apesar de ARX (1957) ter compactado o gênero *Colletotrichum* em onze espécies, onde nove formas foram reconhecidas como *Glomerella cingulata* (*C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc.) e três em *C. dematium* (Pers. ex. Fr.) Grove, sendo que muitas sinonímias foram colocadas em *C. gloeosporioides*, *C. grammnicola* (Ces.) Wils. e *C. dematium*, o número de taxa está novamente aumentando, devido a novos estudos e reavaliações. Entretanto, SUTTON (1980) reconheceu que os *C.*

gloeosporioides, *C. dematium* e *C. capsici* são gêneros onde a separação dos elementos subespecíficos não podia ser feita à época. Destaca-se aqui que este autor mantém como espécie *C. capsici*, diferentemente de ARX (1957) que a considerou como sinonímia de *C. dematium* (Pers.: Fries) Grove.

Essa divergência de classificação talvez explique a opção de diversos autores em insistir com a denominação de *Colletotrichum capsici*, em trabalhos que envolvem hospedeiros diversos como tomate, algodão e pimentão (MAIELLO, 1988; PRAKASAN et al., 1989; McCLEAN et al., 1991; ROBERTS et al. 1990; MORDUE, 1971a). No entanto, a descrição que estes autores fazem dos isolados, como tendo conídios falcados com extremidade afilada, não corresponde àquela de *C. gloeosporioides*, onde os conídios são cilíndricos com as extremidades arredondadas (GUNNELL et al. 1992; MORDUE, 1971b).

2.2. Critérios de Caracterização

2.2.1. Morfológico-Culturais

Em todos os trabalhos já citados, a ênfase na taxonomia foi dada à morfologia dos conídios, tipo de apressório e presença ou ausência de setas.

Baseando-se no tamanho dos conídios, ROBERTS et al. (1990) denominaram *Colletotrichum capsici* a isolados patogênicos de pimentão, caracterizados por conídios falcados com tamanho de 14,3 - 35,1 μ de comprimento e 2,6-5,2 μ de largura e numerosas setas; não fizeram qualquer referência a apressórios ou qualquer outra técnica de identificação.

Entretanto, GUNNELL et al. (1992) destacam que a morfologia dos conídios, mais que o tamanho, é um dos critérios mais importantes para a separação de espécies. Outras características também foram consideradas por estes autores, como a curva de crescimento, resposta à temperatura e presença e ausência de setas, em espécies de *Colletotrichum* patogênicas ao morango. Dentro deste gênero e cultura, SMITH (1990) já havia estudado aquelas características, além de outras, tendo observado que todos os isolados de *Colletotrichum*, inclusive *C. gloeosporioides*, produzem massa de conídios de coloração rósea a laranja. Considerou que a coloração dos isolados frequentemente se sobrepõe e por isso não poderia servir como um critério de separação de espécies e isolados.

Além dos conídios, o apressório é enfatizado por outros pesquisadores, como parâmetro para classificação.

O processo de infecção do *Colletotrichum capsici* em *Capsicum annuum* foi estudado por ADIKARAM et al. (1983), onde caracterizaram o apressório como tendo a forma triangular, coloração marrom e medindo 3 μ de diâmetro.

A morfologia e não o tamanho do apressório é um fator de diferenciação de espécies e isolados para *Colletotrichum*, segundo COX et al. (1988), os quais observaram que alguns isolados de *C. gloeosporioides* produzem apressórios profundamente lobados e outros isolados apressórios não lobados. Já em *C. graminicola*, KOZAR et al. (1978) relataram que o apressório era escuro, sendo semelhante a um clamidosporo e de formato arredondado ou piriforme e às vezes irregular e lobado.

A morfologia muito variável dos apressórios de *C. gloeosporioides* isolado de morango, levou GUNNELL et al. (1992) a concluir que este estudo não foi útil para separar aquela espécie das demais.

A germinação dos conídios e a consequente formação dos apressórios, bem como o crescimento micelial, são afetados pela temperatura.

Desde há muito, observou-se que a faixa de temperatura ótima para a germinação dos conídios é maior do que a de formação do apressório, assim como pode diferir para a produção de conídios. O efeito da temperatura sobre estes fatores foram demonstrados para *C. lindemuthianum* isolado de feijão (MATHUR et al. 1950) e para *C. phomoides* isolado de tomate, (KENDRICK et al. 1948). Nesta última espécie, os autores relataram que temperaturas entre 24 a 28°C foram mais favoráveis à esporulação, germinação de esporos, crescimento e infecção.

Em *Colletotrichum lagenarium*, ISHIDA et al. (1969) obtiveram resultados onde os conídios foram capazes de germinar à 32°C, embora tivessem perdido a capacidade de formar apressório.

Para isolados de *C. gloeosporioides*, foi observado que temperaturas acima de 32°C, inibiam a esporulação e portanto que estresse causado por temperaturas elevadas foi prejudicial ao desenvolvimento "in vitro" (SLADE et al., 1987).

Estudos "in vitro" realizados por FRANCISCO NETO et al. (1994) em *C. gloeosporioides* isolados do maracujá, apontaram que a germinação dos conídios foi mais rápida em temperaturas entre 30-33°C e que o desenvolvimento radial do micélio foi pior à 20-22°C e melhor à temperatura de 25°C.

2.2.2. Patogenicidade e Eletroforese

Diferentes comportamentos de isolados de *Colletotrichum* podem ser evidenciados por sua patogenicidade ou virulência.

A patogenicidade dentro de espécies de *Colletotrichum* é uma característica muito variável e esta instabilidade patogênica ficou evidente no trabalho de CASELA et al. (1994), que mostraram esta variabilidade em isolados

monoconidiais de *C. graminicola*, provenientes de uma única lesão de antracnose em sorgo.

Inoculações de *C. gloeosporioides* feitas em berinjela, pimentão, jiló e tomate evidenciaram diferenças de virulência entre os diversos isolados, de acordo com estudos feitos por TAKATSU (1970). Da mesma forma, MADEIRA et al. (1987) inocularam berinjela, por ferimentos, com uma suspensão de 10^4 conídios/ml, provenientes de quatro isolados de *C. gloeosporioides*, sendo que por este método os autores conseguiram diferenciar os isolados.

A classificação de 48 isolados monoconidiais de *C. gloeosporioides* obtidos de *Capsicum* spp., foi feita por KIM et al. (1986), tendo sido possível dividi-los em dois grupos, dependendo se eles infectavam frutos verdes, maduros ou ambos.

Evidências da especialização patogênica do *C. gloeosporioides* em relação a *Capsicum*, *Solanum melongena* e *S. gilo*, foram enfatizadas por FERNANDES et al. (1994a), que relataram a ocorrência de um grupo patogênico em frutos de berinjela e jiló e outro em pimentão. A partir de 15 isolados monoconidiais obtidos daqueles frutos, foi possível diferenciar os dois grupos com base nas características morfológicas - culturais, além da patogênica.

A correlação entre patogenicidade e distinção genética em *C. gloeosporioides* foi demonstrada por BRAITHWAITE et al. (1990) através da análise molecular.

Dentro desta linha, HAYDEN et al. (1994) distinguíram, através de testes de patogenicidade e marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA), biótipos de *C. gloeosporioides* e de outros isolados, obtidos de cinco espécies de frutos diferentes. Com esta metodologia foi também possível diferenciar *C. acutatum*, *C. musae* um do outro e ambos de *C. gloeosporioides*.

A presença ou atividade de proteínas e enzimas, presentes em extratos de micélio ou conídios dos fungos, pode ser visualizada e separada através de eletroforese, na forma de bandas coloridas (ALFENAS et al., 1989), sendo que presentemente é usada para obtenção de dados taxonômicos (BONDE et al., 1991).

A eletroforese permitiu a PARK et al. (1987) a diferenciação de *C. gloeosporioides*, *C. dematium* e *Gloeosporium fructigenum*, isolados de *Capsicum annum*, através de diferenças no padrão de isoenzimas como esterase, leucina aminopeptidase, fosfatase ácida e transaminase glutâmica oxaloacética.

Dentro de *C. gloeosporioides*, foi demonstrado que padrões eletroforéticos de proteínas, extraídas de conídios de 14 isolados, foram idênticos embora distinguíveis quanto aos seus níveis de patogenicidade (DALE et al., 1988).

Considerável variação de virulência entre 5 populações de *C. gloeosporioides*, isolados de *Stylosantes*

guianensis, foi detectada por LENNÉ et al. (1990), apesar da diversidade dos padrões isoenzimicos ter sido muito restrita.

A correlação entre virulência e padrões eletroforéticos de isoenzimas de isolados de *C. orbiculare* não foi constatada por REGO et al. (1994), embora estes perfis fossem importantes na detecção da variabilidade desta espécie.

A comparação de isoenzimas a fim de identificar espécies de *Colletotrichum* em morango, permitiu que BONDE et al. (1991) diferenciassem *C. fragariae* de *C. gloeosporioides*, assim como obtivessem diferenças entre *C. coccodes* e *C. trifolii*, sendo que estes autores sugerem o uso desta técnica na identificação de espécies de *Colletotrichum* dentro de diversos hospedeiros.

2.2.3. Serologia

Além destes métodos mais recentes, o uso da serologia tem-se mostrado há muito como um técnica útil no estudo das relações filogenéticas de fungos fitopatogênicos (FIGUEIREDO et al., 1977), permitindo separar componentes antigênicos da célula microbiana, auxiliando na classificação e taxonomia (SHATTOCK, 1955).

Em *Fusarium*, TEMPEL¹ (citado por FIGUEIREDO et al., 1977) diferenciou raças fisiológicas de *F. oxysporum*, inoculando coelhos por via intraperitoneal, endovenosa, subcutânea e intramuscular, com diferentes preparações de *Fusarium*. Usou testes de microaglutinação, microprecipitina e dupla difusão em ágar. Nos testes de aglutinação, verificou que os microconídios se aglutinavam nos tubos, dificultando a leitura. Com os testes de precipitina, as reações apareceram nos antissoros e não nos soros normais.

De acordo com o autor, o método mais adequado para a diferenciação das formas especiais foi o de dupla difusão em ágar.

Dentro daquele mesmo gênero, BUXTON et al. (1961) usaram testes sorológicos para separar formas especiais e raças fisiológicas. Coelhos foram imunizados com esporos de *F. oxysporum* Sch. f. *cupense* (E.F.Sn.) Wr. & Rcinck e *F. oxysporum psii*. Os antissoros obtidos foram estudados, contra antígenos de 23 formas e raças fisiológicas e assim caracterizou-se raças de *F. oxysporum* f. *cupense* e *F. oxysporum* f. *psii*.

¹TEMPEL, A. Serological onderzoek bij *F. oxysporium*. Meded - Landb Hoorgesh Wageningen, 59:1-60, 1959.

FIGUEIREDO (1972) imunizou coelhos com suspensões de conídios de *Ascochyta phaseolorum*, por meio de injeções intra-musculares e usou extratos de esporos como antígeno reagente, conseguindo identificar a espécie e posteriormente, (FIGUEIREDO et al., 1974) diferenciaram *A. phaseolorum* e outras espécies de *Ascochyta* morfológicamente semelhantes.

LEITE et al. (1994) estudando a variabilidade de *Elsinoe fawcetti*, isolado de tecidos jovens de laranja azeda, limão cravo e laranja doce, complementaram a distinção patogênica e morfológica das espécies de *Elsinoe* com testes sorológicos. Para tanto, usaram a imunização dos coelhos por via subcutânea e a técnica de dupla-difusão em ágar. Observaram que os antissoros dos isolados de laranja azeda e limão cravo produziram reações bastante nítidas com os seus antígenos homólogos.

KIMATI (1975) conseguiu separar por dupla-difusão em agar, *Colletotrichum falcatum* Went., *C. graminicola* f. sp. *zeari* Mess. Laf. e Mol. e *C. graminicola* f. sp. *sorghii* Mess. Laf. e Mol. Para obtenção deste resultado, imunizou coelhos com suspensões de esporos emulsionados com adjuvante incompleto de Freund, aplicando injeções via intramuscular.

Do mesmo modo, GERALDI et al. (1982), observaram, nos testes de dupla-difusão em ágar, que o isolado de *Colletotrichum graminicola* do trigo foi serologicamente distinto das *formae specialis sacchari* e *sorghii* de *C.*

graminicola de trigo, centeio e cevada. Anteriormente, MENTEN et al. (1979) não haviam conseguido detectar diferenças entre 6 isolados pertencentes à 5 raças de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *curcubitae*, por testes serológicos em dupla-difusão em ágar. Demonstraram apenas a existência de componentes antigênicos comuns entre os isolados.

Diferenças nas respostas imunológicas podem ser observadas, de acordo com a metodologia de imunização.

OLIVEIRA (1975) relata que no preparo de antissoros específicos para antígenos purificados, o esquema de imunização do antígeno no linfonódulo responde significativamente mais rápido, quando comparado com outros esquemas de aplicação.

BACH (1991) imunizou coelhos com suspensão de conídios e micélio de *Exserohilum turcicum*, aplicados por injeções via linfonódulos. Os testes de dupla-difusão em ágar de antígenos extraídos de conídios e/ou micélios, não permitiram distinção serológica entre os isolados de milho, sorgo e capim massambará. No teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), o antissoro do isolado do milho distinguiu os isolados de milho e sorgo dos isolados de capim. O antissoro do isolado de capim distinguiu isolados de capim dos de milho e sorgo.

O método serológico de dupla-difusão em ágar, usado por NAKAMURA (1992), diferenciou *Bipolaris maydis* e *B. zeicola* de *Exserohilum turcicum* e *E. rostratum* e entre os dois

últimos, mas não entre os dois primeiros. Porém, nas reações serológicas em *Bipolaris maydis*, *B. zeicola* e *Exserohilum turcicum*, o antígeno preparado por trituração de esporos induziu a formação de linhas de precipitação mais fracas do que os antígenos na forma de difusatos de esporos intactos em salina.

O teste de ELISA, por sua alta sensibilidade, vem sendo usado por diversos pesquisadores, e segundo VOLLER et al. (1980) detecta de 1 a 10 μg de proteína/ml, enquanto que o de dupla-difusão em ágar detecta de 2 a 20 μg de proteína/ml.

O teste de ELISA foi empregado por MOHAN (1989) para observar *Phytophthora fragariae* em morango e HARRISON et al. (1990) quantificaram *Phytophthora infestans* no tecido foliar de batata, usando antissoro obtido do micélio do fungo e antígeno extraído de folhas de batata infectadas com *Phytophthora infestans*.

BOER (1994) avaliou testes serológicos para detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em ramos e tubérculos de batata e encontrou que o teste de ELISA foi o mais sensível e específico entre todos, com uma eficiência de detecção de 97,7% para ramos e 93,3% para tubérculos.

HOLTZ et al. (1994) detectaram, pelo teste de ELISA duas formas distintas de *Thielaviopsis basicola*, agente causal da podridão de raiz em algodão, a forma cultural marrom

e cinza, sendo que este método mostrou a vantagem de diminuir as reações cruzadas com outros fungos.

Todos estes trabalhos têm demonstrado a ampla aplicação do teste de ELISA para detecção e identificação dos patógenos (CLARK, 1981; CLARK et al., 1977; LOMMEL et al., 1982; SUNDARAM et al., 1991).

2.3. Controle Químico e Sensibilidade "in vitro"

Frutos ou outras partes vegetais são quase sempre inoculados ou infectados por *Colletotrichum* durante seu desenvolvimento no campo. Devido a fatores do hospedeiro ou do ambiente, o patógeno não produz uma lesão ativa, ficando em estado quiescente ou latente. Nos trópicos é comum a infecção latente de *Colletotrichum* em várias espécies de frutos (ECKERT et al., 1985).

A colonização latente destes frutos não é evidenciada até que ocorram mudanças no estado fisiológico do hospedeiro (CERKAUSKAS, 1988).

Na superfície dos frutos imaturos, os esporos germinam e originam o apressório e dentre eles, alguns germinam e formam a hifa de infecção mas muitos permanecem aderidos à superfície do fruto, onde funcionam como o estado latente do patógeno (DENNIS, 1993).

Estes aspectos abordados são relevantes, para o controle da antracnose, já que o apressório do *C. gloeosporioides* pode ser facilmente contactado por um fungicida aplicado à superfície do que o é a hifa subcuticular (STANGHELLINI et al., 1982).

Os primeiros fungicidas usados no controle da antracnose em *Capsicum* foram os protetores.

Em frutos maduros de *Capsicum frutescens* L., SMITH et al. (1958) observaram que certos fungicidas foram efetivos na redução da antracnose dos frutos, causada por *C. piperatum* e *C. capsici*. Sob alta incidência da doença, zineb ou maneb aplicados a intervalos de 14 dias a partir de 4 semanas após o florescimento, reduziram significativamente a quantidade de doença.

Os fungicidas mancozeb e captafol induziram comportamentos diferenciados entre *C. capsici* e *C. gloeosporioides* isolados de pimentão. Seus efeitos foram mais pronunciados nos isolados de *C. capsici* do que nos de *C. gloeosporioides* (THIND et al., 1990).

Em *Piper nigrum*, o melhor controle do *C. gloeosporioides* foi obtido com 3 aplicações de mistura de calda bordaleza à 1%, sendo aplicada duas vezes antes do florescimento e outra na formação do fruto (NAIR et al., 1987).

Entretanto, ECKERT et al. (1967) afirmam que após o estabelecimento do patógeno, os fungicidas sistêmicos são em muitos casos o único meio de controle.

Vários fungicidas tem sido empregados isoladamente ou em combinação, para controlar a antracnose. Estes produtos podem influenciar o desenvolvimento da doença durante os estágios iniciais ou avançados da relação patógeno - hospedeiro.

Para *C. gloeosporioides* onde os esporos são propágulos infectivos, a pré-infecção pode ser suprimida em qualquer estágio, como na germinação do esporo, crescimento do tubo germinativo, formação do apressório e penetração. A fase pós penetração também pode ser inibida pela ação destes fungicidas (KWEET et al., 1986).

Trabalhos mais recentes, têm mostrado o efeito do benomyl, aplicado em *Capsicum* e outras culturas afetadas pela antracnose, comparando-o com outros fungicidas.

Em *Capsicum annum*, MISHRA (1988) avaliou o efeito curativo de 5 fungicidas aplicados após a inoculação das plantas com *C. capsici*. A pulverização foi feita com BAVISTIN 50 PM, BENLATE 50 PM, BLITOX 50 PM, DITHANE M-45 75 PM e DITHANE Z-78 75 PM. Observou que todos os fungicidas reduziram a intensidade da doença e a produção foi melhor nas plantas tratadas com BENLATE, embora a intensidade da doença fosse menor nas parcelas tratadas com BAVISTIN, BLITOX e DITHANE.

O efeito de aplicações regulares do benomyl sobre a população de *Colletotrichum* da antracnose da mangueira foi estudado por FITZELL (1981). Observou que aplicações regulares do fungicida (1000 μg i.a./ml) reduziram significativamente a população de *C. gloeosporioides* var. *minor*, embora não houvesse sua erradicação nas lesões.

Visando o controle químico da antracnose (*C. gloeosporioides*) do maracujá, ALMEIDA et al. (1994) aplicaram, a intervalos de 7 dias, os produtos: chlorothalonil SC 50, chlorothalonil PM 75, tiofanato metílico FW 50, chlorothalonil PM 25 + cobre metálico PM 30, prochloraz EC 45, tebuconazole PM 25 propiconazole CE 25% e tiabendazole CE 45. Observaram que todos os fungicidas promoveram um bom controle, com exceção do propiconazole.

O efeito do tratamento preventivo e curativo pós-colheita de alguns fungicidas sobre a antracnose da mangueira foi avaliado por ULLASA (1989). Os fungicidas carbendazim (1000 ppm) + água quente, carbendazim, captafol e prochloraz foram aplicados em duas épocas: pós inoculação das plantas e um dia antes da inoculação com *C. gloeosporioides*. Foi constatado que o tratamento mais eficiente foi o carbendazim, seguido pelo prochloraz e captafol.

Aplicações de benomyl e captafol, sozinhos ou em várias combinações, têm se mostrado como os melhores fungicidas para o controle da podridão floral dos Citrus, causada por *C. gloeosporioides*. Observou-se que de uma a

quatro aplicações durante o florescimento são necessárias para o controle da doença (TIMMER, 1992).

Por outro lado, a toxicidade seletiva dos fungicidas, entendida como a propriedade de certos produtos inibir o crescimento de alguns organismos e não inibir o de outros, tem sido usada para exprimir a eficiência de certos fungicidas, mas pode ainda contribuir para a taxonomia dos fungos (HALL, 1979). Por exemplo, RICHARDSON (1973), observou que a resposta distinta de *Fusarium solani* aos benzimidazóis pode ser útil para estabelecer relações taxonômicas dentro deste gênero.

Para os derivados dos benzimidazóis, como o carbendazin, benomyl, etilbenzimidazol 2-il-carbamato, tiabendazol, tiofanato e tiofanato metílico foi mostrada a ação tóxica para ascomicetos e principalmente deuteromicetos (BOLLEN et al., 1970). A sensibilidade a esses produtos foi determinada pela inibição do crescimento em meio de ágar e pelo controle da doença.

O crescimento "in vitro" de *C. gloeosporioides* foi progressivamente inibido por concentrações crescentes de benomyl, até que 100% de inibição foi atingida com 1 μM . Em *C. acutatum* aquela dose inibiu 100% do crescimento e quando a concentração do ingrediente ativo chegou a 3 μM , o nível de inibição não aumentou (BOLLEN, 1972).

A sensibilidade de *Colletotrichum* spp, isolados do morango, ao benomyl foi avaliada por IGARASHI et al. (1985). Constataram que dos 33 isolados de *Colletotrichum* obtidos de diversos cultivares, 27 se mostraram insensíveis e seis foram sensíveis à 100 ppm do benomyl em meio de cultura. Dois isolados sensíveis não se desenvolveram em 100 ppm, ao passo que 5 dos isolados insensíveis cresceram até 1000 ppm do fungicida. Isolados sensíveis e insensíveis ao benomyl não mostraram diferenças marcantes em sua suscetibilidade à diferentes concentrações de 7 outros fungicidas, dos quais, o mais eficiente foi o propiconazole, seguido de captafol e chlorotalonil.

A inibição do crescimento "in vitro" do *C. capsici* isolado de *Capsicum* foi testada em meio de cultura com 9 fungicidas, em concentrações variando entre 50-300 ppm. KORE et al. (1989) observaram que o crescimento não foi inibido por oxiclureto de cobre, zineb e mancozeb, dithianon, iprodione e captafol a 50 ppm, mas a inibição ocorreu à altas concentrações. O carbendazin e o tiofanato não permitiram bom crescimento do *C. capsici* à 50 ppm.

Anteriormente, ANDRADE et al. (1991) já relataram insensibilidade de isolados de *Colletotrichum* do pimentão ao benomyl (100 ppm), em meio de cultura.

Isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de frutos de pimentão, berinjela e jiló foram testados quanto ao seu grau de resistência ao benomyl por FERNANDES et al. (1994b).

Estes autores testaram doses de 100 e 1000 ppm do ingrediente ativo acrescido ao meio de cultura e os resultados possibilitaram confirmar a resistência dos isolados ao fungicida.

Para a cultura do pimentão, poucas pesquisas foram realizadas no sentido de se testar várias alternativas de controle químico, o que fica evidenciado pela escassez de trabalhos com novos produtos e mesmo para aqueles que não são registrados para esta cultura, como o tebuconazole, os triazóis, fenbuconazole e outros.

3. MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", no período compreendido entre junho/92 a outubro/94

3.1. Patógeno: obtenção e conservação

Os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foram obtidos a partir de frutos de pimentão e jiló comercializados ou provenientes de cultivos, onde estavam evidentes os sintomas de antracnose (Tabela 1).

Os isolamentos foram realizados retirando-se os esporos com agulha, diretamente do agregado gelatinoso róseo formado sobre as lesões de pimentão (*Capsicum annuum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Radd) e transferidos para placas de Petri com ágar-água (20 g de ágar e 1000 ml de água), incubados à 25°C por três dias, sendo então repicados para meio BDA (água de cozimento de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 17 g de ágar e água destilada para 1000 ml). Este meio de cultura

Tabela 1 - Relação dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* estudados e sua procedência.

Isolado	Hospedeiro	Maturação	Procedência	Data do Isolamento
1p	Pimentão	Verde	Clínica/Esalq	abril/92
2p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	abril/92
4p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	maio/92
5p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	maio/92
6p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	maio/92
7p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	maio/92
9p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	maio/92
10p	Pimentão	Verde	Santa Bárbara-SP	maio/92
12p	Pimentão	Verde	Santa Bárbara-SP	maio/92
16j	Jiló	Verde	Bandeirantes-Pr	junho/92
18p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	junho/92
25p	Pimentão	Maduro	Rafard-SP	junho/92
27j	Jiló	Verde	Piracicaba-SP	outubro/92
28j	Jiló	Verde	Piracicaba-SP	outubro/92
30j	Jiló	Verde	Piracicaba-SP	outubro/92
31j	Jiló	Maduro	Piracicaba-SP	outubro/92
32j	Jiló	Maduro	Piracicaba-SP	outubro/92
33j	Jiló	Maduro	Piracicaba-SP	outubro/92
35j	Jiló	Verde	Piracicaba-SP	outubro/92
36j	Jiló	Verde	Piracicaba-SP	outubro/92
39j	Jiló	Maduro	Piracicaba-SP	outubro/92
50p	Pimentão	Maduro	S. Miguel Arcanjo-SP	abril/93
51p	Pimentão	Verde	S. Miguel Arcanjo-SP	abril/93
53p	Pimentão	Verde	Piracicaba-SP	agosto/93
54p	Pimentão	Maduro	Piracicaba-SP	agosto/93

foi usado rotineiramente nos trabalhos de caracterização. Para incubação das culturas usou-se câmara Biotronete, com luz fluorescente contínua e temperatura média de 25°C.

A preservação dos isolados foi feita de acordo com o método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967) e como foi insatisfatória a recuperação do crescimento micelial por este método, usou-se também a conservação das culturas em tubos de ensaio com meio BDA, inclinado ou não, mantidos sob refrigeração à 4°C.

3.2. Desenvolvimento diametral médio de colônias de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

A fim de se observar diferenças no desenvolvimento das colônias de *C. gloeosporioides*, isolados de pimentão (1p, 2p, 5p, 6p, 7p, 9p, 10p, 12p, 25p, 50p, 53p e 54p) e isolados de jiló (27j, 28j; 30j, 32j, 35j e 39j), transferiu-se discos de micélio com 0,6 cm de diâmetro para o centro de placas de Petri com meio BDA. As placas foram mantidas no escuro, à 25°C e a avaliação do crescimento micelial deu-se nos 5^o e 10^o dias de incubação.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 3 repetições e após análise de variância os resultados médios obtidos, foram comparados pelo teste de Tukey.

3.3. Desenvolvimento diametral médio de colônias de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, em diferentes temperaturas

Com o objetivo de se detectar a temperatura ótima de crescimento de colônias, assim como a ocorrência de comportamentos diferenciados diante de diferentes temperaturas dos isolados de pimentão (1p, 2p, 5p, 6p, 7p, 9p, 10p, 12p, 25p, 50p, 53p e 54p) e de jiló (27j, 28j, 30j, 32j, 35j e 39j), procedeu-se à incubação dos isolados nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 32°C e 36°C. Para isso, discos de micélio com 0,6 cm de diâmetro foram transferidos em placas de Petri com meio BDA e estas colocadas nas temperaturas indicadas, e mantidas no escuro.

As avaliações foram realizadas aos 5 e 10 dias de incubação, tomando-se o diâmetro da colônia.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

As avaliações foram realizadas aos 5 e 10 dias de incubação, tomando-se o diâmetro das colônias e cujas médias foram comparadas pelo teste Tukey.

A comparação das temperaturas ótima de crescimento foi feita através de regressão não linear pela função beta (Equação 1), de acordo com HAU et al¹ (citado por BACCHI, 1993) e HAU & KRANZ (1990).

$$N = b_1 (T - b_2)^{b_4} (b_3 - T)^{b_5} \quad \text{onde:}$$

N = % crescimento

b_1 - b_5 = parâmetros estimados para as
temperaturas da regressão não
linear

T = temperatura

3.4. Características Conidiais

Desenvolveu-se culturas monospóricas derivadas de cada isolado em meio BDA durante 10-12 dias, sob luz fluorescente contínua, à temperatura de 25°C.

A suspensão de conídios foi preparada removendo-os do meio de cultura com o auxílio de um pincel e 10 ml de água destilada esterilizada.

¹HAU, B.; EISENSMITH, SP.; KRANZ, J. Construction of temporal models: II Simulation of aerial epidemics. In: GILLIGAN, C. A. ed. Advances in Plant Pathology- Mathematical Modelling for Crop Disease. London Academic Press Inc.; 1985, V.3. p.31-65.

A forma, comprimento e largura dos conídios de cada isolado foram determinados, em lâminas contendo alíquotas da suspensão, sob microscópio Carl Zeiss na objetiva de 40x e Fillar Micrometer Eyepiece Bausch & Lomb ocular 10x, perfazendo um aumento de 400x. Para cada isolado, escolheu-se ao acaso 50 conídios, cujas medidas representam a variação das médias de comprimento e largura, além da ênfase à maior e menor dimensão observada para os dois parâmetros em cada isolado.

A coloração da massa conidial foi observada pelo contraste desta contra o fundo branco.

Os resultados médios do comprimento e largura (μ) dos conídios foram comparados pelo teste de Duncan.

3.5. Características do Apressório

Estudou-se os apressórios usando-se lâminas de vidro para microscopia, as quais receberam uma gota de suspensão de conídios obtida de acordo com o método descrito no item 3.4. As lâminas assim preparadas foram colocadas sobre a parte interna da tampa da placa de Petri e esta coberta com o seu respectivo fundo, o qual continha ágar- água esterilizado, servindo este conjunto como câmara úmida para a germinação dos conídios. Esta metodologia foi semelhante àquela descrita por SMITH (1990).

Decorrido um período de 6 a 8 horas, no qual as placas foram mantidas sob iluminação à temperatura ambiente, colocou-se sobre cada lâmina uma gota de corante azul algodão-

lactofenol. Este procedimento teve por finalidade estacionar o crescimento dos pró-micélios e apressórios e evitar a anastomose entre os conídios germinados.

Os parâmetros comprimento e maior diâmetro do apressório (considerado a largura), bem como a sua forma, foram determinados a partir de medidas de 20 apressórios por isolado de pimentão (7p, 10p, 18p, 25p, 50p, 51p e 54p) e de jiló (27j, 30j, 32j e 36j) e os instrumentos ópticos foram aqueles usados para medir os conídios.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.6. Teste de Patogenicidade

A capacidade dos isolados de causar lesão em frutos foi testada em laboratório, usando-se frutos destacados de pimentão e jiló, obtidos no comércio varejista.

Frutos verdes foram esterilizados superficialmente imergindo-os primeiramente em álcool etílico à 95% por 1 minuto, a seguir em solução à 5% de hipoclorito de sódio comercial por 10 minutos, sendo então lavados em água destilada esterilizada e secos ao ar.

Os isolados foram testados em quatro frutos de pimentão e quatro de jiló, feridos com agulha hipodérmica e acondicionados em cubas de vidro, para serem inoculados com uma suspensão de $2 \cdot 10^4$ conídios/ml, colocada sobre os ferimentos com uma micropipeta de 100 μ l. Ressalta-se que as inoculações foram cruzadas: isolado de pimentão x fruto de

pimentão e x fruto de jiló; isolado de jiló x fruto de jiló e x fruto de pimentão.

Às cubas com os frutos inoculados foram acrescentados chumaços de algodão embebidos em água, para formação de câmara úmida e durante os 3 dias de incubação foram mantidas sob iluminação à temperatura ambiente.

Na avaliação do diâmetro das lesões, considerou-se positivas àquelas caracterizadas pela forma circular à oblonga, deprimidas e com indicação de pelo menos início de esporulação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema fatorial de 20 x 2 (isolado x fruto) e quatro repetições.

O diâmetro médio das lesões nos frutos destacados de pimentão e jiló, bem como a média dos isolados, foram comparados pelo teste de Tukey.

3.7. Teste de eficiência *in vitro* de fungicidas para os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de pimentão e jiló

Devido à escassez de resultados referentes ao comportamento de isolados de *C. gloeosporioides* de pimentão e jiló frente ao controle químico, testou-se o fungicida benomyl e outros em fase de experimentação ou registrados para outras culturas (Tabela 2).

Tabela 2 - Fungicidas utilizados nos experimentos.

NOME COMERCIAL	NOME TÉCNICO	FORMULAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DO INGREDIENTE ATIVO
BENLATE	benomyl	Pó-molhável	50%
DEROSAL	carbendazim	Susp. concentrada	50%
CGA 219417	cyprodinil*	Pó-molhável	7,5%
SPOT LESS	diniconazole	Pó-molhável	12,5%
CGA 173506	fludioxonil*	Pó-molhável	50%
PALISADE	fluquinconazole	Pó-molhável	25%
MONCUT	flutolanil	Pó-molhável	5%
MANAGE	imebenconazole	Pó-molhável	15%
BELLKUTE	iminocadine	Pó-molhável	40%
SPORTAK	prochloraz	Conc. emulsionável	45%
MYTHOS	pyremetanil	Susp. concentrada	30%
FOLICUR	tebuconazole	Conc. emulsionável	25%
BAYFIDAN	triadimenol	Conc. emulsionável	25%
BIM	tricyclazole	Conc. emulsionável	50%
INDAR 2F	fenbuconazole	Susp. concentrada	24%

* produto em fase experimental

3.7.1. Efeito de doses crescentes dos fungicidas benomyl, prochloraz, triadimenol, tebuconazole e diniconazole

3.7.1.1. Benomyl

Com a finalidade de se detectar níveis de resistência dos isolados de *C. gloeosporioides* de pimentão e jiló ao benomyl, testou-se as doses de 0, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$ do princípio ativo. Os isolados estudados foram 1p, 5p, 6p, 7p, 9p, 10p, 18p, 25p, 50p, 53p, 54p e 27j, 28j, 30j e 35j.

O preparo do meio de cultura com fungicida foi feito a partir de uma suspensão estoque de 400 $\mu\text{g/ml}$ do princípio ativo e desta suspensão estoque fez-se diluição em série até a obtenção das diluições desejadas. Assim, 1 ml de cada concentração foi adicionado à 99 ml de meio de cultura BDA, à temperatura de 45-50°C e a seguir foram vertidos para as placas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 4 x 15 (dose e isolado) e três repetições, representadas por 3 placas de petri.

As avaliações foram feitas no 5º e 10º dias de incubação, através da medição do diâmetro das colônias.

Foram feitas análises de regressão linear para os níveis de dose e isolados, onde se determinou a ED_{50} (dose

de eficiência que inibe 50% do crescimento), aos 10 dias de incubação.

3.7.1.2. Prochloraz, Triadimenol, Tebuconazole e Diniconazole

Os fungicidas foram testados nas doses de 0, 1,0, 10 e 100 $\mu\text{m/ml}$ do princípio ativo e os isolados estudados foram 1p, 2p, 7p, 10p, 25p, 50p, 51p, 53p e 54p de pimentão e 27j, 31j, 35j, 36j e 39j de jiló.

O fungicida diniconazole, que à semelhança do benomyl é pó-molhável, assim como o prochloraz, tebuconazole e mesmo o triadimenol, cuja formulação é de concentrado emulsionável, foram preparados e adicionados ao meio de cultura à maneira citada no item 3.7.1.1..

A partir de culturas com 10 dias de idade, retirou-se da periferia da colônia, discos de micélio com 0,8 cm de diâmetro, os quais foram transferidos para o meio com fungicida e incubados por 10 dias. Foram feitas 3 repetições por tratamento, representados por 3 placas de petri.

Procedeu-se a avaliação medindo-se o diâmetro das colônias aos 10 dias de incubação, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey. A análise de regressão linear estabeleceu a ED_{50} (dose de eficiência que inibe 50% do crescimento).

3.7.2. Efeito dos fungicidas imebenconazole, iminoctadine, pyremetanil, carbendazin, tricyclazole, fluquinconazole, flutolanil, fludioxonil, cyprodinil e fenbuconazole, sobre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*

Em meio de cultura BDA, adicionou-se diretamente 100 µg/ml do princípio ativo dos fungicidas imebenconazole, iminoctadine, pyremetanil, carbendazin, tricyclazole, fluquinconazole, flutolanil, fludioxonil, cyprodinil e fenbuconazole.

Os isolados testados foram 1p, 2p, 6p, 7p, 18p, 25p, 50p, 51p, 53p e 54p de pimentão e 27j, 28j, 32j, 35j, 36j, 39j de jiló.

A inoculação dos meios e a avaliação do crescimento das colônias foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 3.7.1.2.

O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados, com três repetições, em esquema fatorial de 10 x 17 (fungicidas e isolados), sendo considerado o parâmetro porcentagem de inibição do crescimento em relação à testemunha e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.8. Efeito do tratamento preventivo e curativo de 4 fungicidas sistêmicos no controle da antracnose na cultura do pimentão

3.8.1. Planta hospedeira e substrato

As plantas de pimentão foram obtidas a partir de mudas da variedade Agronômico G10, provenientes da empresa Agroflora.

O substrato usado para cultivo das plantas foi mistura de esterco de curral, areia e solo argiloso (3:2:2), esterilizados e contidos em sacos plásticos com capacidade para 5 kg de solo.

3.8.2. Inoculação e fungicidas

As plantas foram inoculadas à época do florescimento, com uma suspensão de $4 \cdot 10^4$ conídios/ml de conídios do isolado 1 de *C. gloeosporioides*.

Com o propósito de avaliar a melhor forma de aplicação, assim como o fungicida que promovesse o melhor controle da antracnose, foram avaliados os efeitos preventivo e curativo dos fungicidas listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Fungicidas testados no experimento 1.

NOME COMERCIAL	NOME TÉCNICO	FORMULAÇÃO	CONCEN-TRAÇÃO DO INGREDIEN-TE ATIVO	DOSE
BENLATE	benomyl	Pó-molhável	50%	70g/100 l
SUMI-EIGHT	diniconazole	Pó-molhável	12,5%	20g/100 l
FOLICUR	tebuconazole	Concentrado Emulsionável	25%	750 ml/300l
BAYFIDAN	triadimenol	Concentrado Emulsionável	25%	500 ml/300l

Para o tratamento preventivo as plantas foram pulverizadas com os fungicidas, dez dias antes da inoculação e para o tratamento curativo ou erradicante as plantas foram tratadas com os fungicidas quinze dias após a inoculação.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 9 tratamentos e 4 repetições, sendo cada parcela representada de um vaso com uma planta.

Os tratamentos incluíam:

1. Plantas não tratadas
2. Tratamento preventivo com triadimenol
3. Tratamento preventivo com tebuconazole
4. Tratamento preventivo com diconazole
5. Tratamento preventivo com benomyl

6. Tratamento curativo com triadimenol
7. Tratamento curativo com tebuconazole
8. Tratamento curativo com diniconazole
9. Tratamento curativo com benomyl

Os parâmetros avaliados foram a incidência de frutos com lesão (% total) e notas para os frutos, sendo que para isso foi elaborada uma escala de notas, que estimou a porcentagem de área do fruto lesionada (Figura 1). Assim, considerou-se:

nota 0 = ausência de lesão

nota 1 = até 10% da área do fruto com lesão

nota 2 = de 11 a 20% da área do fruto com lesão

nota 3 = de 21 a 30% da área do fruto com lesão

nota 4 = de 31 a 40% da área do fruto com lesão

nota 5 = de 41 a 50% da área do fruto com lesão

Estas avaliações foram feitas a partir de 35 dias após a inoculação, época do aparecimento das primeiras lesões, até aos 65 dias após a inoculação, época que correspondeu ao aparecimento das últimas lesões.

As médias da porcentagem de frutos com lesão (Incidência total), foram comparadas pelo teste de Tukey.

Obtiveram-se a média das notas dos frutos por parcela e a seguir a nota média por tratamento, sendo então procedida a análise de variância deste parâmetro e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

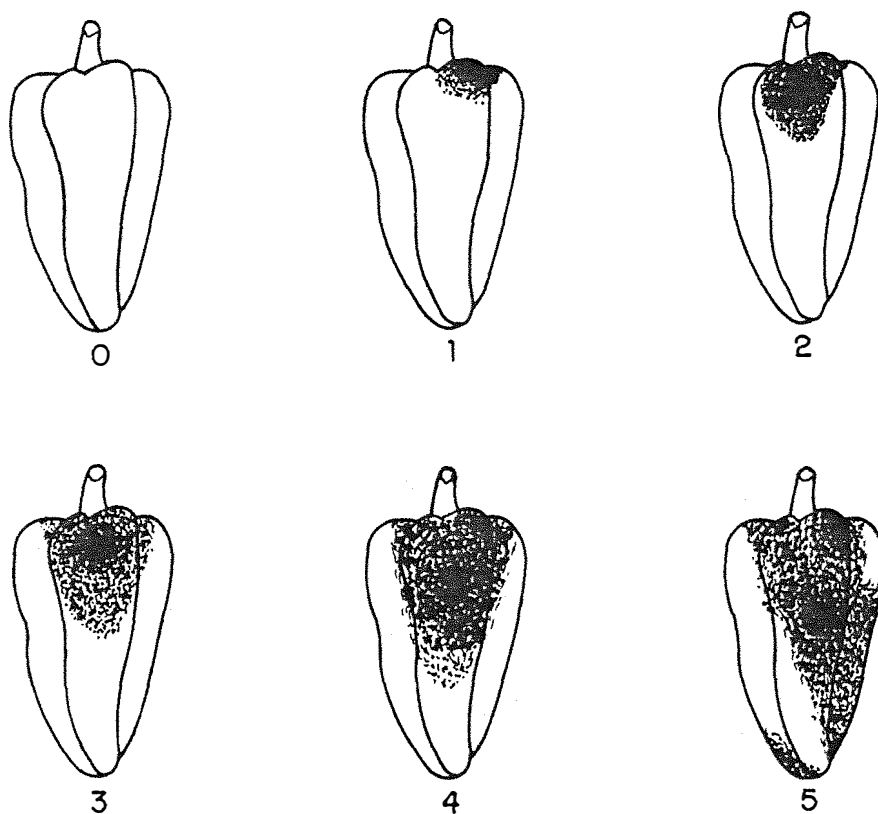


FIGURA 1 - Escala de notas para área (%) do fruto de pimentão com lesão de antracnose.

Notas: 0 (fruto sadio); 1 (até 10% da área do fruto com lesão); 2 (de 11 a 20% da área do fruto com lesão); 3 (de 21 a 30% da área do fruto com lesão); 4 (de 31 a 40% da área do fruto com lesão); 5 (de 41 a 50% da área do fruto com lesão).

3.9. Caracterização serológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

3.9.1. Extração de antígenos para reação

3.9.1.1. Para o método de dupla-difusão em ágar

O preparo dos antígenos para reação em dupla difusão em gel de ágar foi feito de acordo com metodologia citada por FANCELLI (1991) e adaptada para cultivo de *Colletotrichum*.

Discos de micélio dos isolados 7p, 10p, 50p, 51p, 53p e 54p e 30j, 31j, 32j, 35j e 36j, retirados da periferia de colonias cultivadas em BDA e com 10 dias de idade, foram colocados em meio líquido BD (caldo de 200 g de batata, Dextrose de 20 g e 1000 ml de água).

Decorridos 10 dias de incubação à 25°C, o micélio foi colhido por filtração em papel de filtro Whatman nº 3, lavado com solução salina tamponada (Tampão fosfato de potássio pH 7,6 + 0,85% de NaCl). Em seguida foi centrifugado a 4000 G (Sorvall, SS-4) e macerado em almofariz, com o auxílio de areia fina esterilizada e 5 ml de solução salina tamponada. A areia foi separada do extrato, por centrifugação à 4000 G durante 15 minutos.

Ao extrato adicionou-se 1% de azida de sódio à 10%, sendo então acondicionado em vidros e armazenados no congelador.

3.9.1.2. Para o teste de ELISA

A extração de substâncias solúveis, do micélio dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* para o teste de ELISA ("Enzyme linked immunosorbent assay"), baseou-se no descrito por BACH (1991).

Dois gramas de peso fresco de micélio dos isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de acordo com o item 3.9.1.1., foram triturados em almofariz de porcelana, com 1 ml de ácido acético 0,03 N. A seguir, os extratos foram mantidos em banho maria fervente por 45 minutos, filtrados em gaze e centrifugados a 4000 G (Sorvall, SS-4), por 10 minutos. Após a neutralização a pH 7.0 com NaOH o sobrenadante foi congelado até a quantificação de proteínas, pelo teste de Lowry (item 3.9.3.)

3.9.2. Obtenção de antissoros

3.9.2.1. Antissoros para imunógenos de micélio

A técnica de preparo dos antissoros, a partir de imunização com micélio, foi a citada por BACH (1991).

Micélio (7 g PF) de *C. gloeosporioides*, isolado de pimentão e jiló, desenvolvido segundo o item 3.9.1., foi homogeneizado em Ultra Turrax (Tecnal) com 3 ml de NaCl 0,85%, sendo o extrato filtrado em gaze.

Volumes iguais de extrato e adjuvante de Freund incompleto foram emulsionados e 0,5 ml desta emulsão foi injetada, via linfonódulo, na coxa esquerda de coelhas da raça Nova Zelândia, com 2 kg de peso corporal. Os isolados 32j e 39j de jiló e os 1p, 50p e 54p de pimentão foram os antígenos imunizantes usados.

A sangria dos animais foi feita em dois momentos: a primeira, imediatamente antes da imunização e teve por finalidade a obtenção do soro normal (SN); a segunda foi realizada passados 31 dias da injeção no linfonódulo. O sangue foi coletado da veia auricular marginal, sendo resfriado por 4 horas para coagulação e separação do plasma. Após 2 centrifugações sucessivas à 10.000 G (Sorvall, SS-4) por 10 minutos, obteve-se os antissoros aos quais se adicionou 1% de azida sódica à 10%, sendo conservados no congelador até o uso.

3.9.2.2. Antissoro para imunógeno de confídio

A obtenção deste antissoro foi elaborada de acordo com a metodologia usada por FANCELLI (1991).

À partir de cultura do isolado 54p, desenvolvida de acordo com o descrito em 3.9.1, obtiveram-se 10^8 conídios/ml. Estes conídios foram filtrados em Millipore de 0,4 μ m e lavados em solução salina tamponada (NaCl 8,5 g; KH_2PO_4 0,38 g; K_2HPO_4 1,21 em 1000 ml de água destilada; pH ajustado para 7.2).

Uma alíquota de 3 ml desta suspensão foi emulsionada com 0,5 ml de adjuvante Freund incompleto e 2 ml da emulsão foi injetada, via linfonódulo, na coxa de coelho, tendo-se o cuidado de retirar o soro normal antes da injeção.

O esquema de imunização foi o de 2 injeções semanais, durante 3 semanas.

O antissoro foi coletado após 21 dias da primeira injeção e o método de coleta e de preservação foi o mesmo descrito no item 3.9.2.1.

3.9.3. Testes sorológicos

A distinção serológica entre os isolados de pimentão e jiló foi feita pelos métodos de dupla-difusão em ágar (OUCHTERLONY, 1979) e pela técnica de "Enzyme linked immunosorbent assay" - Elisa.

3.9.3.1. Teste de dupla difusão em gel de ágar-Ouchterlony

Preparou-se uma solução de ágar (1% de ágar Difco em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0, acrescido de 0,85% de NaCl) e 1 ml de azida sódica à 10%. Colocou-se 5 ml desta solução fundente em lâminas de vidro para microscopia (NAKAMURA, 1992; BACH, 1991; KIMATI, 1975; FIGUEIREDO, 1972). Após a solidificação, perfurou-se a camada de ágar com o auxílio de um conjunto de 6 cilindros ocos, de 0,4 cm de diâmetro dispostos hexagonalmente, e um cilindro central, sendo a distância entre os vértices do hexágono de 0,5.

Os antígenos reagentes foram colocados nos poços circundantes e o antissoro no poço central, sendo que o preenchimento dos poços foi feito por duas vezes dentro de um intervalo de tempo de 30 minutos. As lâminas foram mantidas em câmara úmida por dois dias.

Determinou-se as reações entre antígeno e antissoro homólogos e heterólogos para os diferentes isolados, comparando-as com o soro normal.

3.9.3.2. Teste de Elisa Indireto

Outro método realizado foi o teste de Elisa Indireto (PTA-Elisa-Plate Trapped Antigen - Enzyme Linked Immunosorbent Assay), BAKER et al. (1991).

Poços em placas de poliestireno para microtitulação ELISA (marca Dynatech, M129A) foram preenchidos com 100 μ l dos antígenos reagentes concentrados e diluídos 1:1, em tampão carbonato (1,59 g Na_2CO_3 ; 2,93 g NaHCO_3 ; 0,2 g NaN_3 ; q.s.p 1000 ml H_2O) pH 9,6. Incubou-se à 37°C por 2 horas. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS-Tween (8,0 g NaCl ; 0,2 g KH_2PO_4 ; 1,5 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KCl ; 0,2 g NaN_3 , q.s.p 100 ml H_2O 0,5 ml Tween-20) pH 7,4. Adicionou-se 100 μ l do antissoro diluído 1:1 em solução de 0,2 M Tris-HCl-0,15 M NaCl , pH 7,2 e incubou-se à 37°C por 2 horas, após o que as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween. Foram colocados 100 μ l de "goat-anti-rabbit IgG" (marca Sigma Chem.) conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co.), diluídos a 1:9000 em solução 0,2 M Tris-HCl-0,15 M NaCl , pH 7,2. Novamente o material foi incubado à 37°C por 2 horas e a lavagem foi feita como as anteriores. Adicionou-se o substrato para-nitrofenol fosfato (100 μ l), diluído em tampão de dietanolamina (97 ml dietanolamina; 800 ml H_2O ; 0,2 g NaN_3 ; q.s.p. 1000 ml H_2O), pH 9,8. A absorvância foi medida no espectrofotômetro Pye Unicam SP8-400 UV/Vis a 405 nm, após a paralização da reação com 50 μ l de NaOH 3M/poço.

Os resultados foram comparados com os do soro normal e dos reagentes, sendo os primeiros consideradas as provas negativas.

3.10. Eletroforese

3.10.1. Crescimento dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio líquido

Para a extração de proteínas e análise do perfil eletroforético dos isolados 7p, 10p, 25p, 50p, 51p, 54p e 30j, 32j, 35j e 36j de *C. gloeosporioides*, foi estabelecido o crescimento destes fungos em meio líquido de batata-dextrose. Para isso, usou-se, para cada isolado, 3 erlenmeyer de capacidade de 125 ml, contendo 30 ml de meio líquido, onde se inocularam discos de micélio provenientes da periferia de culturas, com 10 dias de idade. A incubação foi feita à temperatura de 25°C durante 10 dias.

O micélio desenvolvido em cada frasco foi colhido por filtração em funil Buchner com papel de filtro Whatmann nº 1, pesado previamente. A seguir, o micélio foi seco à temperatura ambiente e pesado, obtendo-se o peso fresco. O peso seco foi determinado colocando-se os recipientes de vidro à 80°C por 24 horas, tarando-os, e cada vidro recebeu um determinado peso fresco de micélio. O material assim preparado foi seco em estufa, à 80°C, até a obtenção do peso constante.

3.10.2. Extração de proteínas dos isolados

As 300 mg de peso seco de micélio de todos os isolados testados de *C. gloeosporioides* foram trituradas em almofariz, em banho de gelo, com 1 ml de tampão Tris-glicina 0,125 M, pH 8,2. A seguir, as amostras foram mantidas à 4°C durante 4 horas e depois filtradas em gaze. O filtrado constitui-se de extrato proteico.

3.10.3. Determinação da concentração de proteínas nas amostras

O método de Loury foi usado para estimar a concentração de proteínas nos extratos (BACH, 1991; BACH et al. 1993).

Preparou-se previamente vários reagentes necessários para as quantificações. O reagente B1 constituiu-se de 1% de sulfato de cobre pentahidratado, em água destilada; o B2 foi composto por 2% de tartarato de sódio em água destilada; o reagente A constituiu-se de 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 N. A solução reagente C foi preparada misturando-se 0,5 ml de cada reagente B e 49 ml do reagente A.

A cada 0,2 ml das amostras, pipetou-se 1 ml da solução reagente C, agitou-se e após 10 minutos, adicionou-se 0,1 ml do reagente Folin Ciocalteau 2 N (Qeel-Ind Quim. São

Paulo, SP), previamente diluído com água destilada (1:1, v/v). As amostras foram agitadas e após 30 minutos, procedeu-se à determinação das respectivas absorbâncias, no comprimento de onda de 500 nm, em espectrofotômetro ultravioleta. A concentração de proteínas em cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de soro-albumina bovina por ml (Eq μg SAB/ml) (Sigma Chem. Co.), foi determinada utilizando-se curvas padrão de diferentes concentrações de SAB, variando de 500 a 1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em função de suas respectivas absorbâncias a 500 nm.

3.10.4. Preparo do gel de Poliacrilamida

Para a análise eletroforética dos isolados testados, foi utilizado o gel de poliacrilamida, que consiste de uma reação de polimerização entre a Acrilamida (AA) e metileno-bis-acrilamida (BIS) na concentração de 5%, para observação de esterase.

Após a dissolução da AA e do BIS em tampão tris-glicina 0,125 M e pH 8,2, adicionou-se à mistura 0,1 ml de tetrametildiamina (TEMED) e 2,8 ml de persulfato de amônio na concentração de 2%. Esta mistura foi injetada, com o auxílio de uma seringa de 25 ml, entre 2 placas (18 x 15 cm) sendo uma de vidro e outra de polietileno, separadas entre si por meio de um espaçador de 2 mm de espessura, contendo incluso um pente de 12 amostras.

O espaçador foi retirado após a polimerização completa do gel de poliácridamida, e a placa de polietileno foi removida com cuidado, permanecendo o gel na placa de vidro. Esta placa foi transferida para uma cuba de sistema horizontal contendo tampão Tris-glicina 0,125 M e pH 8,2 e a conexão do gel com a solução foi feita com papel de filtro Whatmamm nº 3.

3.10.5. Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Em cada poço formado no gel pelo pente, foram aplicados 20 μ l do extrato, contendo 500 μ g em equivalente de SAB. A corrida foi realizada em aparelho horizontal marca Permatron, mantendo-se a corrente em 5 mA, até o corante marcador sair da cavidade, passando depois para 10 mA até o final da corrida. O corante marcador foi o azul de bromofenol à 0,25% em tris-glicina pH 8,2 mais sacarose à 10%.

As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura de 10°C e foram repetidas 3 vezes para cada amostra.

3.10.6. Coloração

Os géis foram removidos das placas, após a corrida eletroforética, e imersos imediatamente em solução corante da esterase. Esta coloração consiste em dissolver 50 mg de "Fast red TR" em 100 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,5, adicionado de 2 ml de solução 1% de β -naftil acetato em 50% de acetona. O gel foi deixado nesta solução por uma hora e depois fixado com ácido acético à 7% (JVO et al. 1973, modificado por BACH, 1989).

3.10.7. Preservação dos géis

Após a coloração, os géis foram imersos em solução de metanol, ácido acético e água na proporção de 50:75:100, contendo 10% de glicerina (v/v), durante uma hora. Embebeu-se também duas folhas de papel celofane nesta solução.

Recobriu-se uma placa de vidro com uma destas folhas e cujos bordos foram dobrados por baixo da placa, não deixando bolhas de ar sob o papel. O gel foi colocado sobre a placa assim forrada e com a outra folha cobriu-se o gel, tomando-se todos os cuidados da etapa anterior, deixando-se secar à temperatura ambiente. Depois de seco, o gel foi retirado da placa de vidro e o excesso de papel celofane foi retirado.

3.10.8. Análise do Perfil Eletroforético

Os perfis foram analisados com base no número, posição e intensidade das bandas. Os géis foram passados no densitômetro Desaga, utilizando-se o filtro de 540 nm e a seguir desenhados e interpretados.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento diametral médio das colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

O crescimento micelial dos isolados de *C. gloeosporioides*, avaliados aos 5 e 10 dias de incubação, mostrou que os isolados 1p, 5p, 7p e 27j se desenvolveram em meio de cultura, mais rapidamente do que os demais aos 10 dias (Tabela 4).

Os isolados 6p, 9p, 10p, 28j, 30j, 39j, 50p, 53p e 54p, tiveram igual desempenho e embora não fossem estatisticamente diferentes dos anteriores, mostraram um crescimento pouco menor, aos 10 dias

Dentro do grupo pimentão, os isolados 25p e 12p foram os de crescimento mais lento, enquanto que para o grupo jiló, o isolado 35 apresentou menor crescimento, sendo ainda menor que o isolado 30, que teve um crescimento inicial muito reduzido.

TABELA 4 - Diâmetro médio (cm) das colonias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Isolados	Médias do crescimento (cm)	
	5 dias	10 dias
1p	4,90 abc**	8,43 a
2p	4,10 abcd	7,36 abc
5p	4,90 abc	8,40 ab
6p	2,70 cde	6,33 abcd
7p	3,70 bcd	7,96 ab
9p	2,63 cde	6,10 abcd
10p	2,70 cde	6,46 abcd
12p	1,06 e	4,93 bcd
25p	2,76 cde	3,63 d
27j	6,16 ab	8,20 ab
28j	5,1 abc	6,53 abcd
30j	2,26 de	5,06 abcd
32j	4,7 abcd	6,63 abcd
35j	4,0 bcd	4,33 cd
39j	4,76 abc	5,96 abcd
50p	4,46 abcd	6,56 abcd
53p	4,8 abc	5,93 abcd
54p	6,53 a	6,90 abcd
DMS(1%)	2,49	3,47

** Médias seguidas por letras distintas, na coluna diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

4.2. Desenvolvimento diametral médio de colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, sob diferentes temperaturas

O crescimento das colônias dos isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de pimentão e jiló, e desenvolvidos sob temperaturas de 15, 20, 25, 32 e 36°C, foram avaliados aos 5 e 10 dias de incubação (Tabela 5 e 6).

Os isolados 27j e 54p cresceram expressivamente na faixa de temperatura entre 15°C até 32°C, sendo seguidos pelos isolados 5p, 1p, 7p, 50p, 30j, 32j, 35j e 39j. Para estes últimos a temperatura de 32°C foi limitante, o que não ocorreu para o 27j e 54p, já que não houve diferença estatística significativa nas temperaturas menores à 32°C, para o isolado 27j, embora à 25°C o diâmetro das colônias tenha sido ligeiramente superior. Para o isolado 54p o melhor crescimento ficou compreendido entre 15° a 25° C e a partir desse ponto, o crescimento micelial foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura.

A avaliação aos 10 dias de incubação (Tabela 6) permitiu diferenciar mais perfeitamente os isolados quanto à temperatura ótima do crescimento. Essa determinação foi estabelecida através de análise de regressão não linear, sendo a curva ajustada pela função beta (Equação 1), a qual descreveu o efeito da temperatura sobre o crescimento dos isolados (Figura 2).

TABELA 5 - Diâmetro médio (cm) das colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidas sob diferentes temperaturas, aos 5 dias de incubação.

Isolado	Temperatura (°C)				
	15	20	25	32	36
1p	2,8 abc**	4,30 bcd	6,83 a	0,80 b	0,80 a
2p	2,26 abcd	3,76 bcde	4,10 cde	0,80 b	0,80 a
5p	3,20 ab	4,73 abc	6,06 ab	0,80 b	0,80 a
6p	1,90 bcd	3,03 de	3,93 cde	0,80 b	0,80 a
7p	2,73 abc	3,46 bcde	1,50 h	0,80 b	0,80 a
9p	1,86 bcd	2,60 ef	3,60 def	0,80 b	0,80 a
10p	1,70 cd	2,56 ef	3,63 def	0,80 b	0,80 a
12p	1,06 d	1,40 f	1,86 gh	0,80 b	0,80 a
25p	2,06 bcd	3,36 cde	2,73 efgh,	0,80 b	0,80 a
27j	3,66 a	5,90 a	6,16 a	5,66 a	0,80 a
28j	2,13 bcd	4,26 bcd	5,26 bc	0,96 b	0,80 a
30j	2,46 abcd	2,73 ef	2,33 fgh,	1,0 b	0,80 a
32j	2,43 abcd	3,73 bcde	4,76 bcd	0,80 b	0,80 a
35j	2,13 bcd	3,46 bcde	2,93 efg,	0,80 b	0,80 a
39j	2,40 abcd	3,83 bcde	4,53 cd	0,80 b	0,80 a
50p	2,83 abc	4,26 bcd	3,10 efg,	0,90 b	0,80 a
53p	2,30 abcd	3,56 bcde	4,80 bcd	0,80 b	0,80 a
54p	2,53 abc	4,80 ab	6,76 a	4,73 a	0,80 a
médias	2,36 B	3,64 B	4,16 A	1,31 D	0,80 C

DHS(1%) = 1,40

** Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e por letras maiúsculas nas linhas diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

TABELA 6 - Diâmetro médio (cm) das colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidas sob diferentes temperaturas, aos 10 dias de incubação.

Isolado	Temperatura (°C)				
	15	20	25	32	36
1p	4,50 bcde**	7,13 abc	8,43 a	0,80 c	0,80 b
2p	4,10 bcde	5,86 cde	7,36 abcde	0,80 c	0,80 b
5p	4,93 bcd	8,06 a	8,40 a	0,80 c	0,80 b
6p	3,46 def	5,33 ef	6,96 abcd	0,80 c	0,80 b
7p	5,03 bcd	6,80 abcde	7,96 abc	0,80 c	0,80 b
9p	3,50 def	5,83 cde	6,10 def	0,80 c	0,80 b
10p	3,30 ef	5,73 cde	6,46 cdef	0,80 c	0,80 b
12p	2,36 f	3,76 f	4,93 fgh	0,80 c	2,90 a
25p	4,53 bcde	6,36 bcde	3,63 h,	0,80 c	0,80 b
27j	6,73 a	6,76 abcde	8,20 a	7,40 a	0,80 b
28j	4,60 bcde	6,96 abcd	6,53 cdef,	0,86 c	0,80 b
30j	5,13 abc	7,30 abc	5,06 efgh,	1,0 c	0,80 b
32j	4,93 bcd	6,70 abcde	6,63 bcde,	0,80 c	0,80 b
35j	4,33 bcde	5,43 de	4,33 gh,	0,80 c	0,80 b
39j	4,73 bcde	6,10 bcde	5,96 def,	0,80 c	0,80b
50p	5,60 ab	6,76 abcde	6,56 cde,	1,0 c	0,80 b
53p	3,83 bcde	6,30 bcde	5,93 defg,	0,80 c	0,80 b
54p	5,13 abc	7,66 ab	6,90 abcd	4,93 b	0,80 b
Médias	4,48 B	6,38 A	6,47A	1,42 C	0,91 D

DMS (1%) = 1,62

** Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e por letras maiúsculas na linha, diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

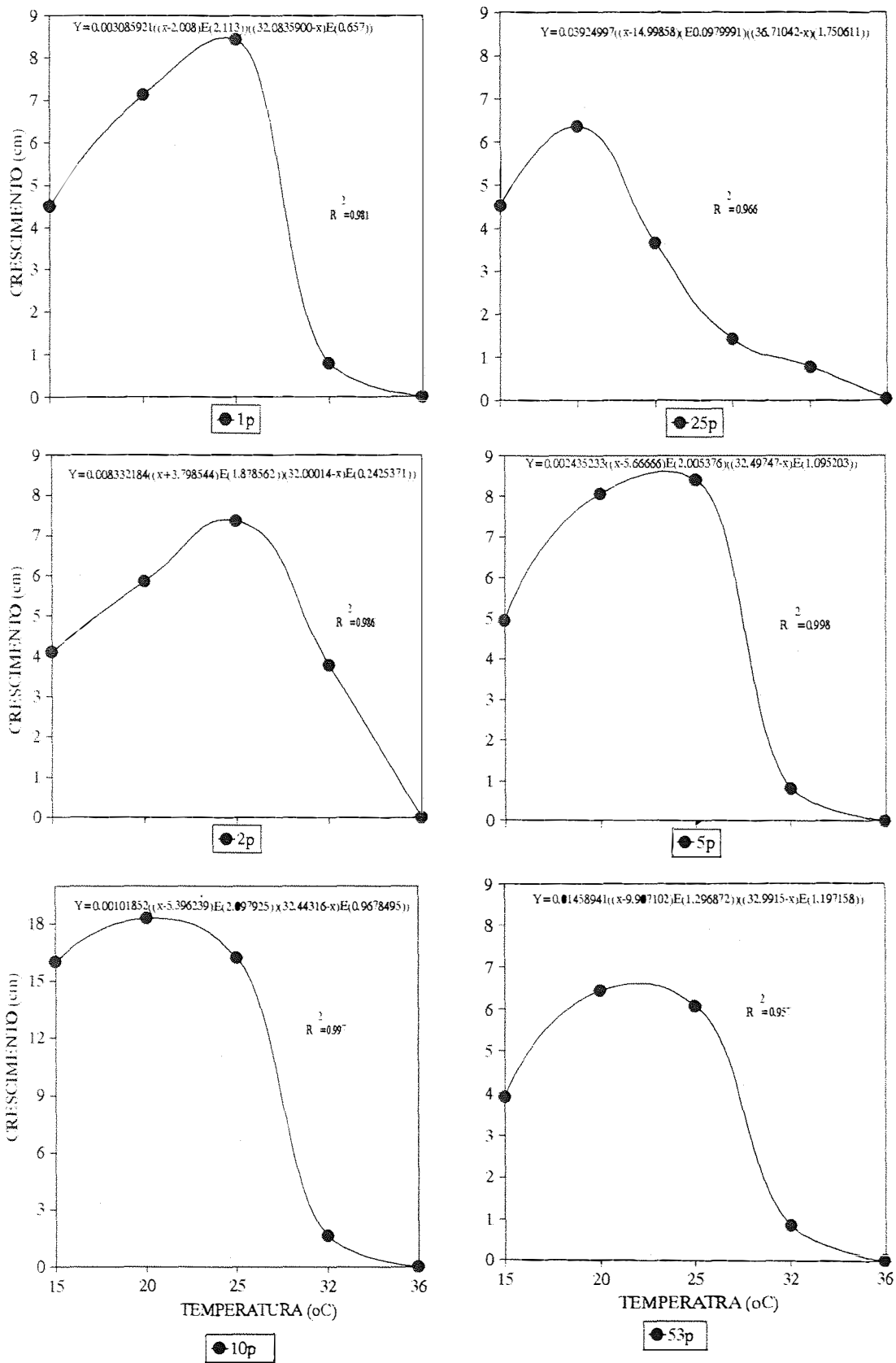


Figura 2. Crescimento dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre diferentes temperaturas, aos 10 dias de incubação.

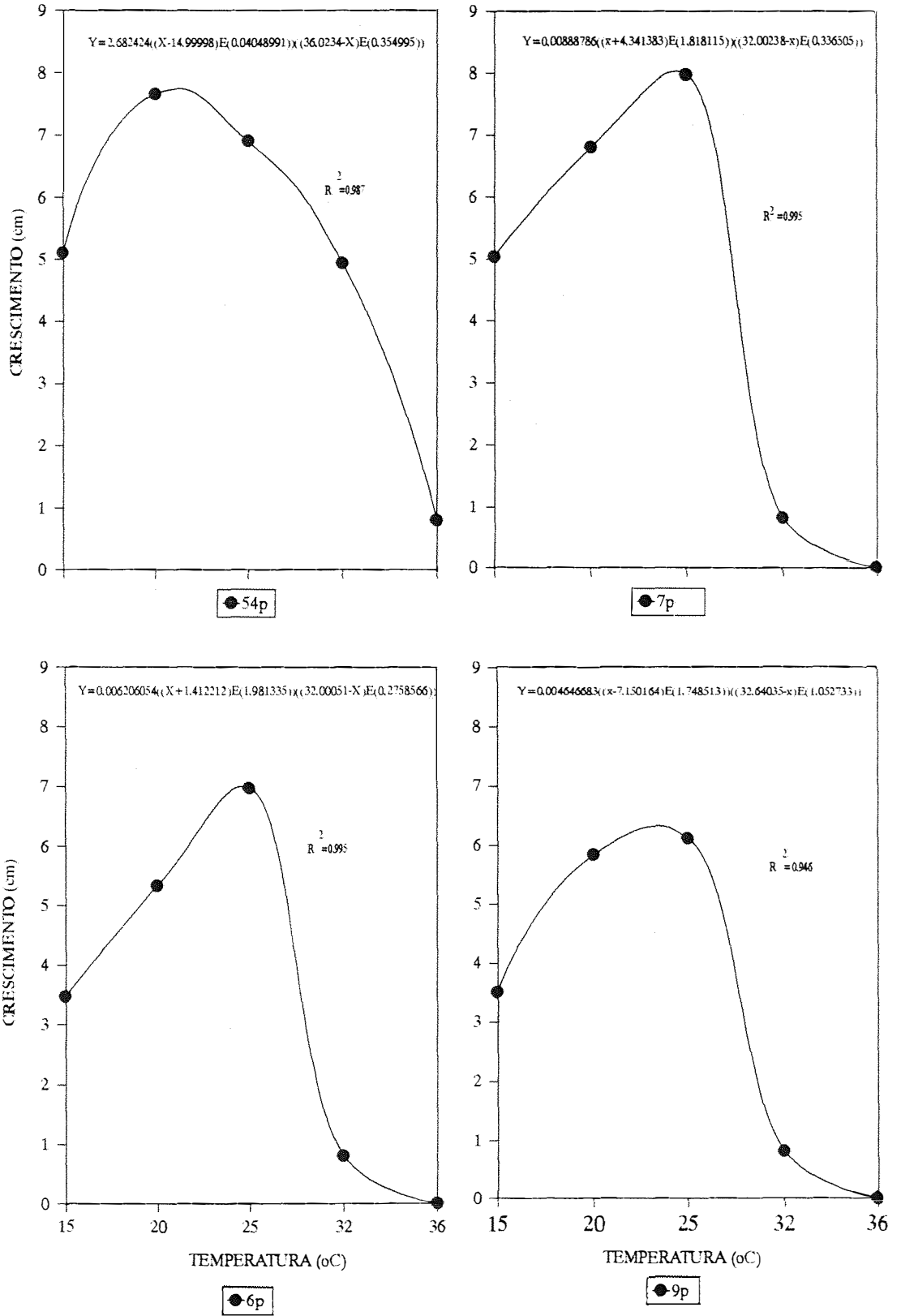


Figura 2. Crescimento dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre diferentes temperaturas, aos 10 dias de incubação.

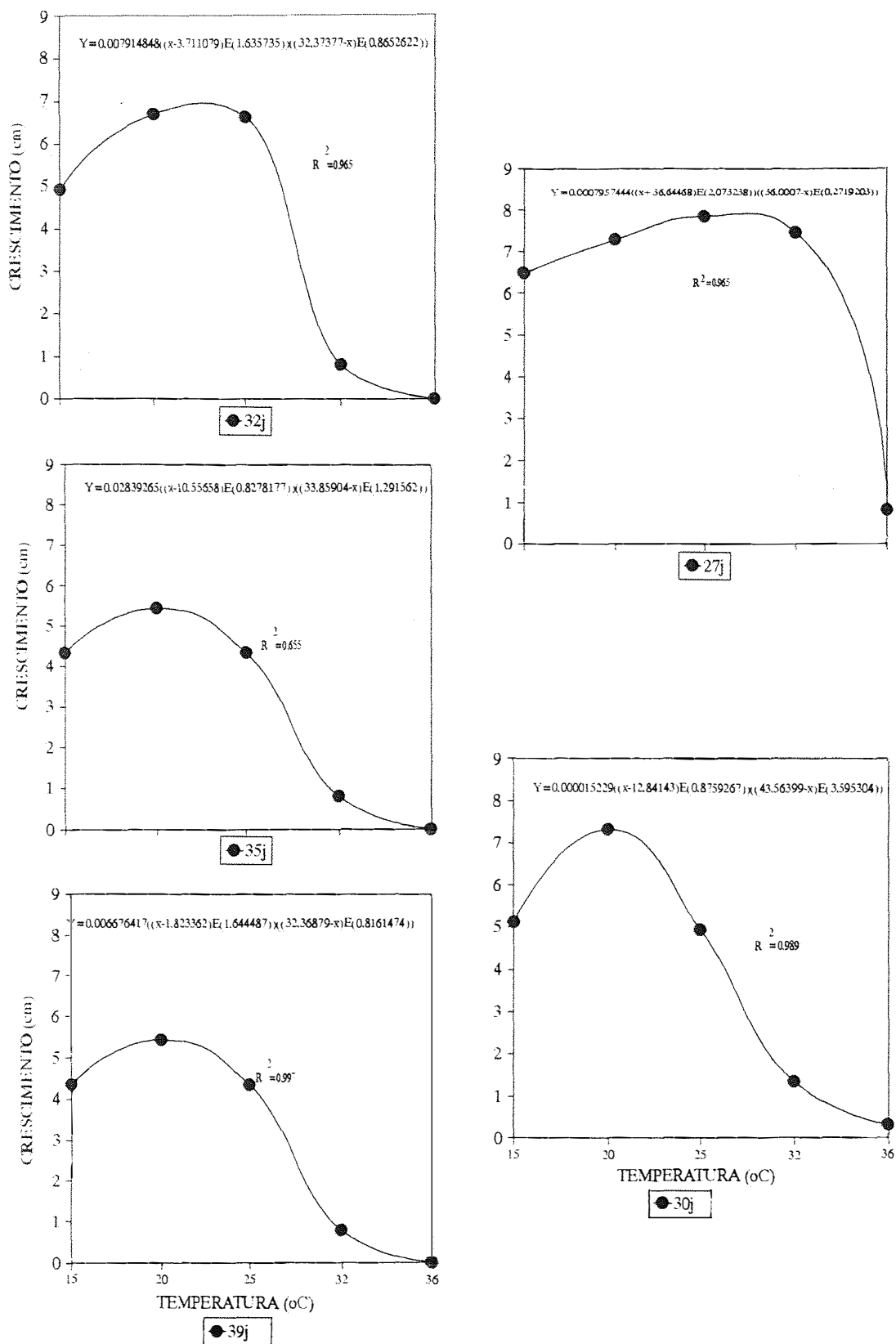


Figura 2. Crescimento dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre diferentes temperaturas, aos 10 dias de incubação.

A temperatura ótima de crescimento foi 24°C para os isolados 1p, 5p e 10p, 25°C para os isolados 7p e 9p, 26°C para o 6p e 2p, 22°C para o 25p e 53p e 18°C para o isolado 54p.

Para os isolados de jiló o crescimento máximo foi à temperatura de 28°C para o isolado 27j e 23°C para o isolado 39j, embora os isolados 30 j e 35 j o maior crescimento foi a 20°C.

Com todos os isolados não houve crescimento à 36°C, excluído o isolado 12p, que apesar de ter crescimento inferior aos outros em todas as temperaturas, mostrou aos 10 dias de incubação desenvolvimento micelial aos 36°C.

4.3. Características Conidiais e do Apressório dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

A amplitude, as médias dos comprimento e da largura dos conídios e a coloração da massa conidial estão expressas na Tabela 7.

Observa-se que os isolados 2p, 10p, 12p, 25p, 28j e 54p tiveram a média do comprimento dos conídios significativamente superior aos outros isolados, sendo seguidos pelos isolados 7p e 39j. Em outro extremo ficou o isolado 31j com a menor média, precedendo aos isolados 1p, 5p, 6p, 30j, 51p.

A amplitude do comprimento dos conídios dos isolados de pimentão ficou entre o valor mínimo de 7,82, no isolado 5p e a máxima de 21,85, no isolado 25p, enquanto que entre os isolados de jiló a mínima observada foi de 8,74 no isolado 31j e a máxima de 24,84 no isolado 28j.

Quanto às médias de largura dos conídios constatou-se valores superiores para os isolados 5p, 7p, 18p 1p, 10p e 25p, seguidos pelos 9p, 2p, 28j e 12p. A menor média observada foi no isolado 31j e na sequência colocaram os isolados 30j, 51p, 27j, 32j e 50p.

A observação da coloração da massa conidial, aos 10 dias de incubação, mostrou que os isolados de pimentão apresentaram coloração rósea à salmon em todos os casos, mas passando por nuances de creme a amarelo para o isolado 53p e 54p enquanto que os isolados do jiló caracterizaram-se por produzir massa conidial escura.

Não se observaram diferenças quanto a forma dos conídios entre os isolados.

Em relação às características dos apressórios, a Tabela 8 demonstra a forma e as médias do comprimento e largura dos mesmos para cada isolado.

Em todos os isolados de jiló, os apressórios apresentaram forma arredondada, sendo escuros e com parede mais grossa, enquanto que nos isolados de pimentão a forma dos apressórios foi variável de oval a lobada e coloração mais clara que as do jiló e com paredes finas.

TABELA 7 - Comprimento, largura e amplitude (μm) de conídios dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Isolado	Comprimento		Largura		Cor
	Amplitude	Média	Amplitude	Média	
1p	(8,74-15,64)	12,04 fg**	(2,76-5,75)	4,97 abc	salmon
2p	(14,03-18,86)	16,10 a	(4,14-5,29)	4,70 cdef	salmon
5p	(7,82-16,10)	12,33 f	(3,68-6,67)	5,14 a	salmon
6p	(9,89-15,64)	13,65 ef	(3,45-6,67)	4,50 efg	salmon
7p	(11,50-20,24)	14,83 bc	(4,14-7,36)	5,11 a	salmon
9p	(9,89-17,48)	14,47 c	(4,14-6,21)	4,80 bcd	salmon
10p	(11,27-20,24)	15,89 a	(4,37-6,44)	4,97 abc	salmon
12p	(12,42-19,09)	15,79 a	(4,14-5,29)	4,63 def	salmon
18p	(11,73-19,09)	14,52 c	(4,6-6,21)	5,03 ab	salmon
25p	(11,04-21,85)	15,63 ab	(3,91-6,44)	4,91 abc	salmon
27j	(11,73-14,95)	13,72 cde	(3,45-4,83)	4,06 hij	cinza
28j	(13,80-24,84)	16,01 a	(3,68-5,29)	4,70 cde	cinza
30j	(9,43-16,79)	12,57 f	(2,99-5,06)	4,03 ij	cinza
31j	(8,74-18,17)	11,49 g	(2,53-4,14)	3,74 j	cinza
32j	(11,27-19,78)	14,35 c	(3,22-5,06)	4,19 hi	cinza
35j	(11,27-17,48)	14,08 cd	(3,68-5,52)	4,33 gh	cinza
39j	(13,57-16,79)	14,85 bc	(3,91-5,06)	4,54 defg	cinza
50p	(11,73-18,17)	13,50 de	(3,68-4,6)	4,23 hi	salmon
51p	(9,89-15,41)	12,52 f	(3,22-4,37)	4,03 ij	salmon
53p	(11,50-18,86)	14,81 c	(3,91-5,06)	4,39 fgh	amarelo
54p	(13,8-19,78)	15,93 a	(3,91-5,06)	4,41 fgh	amarelo

** Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste Duncan.

TABELA 8 - Comprimento, largura (μm) e forma de apressórios dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

ISOLADO	COMPRIMENTO	LARGURA	FORMA
1p	6,93 bc**	6,25 b	ovalada
10p	6,65 bcd	4,70 de	ovalada
18p	6,38 cde	3,84 e	ovalada
25p	5,19 f	4,11 de	ovalada
27j	5,38 ef	4,91 cd	redonda
30j	5,72 def	5,02 cd	redonda
32j	5,56 def	4,58 de	redonda
35j	9,57 a	7,50 a	redonda
50p	7,68 b	6,47 ab	ovalada
51p	5,34 ef	4,77 de	ovalada
54p	9,18 a	5,83 bc	lobada
DMS(1%)	1,13	1,04	

** Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey

O isolado 35j apresentou o maior apressório, sobrepujando o 54p em comprimento e largura e aos demais, em ambos os parâmetros. Os isolados 25p, 51p, 27j, 32j e 51p mostraram o menor comprimento e os 18p, 25p, 32j, 10p e 51p a menor largura, sendo que os outros apresentaram médias intermediárias.

4.4. Teste de Patogenicidade

As médias dos diâmetros das lesões de antracnose que avaliaram a capacidade dos isolados de *C. gloeosporioides* em causar doença, em frutos de pimentão e jiló, foram comparadas pelo teste de Tukey, de acordo com a Tabela 9 e evidenciadas pela Figura 3.

Os isolados de pimentão causaram lesões de antracnose indistintamente nos frutos destacados de pimentão e jiló, apesar de que a média do diâmetro das lesões em jiló tenham sido inferiores à média do diâmetro das lesões em pimentão. Destacam-se os isolados 5p, 6p, 7p e 12p, que foram estatisticamente superiores tanto em frutos de pimentão e jiló e os isolados 1p, 2p, 25p, 51p, 53p e 54p, que foram mais agressivos em pimentão do que em jiló.

TABELA 9 - Diâmetro médio (cm) de lesões, em frutos destacados de pimentão e jiló, inoculados com diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

ISOLADO	PIMENTÃO	JILÓ	MÉDIA
1p	1,70 cde**	1,10 cd	1,40 cd
2p	1,37 cde	1,2 bcd	1,29cdef
5p	2,05 abcde	2,15 a	2,10 ab
6p	2,75 a	2,30 a	2,52 a
7p	2,25 abcd	1,80 abc	2,02 ab
9p	2,02 bcde	1,0 d	1,51 cd
10p	2,27 abcd	0,95 d	1,61 bc
12p	2,30 abc	1,82 ab	2,06 ab
25p	1,57 de	1,12 bcd	1,35 cde
27j	0,0 h	1,32 bcd	0,66 gh
28j	0,85 fg	1,17 bcd	1,01 defg
30j	0,55 gh	1,22 bcd	0,89 efgh
31j	0,0 h	1,22 bcd	0,61 gh
32j	0,55 gh	1,07 d	0,81 fgh
35j	0,67 fgh	1,10 cd	0,89 efgh
39j	0,0 h	0,95 d	0,47 h
50p	2,25 abcd	1,07 d	1,66 bc
51p	2,25 abcd	1,0 d	1,62 bc
53p	2,32 abc	1,07 d	1,70 bc
54p	2,42 ab	1,10 cd	1,76 bc
DMS(1%)	0,71	0,71	0,50

** Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

Por outro lado, o mesmo não foi constatado nos isolados de jiló. Por exemplo, os isolados 27j, 31j e 39j não desenvolveram lesões em frutos de pimentão, sendo no entanto patogênicos aos frutos de jiló. Já os isolados 28j, 30j, 32j e 35j, tiveram pequena capacidade patogênica em pimentão, estatisticamente inferior a todos os outros isolados testados naquele fruto, mas não sendo significativamente distintos dos isolados 27j, 31j e 39j, em frutos de jiló, com exceção do isolado 32j que foi superado por todos os isolados de jiló.

Os isolados 31j e 39j e 27j não tiveram patogenicidade para o pimentão e o 39j foi muito pouco patogênico ao jiló, enquanto que o 31j, junto com o 30j e 28j foram mais agressivos ao jiló.

4.5. Eficiência "in vitro" do fungicida benomyl

As médias do crescimento micelial dos isolados de *C. gloeosporioides*, em meio de cultura com doses crescentes de benomyl, foram comparadas pelo Teste Tukey e estão demonstradas nas Tabelas 10 e 11.

Aos cinco dias de incubação (Tabela 10), o crescimento da maioria dos isolados na presença de qualquer dose do fungicida foi inferior à testemunha, tendo os isolados se mostrado insensíveis às diversas concentrações do produto. A ressalva que deve ser feita é para os isolados 50p, 53p, e 54p que tiveram o crescimento totalmente inibido nas doses de 100 e 200 ppm, muito embora o isolado 53p tenha

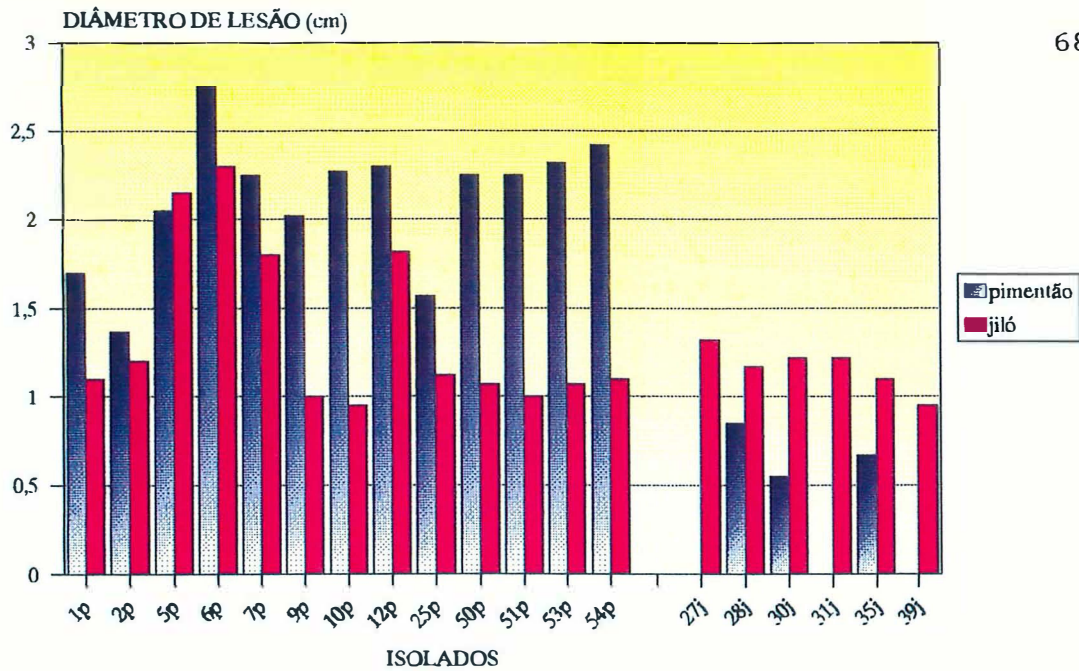


Figura 3. Diâmetro (cm) das lesões de antracnose, em frutos de pimentão e jiló, após inoculação com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

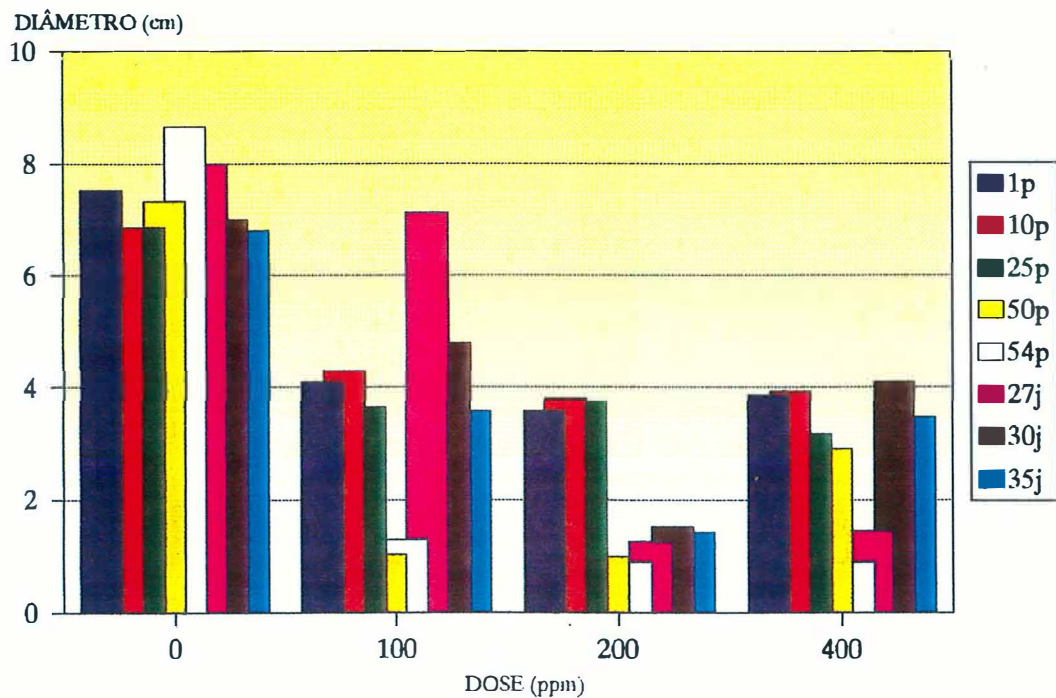


Figura 4. Efeito de doses crescentes de benomyl sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de pimentão e jiló, aos 10 dias de incubação.

TABELA 10 - Diâmetro médio (cm) das colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos sob diferentes doses de benomyl, aos 5 dias de incubação.

	ISOLADO		DOSE (ppm)	
	0	100	200	400
1p	5,50 ab**	2,66 ab	2,16 ab	2,60 a
5p	4,36 bcd	1,96 abcd	2,16 ab	1,96 ab
6p	4,43 bcd	2,30 abc	2,06 abc	2,03 ab
7p	4,46 bcd	2,56 abc	2,53 a	2,33 ab
9p	4,13 bcd	1,93 abcd	1,90 abcd	1,73 abc
10p	4,40 bcd	2,70 ab	2,26 ab	2,26 ab
18p	3,83 cd	2,23 abcd	2,36 a	2,13 ab
25p	4,40 bcd	2,30 abc	2,10 abc	1,90 ab
27j	3,56 de	2,80 a	1,06 de	1,93 ab
28j	2,76 ef	1,80 bcd	1,16 cde	2,50 ab
30j	2,46 f	1,63 cde	1,03 de	2,43 ab
35j	2,20 f	1,26 de	1,06 de	1,90 ab
50p	4,20 bcd	0,80 e	0,80 e	1,56 bc
53p	4,80 bc	0,80 e	1,33 bcde	2,10 ab
54p	5,83 a	0,80 e	0,80 e	0,80 c

DMS (1%) = 0,99

** Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

TABELA 11 - Diâmetro médio (cm) das colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos sob diferentes doses de benomyl, aos 10 dias de incubação.

ISOLADO	DOSE (ppm)			
	0	100	200	400
1p	7,53 ab**	4,10 bc	3,56a	3,86 a
5p	6,96 b	3,30 c	3,60 a	3,13 a
6p	7,30 b	3,83 bc	3,40 a	3,23 a
7p	7,40 ab	3,93 bc	3,83 a	3,70 a
9p	6,83 b	3,20 c	2,80 a	2,90 a
10p	6,86 b	4,30 bc	3,80 a	3,93 a
18p	6,96 b	3,60 bc	3,63 a	3,43 a
25p	6,86 b	3,63 bc	3,76 a	3,16 a
27j	8,00 ab	7,13 a	1,26 c	1,46 b
28j	6,93 b	4,86 b	1,83 bc	4,13 a
30j	7,03 b	4,80 b	1,53 bc	4,10 a
35j	6,80 b	3,56 bc	1,43 c	3,46 a
50p	7,33 ab	1,03 d	1,00 c	2,90 a
53p	7,83 ab	1,13 d	2,03 bc	3,70 a
54p	8,66 a	1,30 d	0,90 c	0,90 b

DMS (1%) = 1,34

** Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

se desenvolvido à 200 e 400 ppm e o 50p apresentasse um ligeiro aumento na última concentração testada.

Os isolados de jiló também se mostraram igualmente insensíveis ao fungicida, embora suas médias de crescimento tenham sido menores do que ao observado na dose zero.

A avaliação aos 10 dias de incubação (Tabela 11) reafirmou os resultados constatados aos 5 dias. O isolado 27j não teve seu crescimento afetado à 100 ppm, sendo estatisticamente semelhante à testemunha, mas na dose de 200 ppm o mesmo não ocorreu.

A concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ do fungicida não alterou o desenvolvimento micelial da maioria dos isolados do pimentão, sendo que só os isolados 50p e 54p se mostraram sensíveis. Os isolados de jiló tiveram o diâmetro das colônias bastante reduzidos à esta concentração, sendo estatisticamente inferiores aos outros isolados.

A Figura 4 destaca o efeito das doses do benomyl sobre o crescimento dos isolados.

Os isolados do jiló tiveram seu crescimento pouco afetado à 100 ppm, mas o mesmo não aconteceu à 200 ppm onde o diâmetro das colônias foi muito pequeno.

Os isolados de pimentão tiveram o diâmetro das colônias praticamente reduzidos à metade à 100 ppm, permanecendo inalterado à 200 ppm, apesar dos isolados 50p, 53 e 54p terem se mostrado mais sensíveis.

A análise das curvas de regressão polinomial quadrática, permitiu a determinação da ED_{50} para todos os isolados (Figura 5).

Os isolados de pimentão evidenciaram ED_{50} elevada, maior do que 150 ppm, tendo o isolado 18p alcançado o valor máximo de 400. Entretanto, os isolados 50p, 53p e 54p, os mais sensíveis, tiveram ED_{50} em valores de 68, 76,5 e 70, respectivamente.

Nos isolados de jiló a ED_{50} ficou próxima de 100 e portanto um pouco abaixo das determinadas para a maioria dos isolados de pimentão.

Os isolados 50p, 53p e 54p foram os que tiveram seu crescimento mais inibido à 200 ppm, embora todas as curvas tenham sido decrescentes em relação às doses e todos os isolados tenham sido capazes de se desenvolver à 400 ppm do fungicida, sendo este crescimento, em quase todos os casos, superior ao observado na dose de 200 ppm, como bem os demonstram as Figuras 4 e 5.

4.6. Eficiência "in vitro" dos fungicidas diniconazole, prochloraz, tebuconazole e triadimenol

4.6.1. Diniconazole

As médias do crescimento micelial (cm), dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos "in

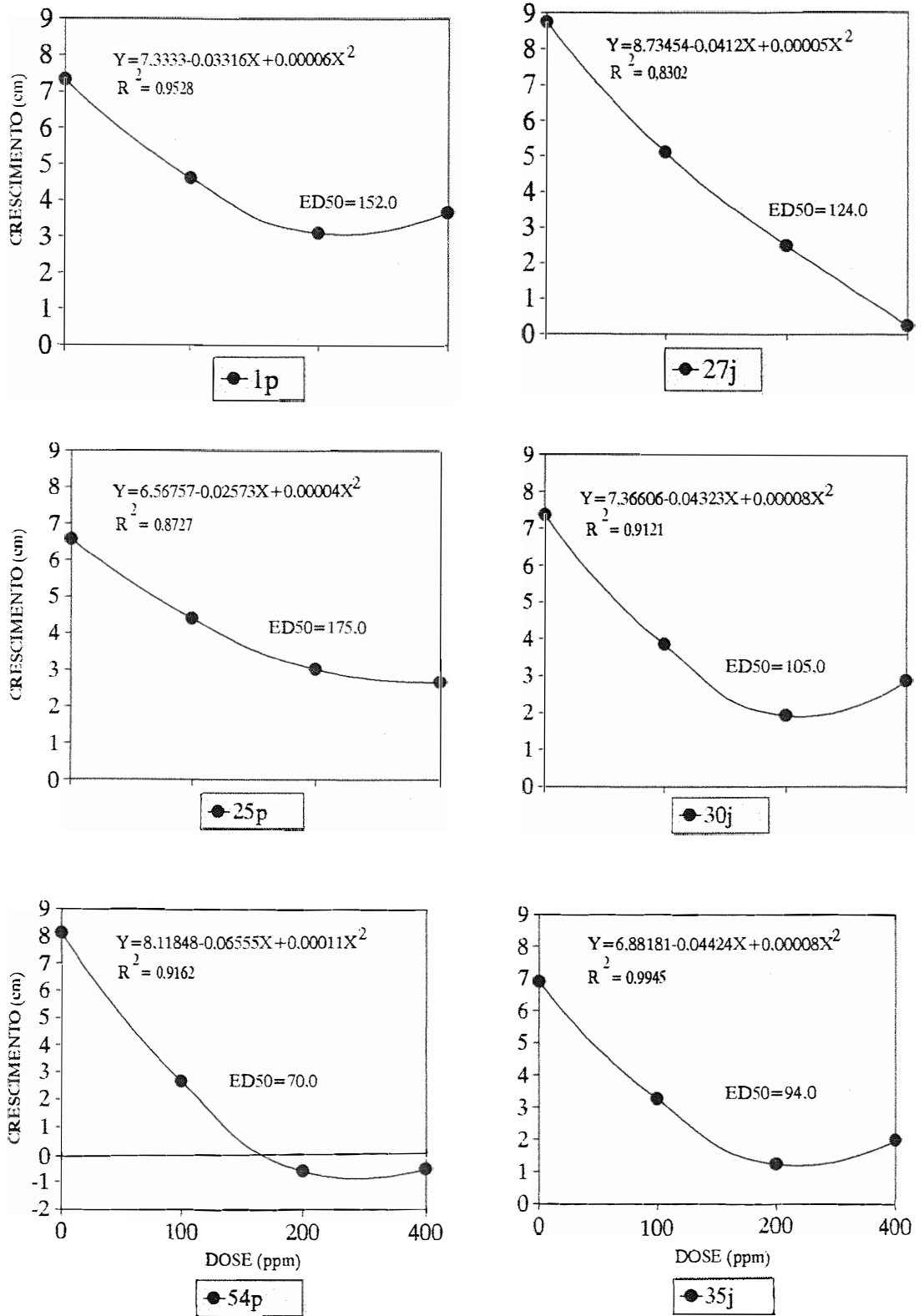


Figura 5. Crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio com doses crescentes de benomyl, aos 10 dias de incubação.

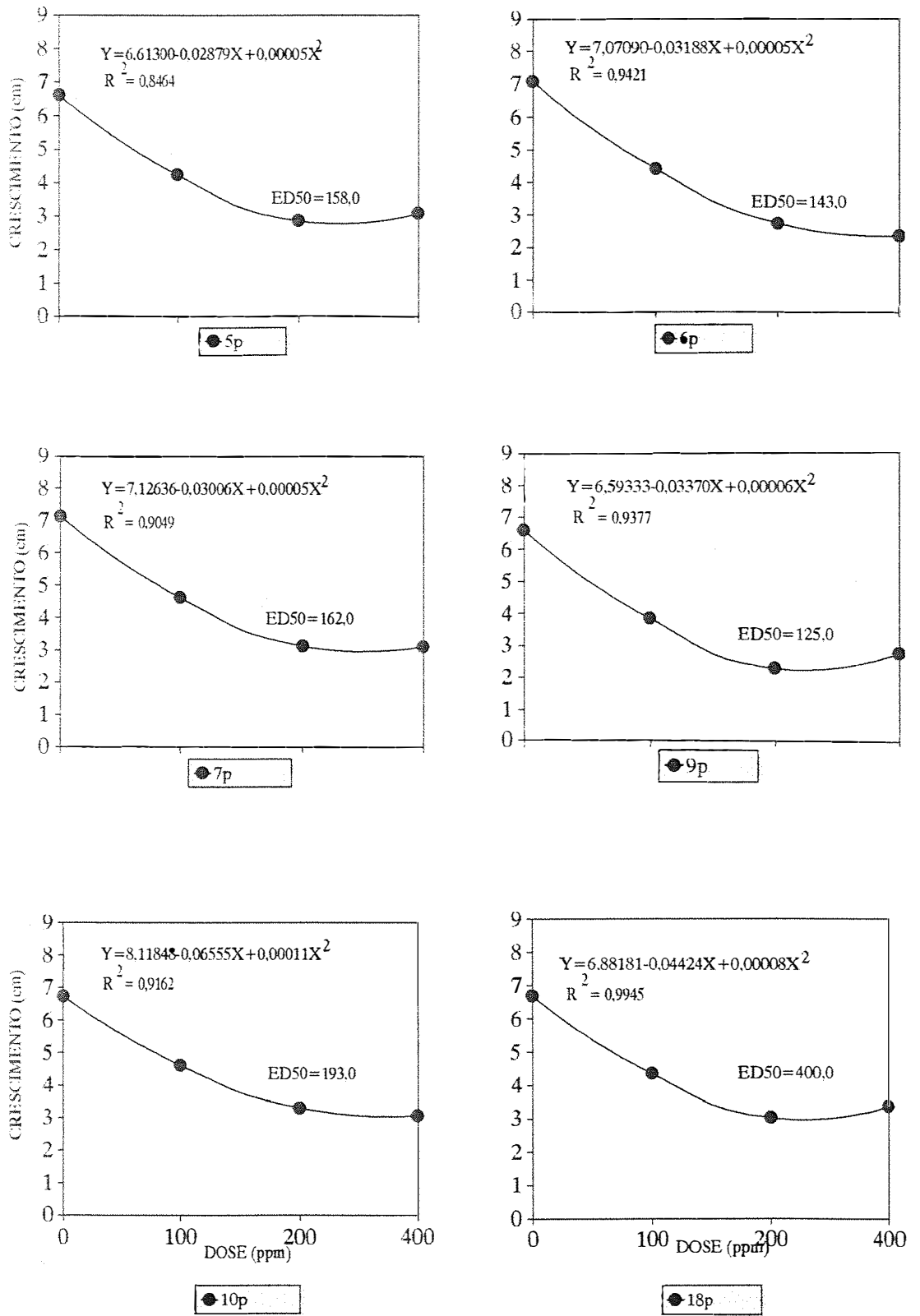


Figura 5. Crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio com doses crescentes de benomyl, aos 10 dias de incubação.

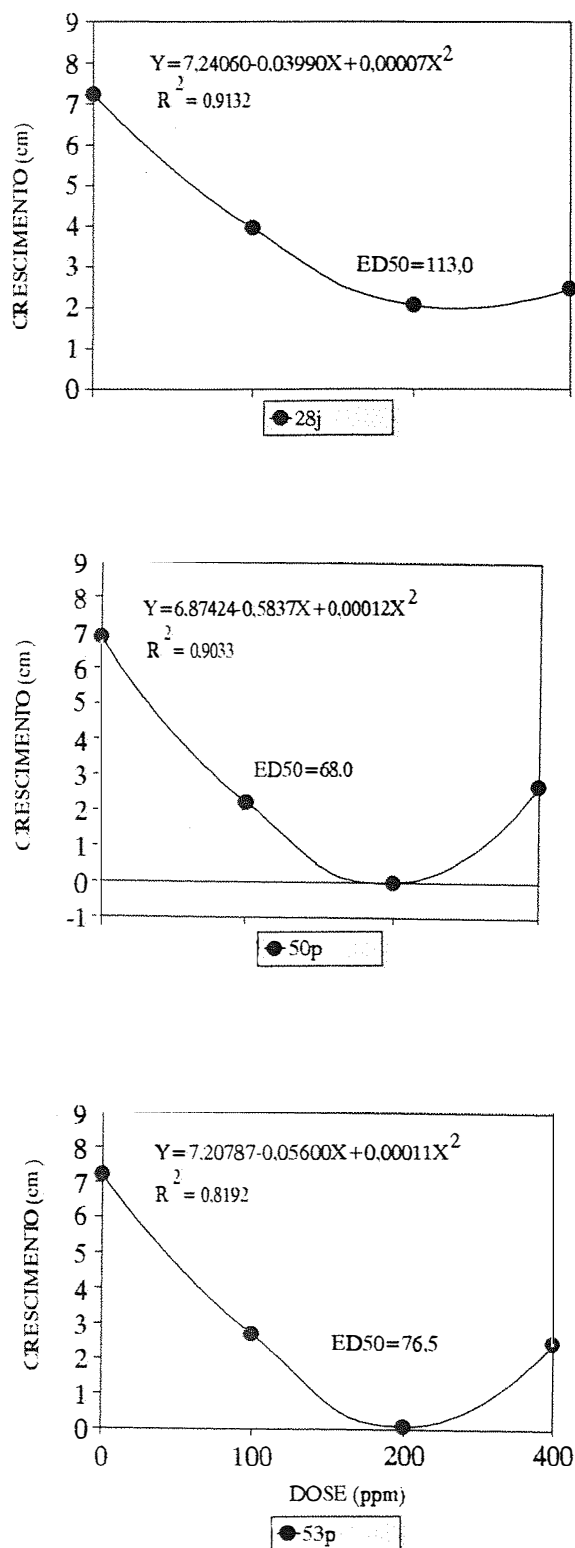


Figura 5. Crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio com doses crescentes de benomyl, aos 10 dias de incubação.

vitro" com as doses de 0,1, 10 e 100 ppm de diniconazole, estão demonstradas na Tabela 12.

Os isolados de pimentão 7p, 10p seguido pelo 54p foram os mais insensíveis a este fungicida nas doses 1 e 10 ppm, quando comparados aos outros isolados de pimentão e jiló.

A partir da adição de $1\mu\text{g/ml}$ de diniconazole o crescimento micelial foi muito inibido, destacando-se os isolados 2p, 27j, 36j e 32j e o 39j, que foram os mais sensíveis, não tolerando a presença do diniconazole.

As doses de 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ deste ingrediente ativo não foram diferenciadas para todos os isolados, à exceção do 7p, 10p e 54p, não sendo constatada diferenças significativas, embora a média do crescimento tenha sido muito baixa.

A ED_{50} para este fungicida foi determinada através de análise de regressão polinomial quadrática, para os isolados 7p, 10p, 51p, 53p e 54p, como mostra a Figura 6. Essa determinação só foi possível de ser feita para os isolados de pimentão, já que os do jiló a análise de regressão foi de coeficiente de determinação baixo.

Os isolados 51p e 53p, sensíveis, tiveram ED_{50} baixa, em torno de 5,0. Para os isolados 7p, 10p e 54p, que se mostraram insensíveis, a ED_{50} foi de 14,0, 56,0 e 18,5 ppm, respectivamente.

Os perfis das curvas foram decrescentes para todos os isolados, sendo semelhante entre o 51p e 53p e entre 7p, 54p e 10p, apesar de que para o último o crescimento micelial tenha se mantido constante até a dose de 10 ppm.

TABELA 12 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de diniconazole.

ISOLADO	DOSE (ppm)			
	0	1	10	100
1p	8,70 ab**	2,93 de	0,80 b	0,80 a
2p	8,83 a	0,80 f	0,80 b	0,80 a
7p	9,0 a	7,5 a	5,40 a	0,80 a
10p	7,33 d	6,86 ab	6,46 a	0,80 a
25p	8,53 abc	1,9 ef	0,80 b	0,80 a
27j	8,13 abcd	1,06 f	0,90 b	0,80 a
31j	8,33 abcd	2,83 de	1,0 b	0,93 a
32j	8,66 ab	0,80 f	0,80 b	0,86 a
35j	7,66 bcd	2,30 e	0,80 b	0,80 a
36j	8,16 abcd	0,80 f	0,80 b	0,80 a
39j	7,93 abcd	0,96 f	0,93 b	1,33 a
50p	8,19 abcd	2,66 de	1,10 b	0,90 a
51p	8,13 abcd	3,63 cd	1,06 b	0,80 a
53p	7,40 cd	4,43 c	0,80 b	0,80 a
54p	9,0 a	6,33 b	5,73 a	1,10 a
Média	8,26 A	3,05 B	1,89 C	0,87 D

DMS (1%) = 1,14

** Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e, por letras maiúsculas distintas nas linhas, diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

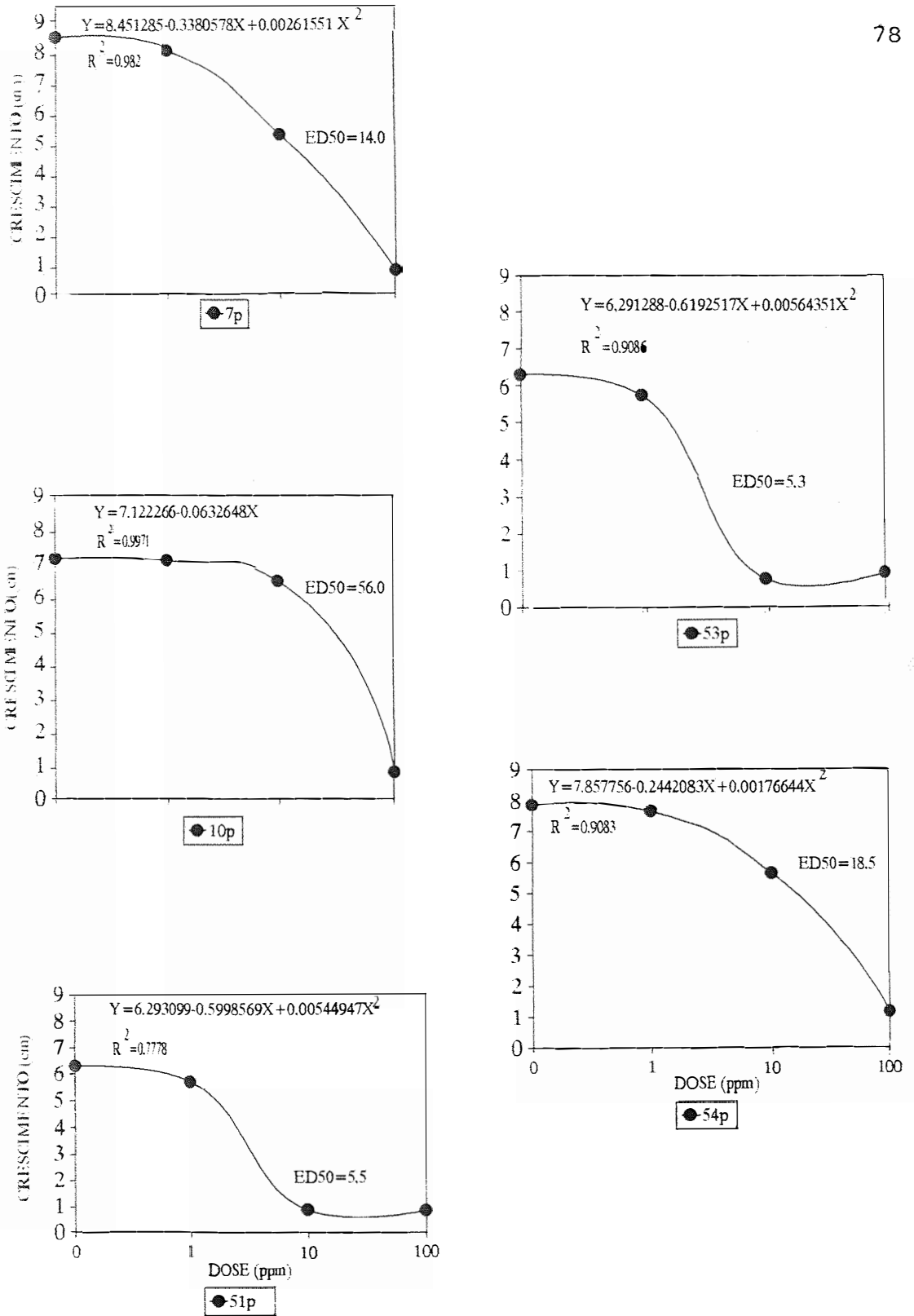


Figura 6. Efeito de doses crescentes do fungicida diniconazole sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.6.2. Prochloraz

As médias do crescimento micelial (cm) dos isolados de *C. gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro", com as doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de prochloraz, estão demonstradas na Tabela 13.

Para este fungicida, o isolado 27j mostrou-se o mais insensível, em todas as concentrações testadas, diferindo significativamente dos outros, sendo que à 100 $\mu\text{g/ml}$ o seu crescimento micelial foi reduzido à metade em relação às doses anteriores.

O isolado mais sensível a este fungicida foi o 35j que não cresceu à 1 $\mu\text{g/ml}$, enquanto outros como o 2p, 1p, 10p, 39j, 51p, 53p e 54p, igualmente sensíveis, tiveram pequeno desenvolvimento micelial.

Os isolados 32j, 36j, 50p e 25p, tiveram o seu crescimento reduzido mas não foram tão insensíveis como o 27j e nem tão sensíveis quanto aos outros.

A partir da dose de 10 ppm não houve crescimento dos isolados e quando isso ocorreu, o diâmetro médio das colônias não ultrapassou a 2,0 cm, excluindo-se o isolado 27j. Da mesma maneira, não houve crescimento micelial à concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$.

TABELA 13 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de prochloraz.

ISOLADO	DOSE (ppm)			
	0	1	10	100
1p	8,7 ab**	1,7 cde	0,80 b	0,80 a
2p	8,83 a	2,10 cde	1,16 b	0,80 a
7p	9,0 a	2,23 c	0,80 b	0,80 a
10p	7,33 d	1,96 cd	0,90 b	0,80 a
25p	8,53 abc	2,73 bc	0,80 b	0,80 a
27j	8,13 abcd	7,0 a	4,93 a	1,56 a
31j	8,33 abcd	2,16 cd	0,86 b	0,80 a
32j	8,66 ab	3,5 b	1,93 b	0,80 a
35j	7,66 bcd	0,96 e	0,96 b	0,80 a
36j	8,16 abcd	2,63 b	0,80 b	0,80 a
39j	7,93 abcd	1,63 cde	0,90 b	0,80 a
50p	8,19 abcd	2,7 bc	0,80 b	0,80 a
51p	8,13 abcd	1,33 de	0,80 b	0,80 a
53p	7,43 cd	1,73 cde	0,80 c	0,80 a
54p	9,0 a	1,63 cde	0,86 b	0,80 a
Médias	8,27 A	2,40 B	1,20 C	0,85 D

DMS (1%) = 1,14

** Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e, por letras maiúsculas distintas nas linhas, diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

A determinação da ED₅₀ só foi possível de ser feita para o isolado 27j e seu valor foi de 14 ppm (Figura 7). Para os outros isolados, a curva de regressão polinomial, apesar de significativa, foi de coeficiente de determinação baixo.

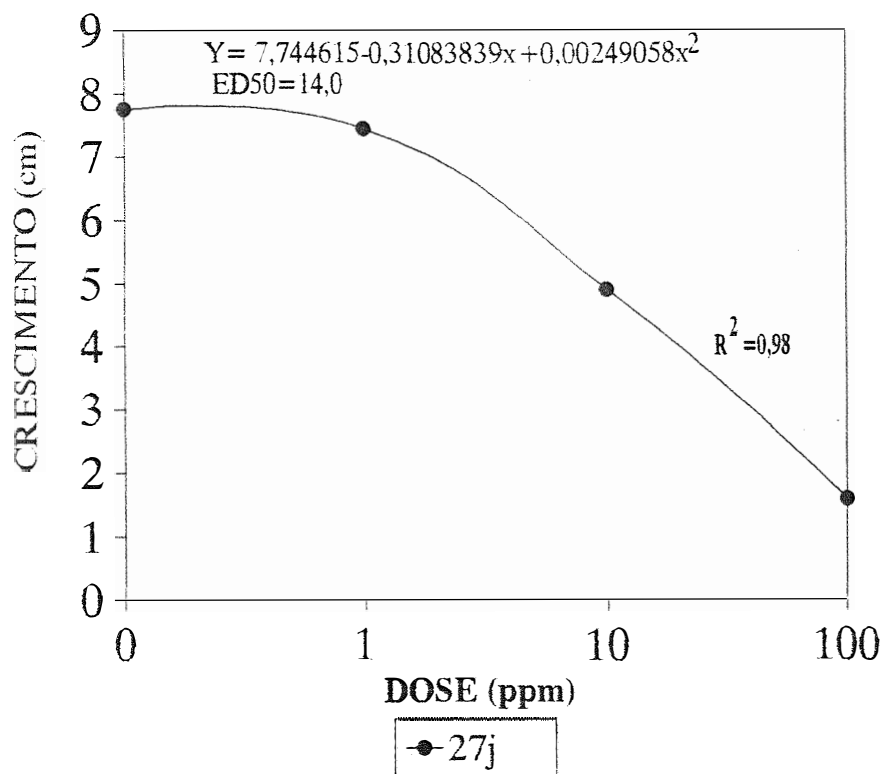


Figura 7. Efeito de doses crescentes do fungicida prochloraz sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.6.3. Tebuconazole

As médias do crescimento micelial (cm) dos isolados de *C. gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro", com as doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de tebuconazole estão demonstrados na Tabela 14.

Observa-se que os isolados 7p, 10p, 31j e o 54p foram os únicos isolados que se desenvolveram à concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ deste fungicida. Os outros isolados não se desenvolveram ou mostraram crescimento incipiente.

Os isolados 7p, 10p, 54p, 53p e 36j conseguiram se desenvolver ainda à 10 $\mu\text{g/ml}$, mostrando-se altamente insensíveis. Dentre esses os isolados 36j e 53p foram os que tiveram menor crescimento.

A dose de 100 ppm de tebuconazole inibiu o desenvolvimento de todos os isolados.

A relação quadrática foi estatisticamente significativa e aquelas de coeficiente de determinação maior do que 0,8, estão demonstradas na Figura 8.

A dose de eficiência (ED_{50}) para o isolado 7p foi de 14,7 ppm, 5,0 ppm para o isolado 31j e 11,0 ppm para os isolados 10p e 54p.

O perfil das curvas dos isolados de pimentão teve um traçado semelhante sendo diferente do jiló, que mostrou ter maior sensibilidade ao fungicida.

TABELA 14 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de tebuconazole.

ISOLADO	DOSE (ppm)			
	0	1	10	100
1p	8,70 ab**	0,96 c	0,80 d	0,80 a
2p	8,83 a	0,80 c	0,80 d	0,80 a
7p	9,0 a	6,76 ab	5,33 a	0,80 a
10p	7,33 d	1,96 a	4,03 b	0,80 a
25p	8,53 abc	0,80 c	0,80 d	0,80 a
27j	8,13 abcd	0,93 c	0,80 d	1,0 a
31j	8,33 abcd	7,06 a	0,80 d	0,80 a
32j	8,66 ab	0,80 c	0,80 d	0,80 a
35j	7,66 bcd	0,80 c	0,80 d	0,80 a
36j	8,16 abcd	0,80 c	1,33 cd	0,80 a
39j	7,93 abcd	0,93 c	0,93 d	0,80 a
50p	8,19 abcd	0,83 c	0,80 d	0,80 a
51p	8,13 abcd	1,03 de	0,92 d	0,80 a
53p	7,40 cd	0,80 c	2,23 c	0,80 a
54p	9,0 a	1,63 b	4,50 ab	0,80 a
Média	8,26 A	2,43 B	1,71 C	0,81 D

DMS (1%) = 1,14

** Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e, por letras maiúsculas distintas nas linhas, diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

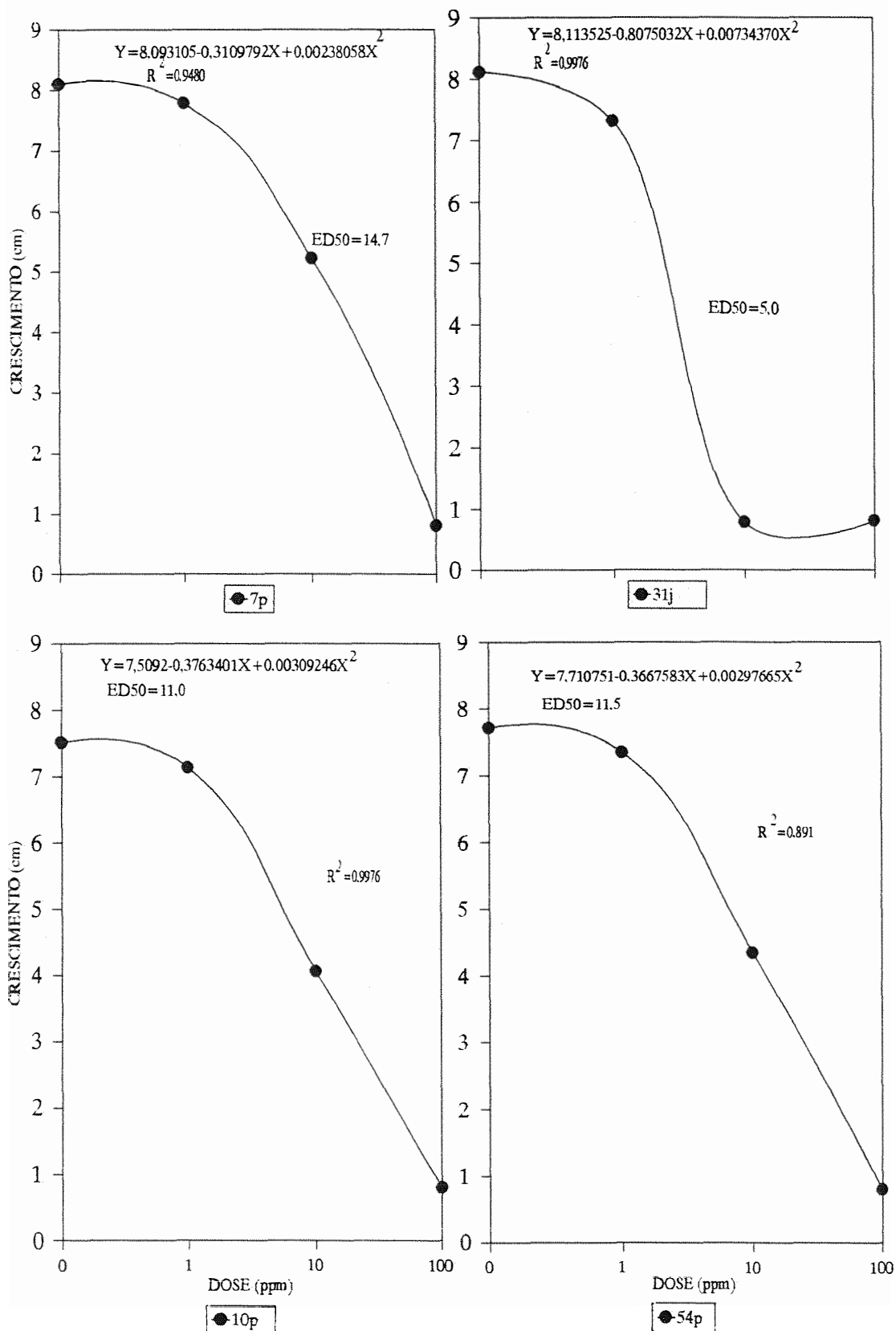


Figura 8. Efeito de doses crescentes do fungicida tebuconazole sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.6.4. Triadimenol

As médias do crescimento micelial (cm) em relação à testemunha dos isolados de *C. gloeosporioides* desenvolvidos "in vitro", com as doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de triadimenol estão demonstrados na Tabela 15.

Para este fungicida todos os isolados cresceram até a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, à exceção dos isolados 36j e 54p.

À 100 ppm apenas os isolados 27j, 31j, 39j e 54p mostraram algum desenvolvimento, tendo sido os demais isolados inibidos.

O isolado 27j foi o mais insensível ao triadimenol, em qualquer dose testada, enquanto que o 10p foi o mais sensível mostrando esta característica mesmo à 1 ppm.

O isolado 32j teve seu crescimento reduzido à metade a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, permanecendo estável à 10 ppm mas sendo totalmente inibido à 100 ppm.

A ED_{50} estabelecida pela relação quadrática ficou em 16,0 ppm para o isolado 27j, 11,0 ppm para o 32j, 7,5 ppm para o 50p e 6,0 ppm para o isolado 51p (Figura 9).

A inibição do crescimento de três isolados de *C. gloeosporioides* (27j, 1p e 54p) em meio de cultura sem fungicida e com 100 ppm de benomyl, prochloraz, triadimenol, tebuconazole e diniconazole está comparada na Figura 10.

TABELA 15 - Crescimento micelial (cm) dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro", nas doses de 0, 1, 10 e 100 ppm de triadimenol.

ISOLADO	DOSE (ppm)			
	0	1	10	100
1p	8,7 ab**	2,66 defgh	1,46 bc	0,80 b
2p	8,83 a	2,43 defgh	1,93 bc	0,80 b
7p	9,0 a	2,86 cdef	1,46 bc	0,80 b
10p	7,33 d	1,13 i	0,80 c	0,80 b
25p	8,53 abc	2,63 defgh	1,30 c	0,80 b
27j	8,13 abcd	6,56 a	5,10 a	2,03 a
31j	8,33 abcd	3,16 cde	1,46 bc	1,26 ab
32j	8,66 ab	4,83 b	4,03 a	0,80 b
35j	7,66 bcd	1,56 hi	1,43 bc	0,80 b
36j	8,16 abcd	2,80 cdefg	1,06 c	0,80 b
39j	7,93 abcd	1,70 ghi	1,73 bc	1,36 ab
50p	8,19 abcd	3,86 bc	2,46 b	0,80 b
51p	8,13 abcd	3,50 cd	1,46 bc	0,80 b
53p	7,4 cd	2,10 efghi	1,40 bc	0,80 b
54p	9,0 a	1,86 fghi	1,0 c	1,13 ab
Média	8,26 A	2,91 B	1,87 C	0,97 D

DMS (1%) = 1,14

** Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e, por letras maiúsculas distintas nas linhas, diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

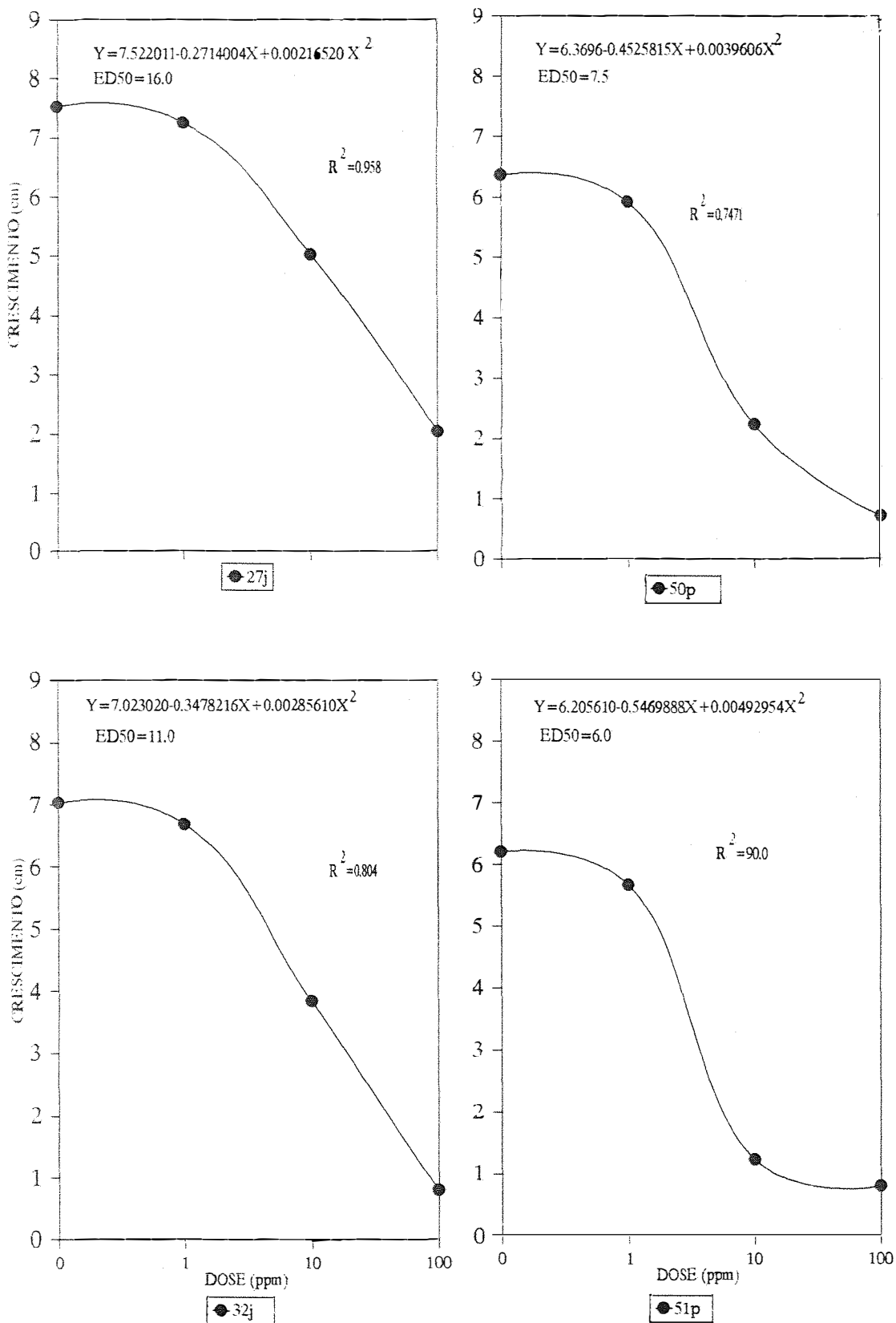


Figura 9. Efeito de doses crescentes do fungicida triadimenol sobre o crescimento (cm) micelial de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.7. Eficiência "in vitro" dos fungicidas imebenconazole, iminoctadine, pyremetanil, carbendazin, tricyclazole, fluquinconazole, flutalonil, fludioxonil, cyprodinil e fenbuconazole

As médias do crescimento micelial (%) em relação à testemunha, dos isolados de *C. gloeosporioides* desenvolvidas em meio de cultura com 100 ppm dos fungicidas flutolanil (Flt), fludioxonil (Fld), fluquinconazole (Flq), iminoctadine (Imm), imebenconazole (Imb), fenbuconazole (Fnb), cyprodinil (cyp), carbendazin (Carb), tricyclazole (Tric.) e pyremetanil (Pyr), estão demonstradas na Tabela 16.

O fungicida flutolanil reduziu à metade o crescimento dos isolados 1p, 7p, 18p e perto de 60% em relação aos outros isolados, excluindo-se o 6p que apresentou menor desenvolvimento, sendo o mais inibido pelo produto, vindo a seguir o isolado 2p.

O fungicida fludioxonil foi mais eficiente para os isolados 2p, 25p, 51p, 50p, 53p, 28j e 6j e 39j, seguindo-se em menor proporção os isolados 18p, 32j, 35j, 36j e 54p. Os isolados 1p e 27j foram mais insensíveis.

TABELA 16 - Crescimento (%) em relação à testemunha dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro" com 100 ppm dos fungicidas: fludioxonil (Flt.), fludioxonil (Fld), fluquinconazole (Flq), iminoctadine (Imm), imebencunazole (Imb), fenbuzonazole (Fnb), cyprodinil (Cyp), carbendazin (carb.), tricyclazole (Tric) e pyrethanil (Pyr)*.

ISOLADO	FUNGICIDAS									
	Flt.	Fld.	Flq.	Imm.	Imb.	Fnb.	Cyp.	Carb.	Tric.	Pyr.
1p	57,0a**	42,2a	19,2cd	36,7a	27,6ab	20,0cde	15,2b	24,1bcd	37,5a	23,8abcde
2p	28,1d	21,1f	27,8bc	13,5e	22,8ab	23,9bcde	13,3b	13,3ef	14,1e	14,9e
6p	13,3e	28,5def	13,3d	27,6bcd	23,6ab	24,3bcde	13,3b	30,1ab	23,5cd	21,6abcde
7p	53,0ab	40,6ab	18,5d	35,8ab	31,4a	30,1ab	14,7b	33,6a	20,2de	24,1abcd
18p	46,3bc	35,2abcd	13,7d	30,2abc	21,6b	24,1bcde	13,2b	27,2abcd	22,8cde	20,7abcde
25p	43,0c	20,6f	12,7d	29,4abcd	24,0ab	26,4bcde	12,7b	23,2bcd	29,4abc	16,5de
27j	41,6c	41,8a	45,0a	14,3e	31,6a	35,7a	12,2b	21,8bcde	32,7ab	28,2ab
28j	43,9bc	26,3def	33,2b	30,6abc	26,6ab	18,7e	29,0a	23,9bcd	17,6de	21,6abcde
32j	41,9c	31,0cde	31,9b	31,4abc	25,1ab	28,9abcd	27,1a	27,5abc	22,7cde	22,4abcde
35j	40,7c	32,4bcde	32,5b	28,2abcd	20,6b	29,0abc	28,1a	26,8abcd	19,9de	18,0cde
36j	42,6c	31,2cde	32,8b	24,7cd	23,7ab	25,3bcde	33,5a	22,5bcd	25,1bcd	27,1ab
39j	38,8c	28,6def	30,2b	20,6de	21,5b	21,6bcde	30,7a	20,7cdef	16,2de	24,9abcd
50p	43,8c	26,4def	34,5b	23,7cd	24,8ab	20,9cde	33,6a	19,8cdef	21,8cde	26,2abc
51p	44,3bc	23,5ef	34,9b	32,0abc	24,3ab	22,5bcde	32,1a	24,2bcd	22,0cde	25,6abc
53p	41,2c	27,4def	32,58b	28,2abcd	22,0b	18,2e	28,2a	25,3abcd	18,9de	20,5abcde
54p	40,4c	38,0abc	33,9b	26,5cd	25,8ab	19,9de	31,7a	12,4f	24,1bcd	28,7a
Mé- dia	41,39A	30,31B	28,33BC	27,34C	24,74D	24,08D	23,39DE	23,24E	22,85DE	22,63E

DMS(18) = 9,09

* dados transformados para Arco Seno $\sqrt{x/103}$

** Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o Teste Tukey.

A maior parte dos isolados do pimentão tiveram mais sensibilidade ao fluquinconazole do que os isolados do jiló, apesar dos isolados 50p, 51p, 53p e 54p não terem sido estatisticamente diferentes dos isolados 28j, 32j, 35j 36j e 39j.

Os isolados 2p e 27j mostraram-se sensíveis ao iminoctadine, sendo estatisticamente distintos dos outros. Em contrapartida, os isolado 1p apresentou o maior crescimento micelial, seguido de 7p, 51p, 32j, 28j e 18p O restante dos isolado se posicionaram intermediários entre os mais sensíveis e os mais insensíveis.

Embora o teste de Tukey tenha detectado diferenças significativas entre a média dos isolados no fungicida imebenconazole, observa-se que estas diferenças, em termos de porcentagem, foram sido pequenas, ficando o crescimento ficou compreendido na faixa entre 20-30%, indicando bom efeito inibidor deste fungicida, ligeiramente superior, em média, aos já comentados.

Para o fenbuconazole se destacou-se como maior média de crescimento os isolados 27j, 7p, 35j e 32j; o menor crescimento foi constatado para os isolados 28j e 53p seguido do 54p. De maneira geral, este fungicida teve um efeito inibidor à mesma proporção que o imebenconazole, sendo inclusive constatado semelhanças de comportamento dos isolados em relação aos dois fungicidas.

O cyprodinil mostrou ser mais eficiente para os isolados 1p, 2p, 6p, 7p, 18p, 25p e 27j; os isolados 28j, 32j, 35j, 36j, 39j foram os menos sensíveis, mesmo com o crescimento micelial reduzido para mais ou menos 30%.

Situando-se na mesma proporção de inibição do crescimento micelial, à semelhança do cyprodinil, ficaram os fungicidas carbendazin e tricyclazole. Os três fungicidas inibiram expressivamente o crescimento dos isolados ficando em todos os casos abaixo de 30%, mas se destacando o isolados 2p, o mais sensível. Para o carbendazin tem-se o isolado 54p, o de menor crescimento e o 7p, o de maior.

O tricyclazole atuou menos eficientemente sobre os isolados 1p e 27j e mais eficazmente sobre o 2p, seguido por 39j, 53p, 35j e 7p.

A comparação das médias dos fungicidas pelo teste Tukey (Tabela 16) mostrou que o pyremetanil foi o mais eficiente na inibição do crescimento dos isolados, muito embora as diferenças com os três últimos fungicidas que o precederam terem sido pequenas. Novamente o isolado 2p superou aos outros em termos de sensibilidade, seguido pelo 25p e 35j. O isolado 27j e 54p foi o mais insensível, seguido de 36j e 27j.

Na Figura 11 ficam evidenciadas as diferenças entre alguns isolados dentro dos fungicidas testados, assim como a eficiência relativa dos mesmos.

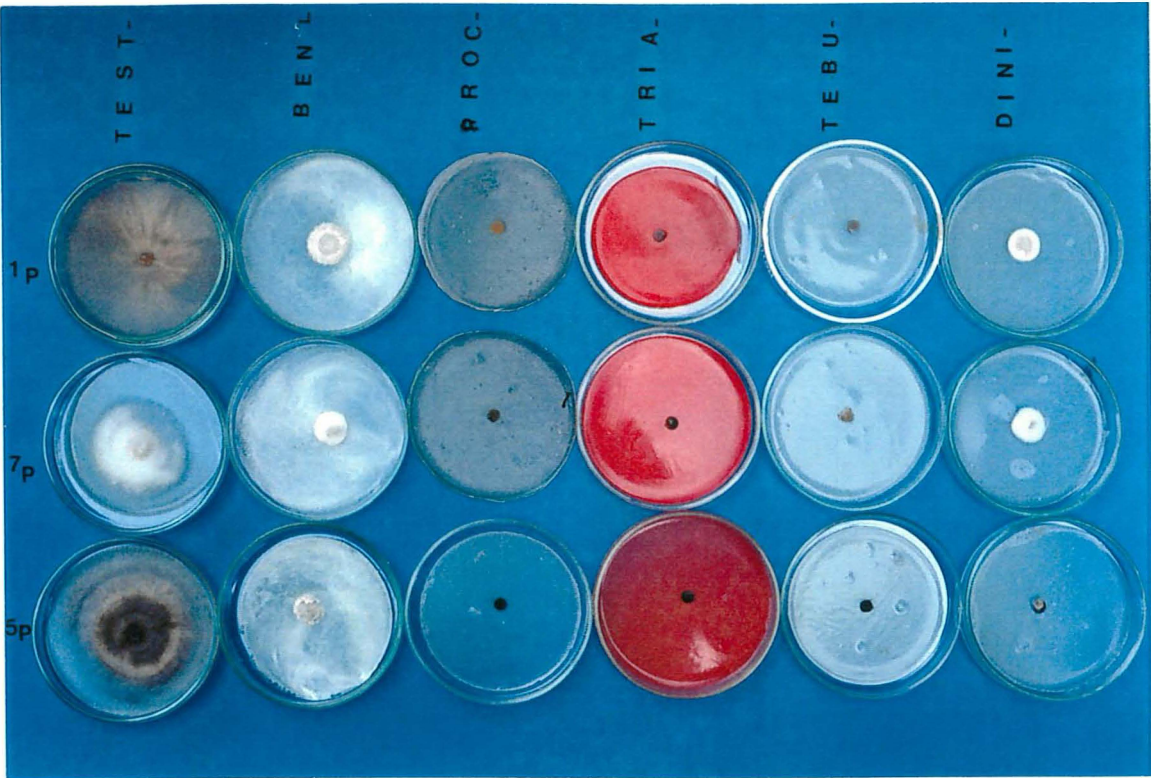


Figura 10. Crescimento micelial dos isolados 1p, 7p, 5p observados "in vitro" nos tratamentos : testemunha, benomyl, prochloraz, triadimenol, tebuconazole e diniconazole.

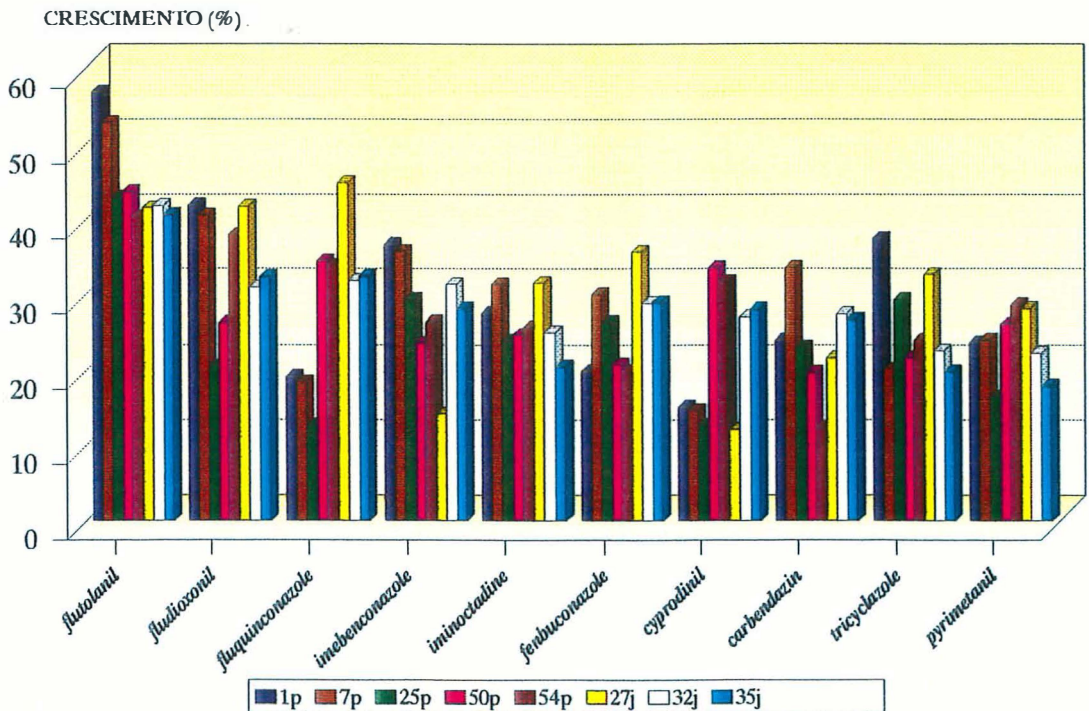


Figura 11. Crescimento (%) micelial de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio com: flutolanil, fludioxonil, fluquinconazole, cyprodinil, carbendazin, tricyclazole, pyrimetanil, imbenconazole e iminoctadine, à 100 ppm.

O fungicida flutolonil e fludioxonil foram os que menos interferiram no crescimento dos isolados, sendo que o primeiro foi o mais ineficiente na inibição do crescimento quando comparado com os outros fungicidas.

O comportamento do isolado 27j se manteve estável frente aos fungicidas sendo porém afetado pelo imebenconazole e cyprodinil. Este último fungicida também afetou o crescimento do isolado 25p.

Os outros isolados de jiló, o 32 e 35, mantiveram seu crescimento à mesma proporção entre os fungicidas, com pequenas variações, mas com diminuição do desenvolvimento frente aos fungicidas tricyclazole e pyremetanil.

4.8. Eficiência do tratamento preventivo e curativo de 4 fungicidas sistêmicos no controle da antracnose na cultura do pimentão

O efeito do tratamento preventivo e curativo dos fungicidas benomyl, diniconazole, tebuconazole e triadimenol, sobre a incidência de lesões de antracnose na cultura do pimentão está demonstrado na Tabela 17.

Os tratamentos preventivo e curativo com benomyl e preventivo com diniconazole não diminuíram a incidência das lesões, tendo sido estatisticamente iguais à testemunha.

TABELA 17 - Média das incidências de lesões e das notas atribuídas aos frutos de pimentão tratados com os fungicidas benomyl, diniconazole, tebuconazole e triadimenol¹.

TRATAMENTO	INCIDÊNCIA	NOTA
Testemunha	70.9 a*	1,34 a**
Preventivo benomyl	70,9 a	1,85 a
Preventivo diniconazole	79,4 a	1,32 bc
Preventivo tebuconazole	56,5 ab	1,43 b
Preventivo triadimenol	34,5 bc	1,19 bc
Curativo benomyl	74,2 a	1,41 b
Curativo diniconazole	62,3 ab	1,34 b
Curativo tebuconazole	14,1 c	0,93 c
Curativo triadimenol	53,6 ab	1,48 ab
DMS(1%)	0,43	

¹ Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$

* Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

**Média seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si ao nível de 1% de significância, pelo teste de Tukey.

O triadimenol foi o que apresentou o melhor efeito entre os tratamentos preventivo, sendo seguido pelo tebuconazole. Já não se observou para o triadimenol efeito curativo, tendo sido a média desse tratamento semelhante estatisticamente à testemunha.

A melhor resposta observada foi quando se fez o tratamento curativo com tebuconazole, o qual baixou expressivamente a incidência. Entretanto, apesar desta resposta desejável, foi observado efeito fitotóxico sobre a cultura, caracterizado por descoloração e necrose foliar, encarguilhamento dos brotos foliares e redução do porte das plantas tratadas com este fungicida (Figura 12).



FIGURA 12: Sintomas de fitotoxidez de tebuconazole em plantas de pimentão var. Agrônômico G 10.

As respostas ao tratamento curativo com diniconazole e triadimenol não diferiram estatisticamente entre si, embora em números absolutos o triadimenol apresentasse a menor média.

Um outro parâmetro adotado na avaliação foi notas (Tabela 17), atribuídas aos frutos com lesão por tratamento e que foi baseada em uma escala visual criada de acordo com o número e tamanho de lesões e aspecto dos frutos.

A avaliação através de notas também destacou o efeito curativo do fungicida tebuconazole no controle da antracnose, sendo esse tratamento o de menor média observada. O tratamento curativo com o triadimenol apresentou pouco resultado se equiparando à testemunha. Os demais tratamentos não diferiram entre si e foram distintos da testemunha.

A Figura 13 representa o efeito dos tratamentos preventivo e curativo dos fungicidas benomyl, diniconazole, tebuconazole e triadimenol, avaliado pelos parâmetros incidência (%) e nota.

4.9. Caracterização serológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

A distinção sorológica entre os isolados de pimentão e jiló foi possível de ser concretizada pelo método de ELISA -Indireto ("Enzyme linked immunosorbent assay"),

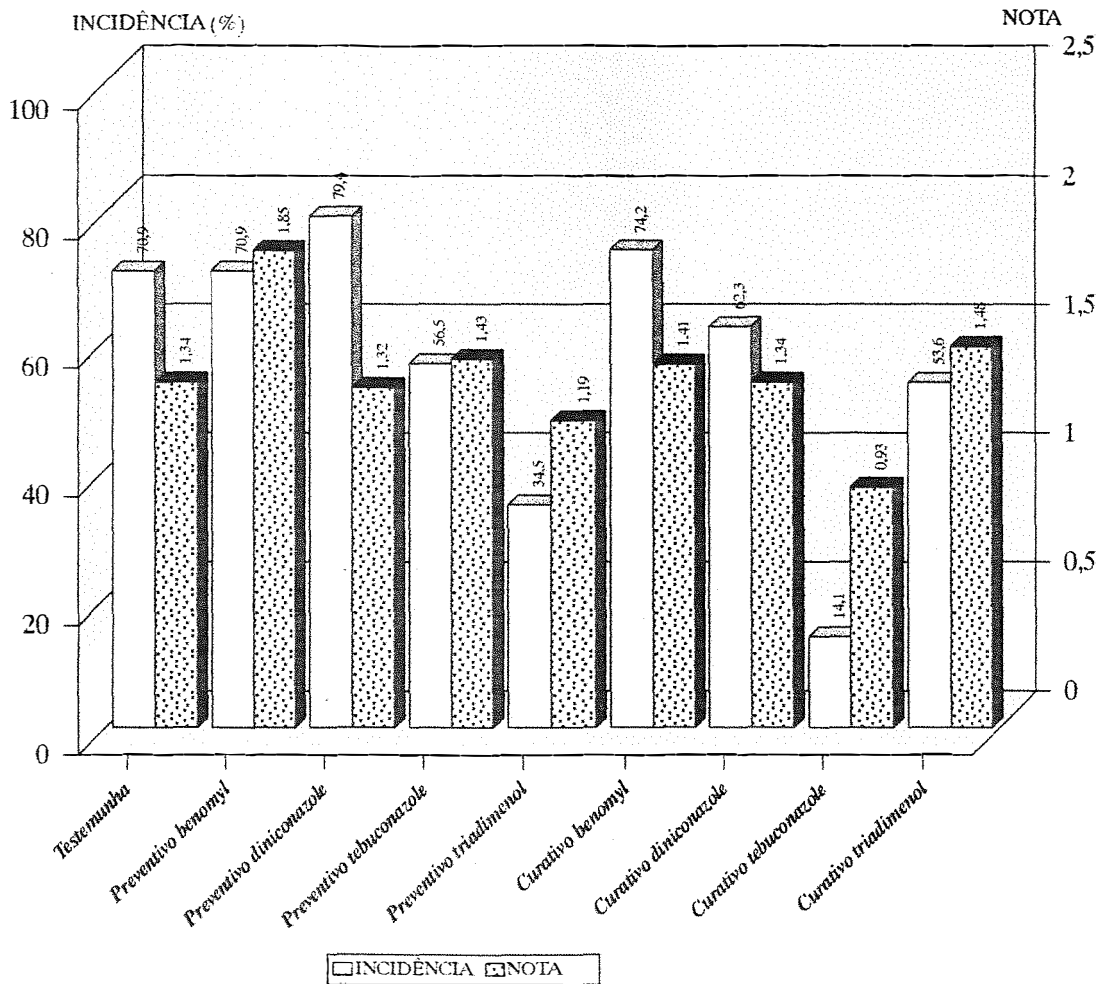


Figura 13. Efeito dos tratamentos preventivo e curativo dos fungicidas benomyl, diniconazole, tebuconazole e triadimenol sobre a incidência de lesões de antracnose em plantas de pimentão.

tendo em vista que o método de dupla-difusão em ágar não evidenciou linhas de precipitação entre os antígenos reagentes de micélios ou conídios, e os antissoros dos isolados de pimentão e jiló.

No teste de ELISA Indireto, as leituras foram padronizadas com os antígenos reagentes de micélio dos isolados de *C. gloeosporioides* na concentração de 500 µg em equivalentes de SAB/ml e a diluição do conjugado-enzima foi 1:9000.

A reação dos antígenos reagentes e conjugados com Ig G, obtidos dos antissoros de micélio de isolados de pimentão e jiló, está expressa em leitura de absorbância à 405 nm, na Tabela 18 e Figura 14.

Os antissoros dos isolados do pimentão reconheceram igualmente os antígenos dos isolados de pimentão e jiló.

Os isolados 30 e 31 de jiló apresentaram identidade com o antissoro de pimentão, do mesmo nível do isolado 10 de pimentão.

Os antissoros dos isolados do jiló reagiram semelhantemente entre os antígenos dos isolados de pimentão e jiló, mas reagindo fortemente com extratos miceliais de

TABELA 18 - Resultados do teste de ELISA Indireto (A 405 nm) da reação entre os antissoros de micélio dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e antígenos obtidos de micélio dos isolados de pimentão e jiló, na concentração de 500 μ g em equivalentes de SAB/ml.

ISOLADOS	ANTISSIONOS	
	ISOLADOS DO PIMENTÃO	ISOLADOS DO JILÓ
54p	0,296	0,221
53p	0,265	0,452
51p	0,384	0,438
50p	0,384	0,219
25p	0,275	0,390
10p	0,463	0,618
7p	0,352	0,331
36j	0,304	0,545
35j	0,368	0,359
32j	0,337	0,262
31j	0,555	0,755
30j	0,322	0,731

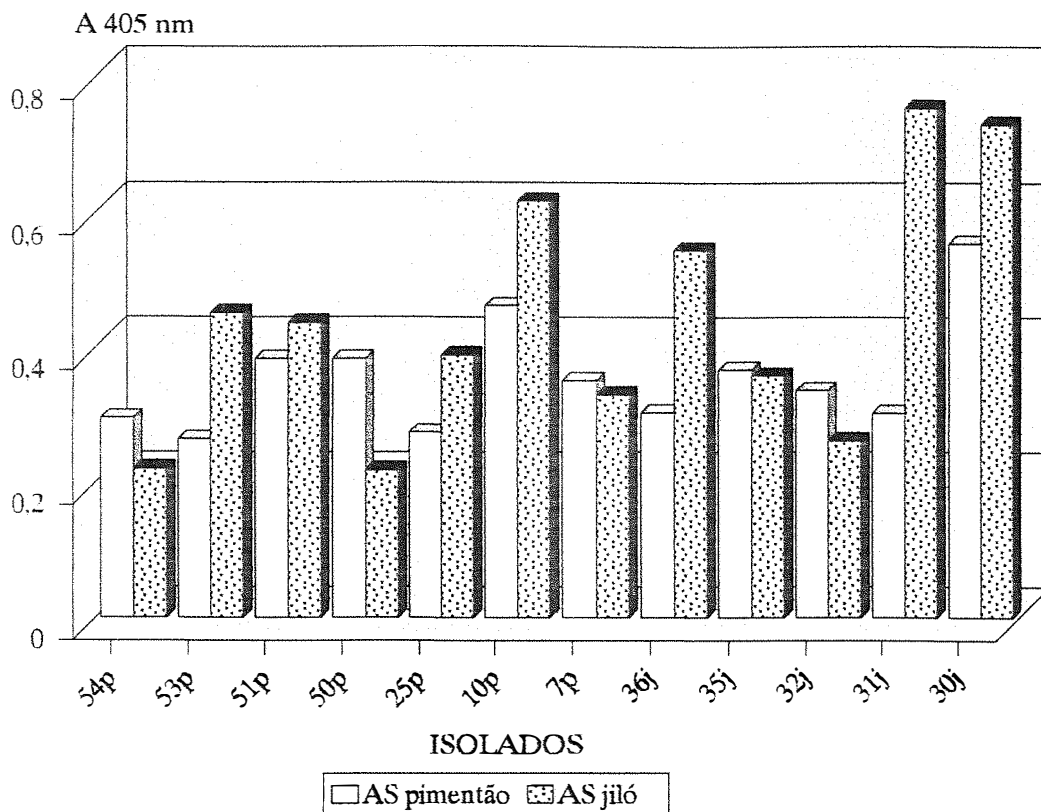


Figura 14. Leitura (A405nm) da reação entre antígenos reagentes e antissoros obtidos de micélio de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de pimentão e jiló. Teste de *ELISA*.

homólogos, como nos antígenos dos isolados 36j, 31j e 30j e um heterólogo como o isolado 10p.

O controle representado pelo soro normal foi negativo e os resultados mostraram sensibilidade máxima com os antígenos reagentes concentrados.

4.10. Caracterização dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por eletroforese

Os perfis eletroforéticos de esterase, extraída dos isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pimentão e jiló, encontram-se representados no diagrama da Figura 15.

A análise do número, posição e intensidade das bandas eletroforéticas mostrou que os isolados de jiló apresentaram 3 bandas. A mobilidade relativa (R_m) das bandas destes isolados ficou em 1,0 para a primeira, a de maior intensidade, 2,6 a 3,3 para a inferior e de menor intensidade que a primeira e uma terceira banda intermediária, pequena e de R_m 2,0. O isolado 31j se diferenciou de seus homólogos por apresentar uma outra banda, posicionada logo após a primeira e de R_m de 1,3.

Os isolados obtidos de pimentão apresentaram duas bandas distintas, uma superior de R_m entre 0,5-0,8, sendo estreita e ligeiramente mais clara que a do jiló na mesma posição; outra inferior, larga e de forte intensidade,

cujo R_m variou de 2,3 a 3,4. No caso do isolado 25p não se evidenciou a banda de R_m 0,8.

A banda intermediária de R_m 2,0 constatada para os isolados de jiló não foi encontrada nos isolados de pimentão, podendo se considerar esta banda como aquela diferenciadora entre os dois grupos.

Os isolados 53p e 54p exibiram bandas com baixa atividade enzimática, quase não detectáveis e por isso não foram apresentados na Figura 15.

Na Figura 16 observa-se a representação da densitometria do padrão de esterase destes isolados e cujo número, tamanho e posição dos picos comparados, reforçam as observações descritas nos perfis eletroforéticos.

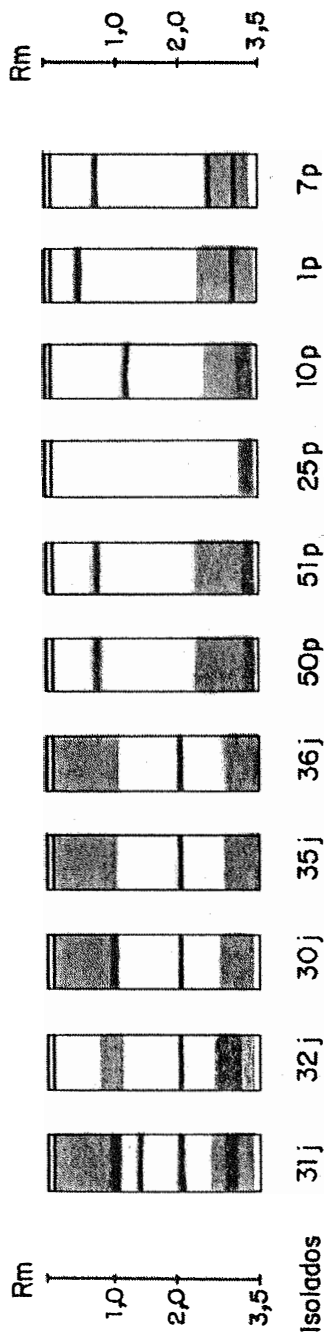


FIGURA 15: Diagrama dos perfis eletroforéticos de esterase e sua mobilidade relativa (Rm) dos isolados 31j, 32j, 30j, 35j, 36j, 50p, 51p, 25p, 10p, 1p e 7 p.

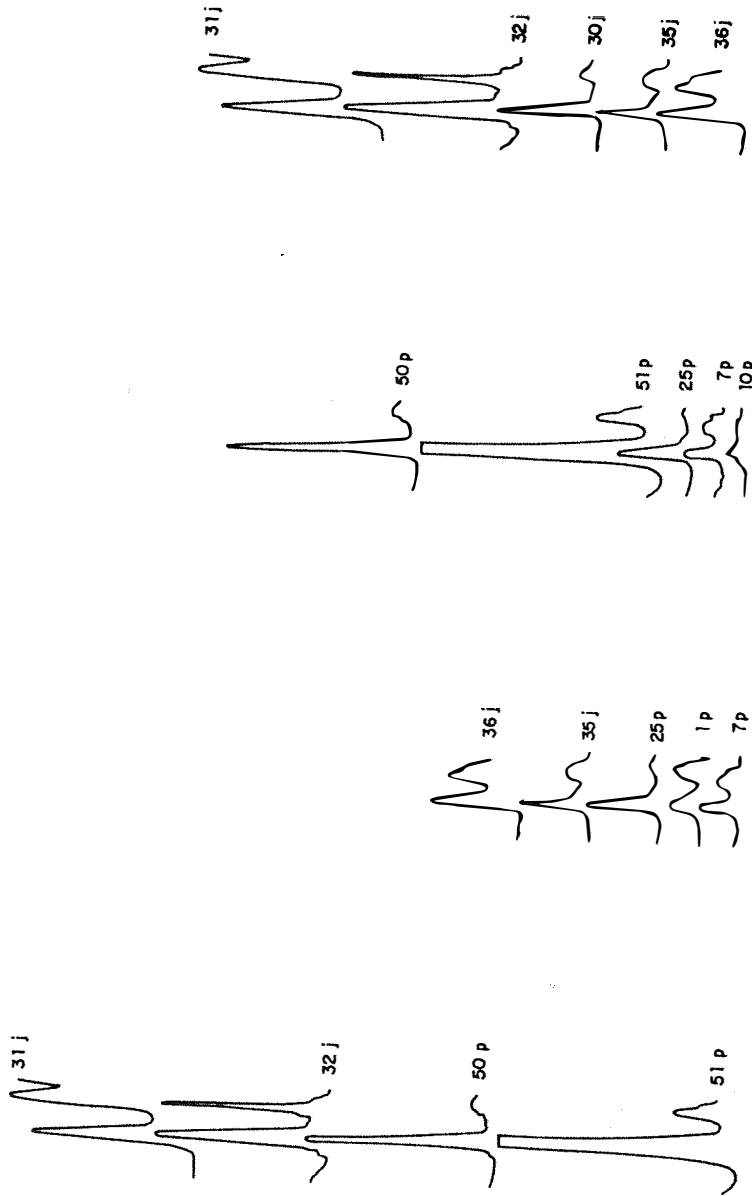


FIGURA 16: Diagrama da densitometria (540 nm) do padrão de esterase dos isolados 31j, 32j, 30j, 35j, 36j, 50p, 51p, 25p, 10p, 1p, e 7p.

5. DISCUSSÃO

5.1. Critérios morfológicos e fisiológicos

Apesar da variabilidade cultural típica do *Colletotrichum gloeosporioides*, critérios morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade foram estudados para caracterizar isolados deste fungo, obtidos de pimentão (*Capsicum annum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Radd.).

Avaliações do crescimento micelial no meio de cultura BDA mostraram que, de um modo geral os isolados do pimentão e do jiló necessitaram de 10 dias para que os bordos da colônia ocupassem todo o diâmetro da placa de Petri. Neste período de tempo estudado, nenhum grupo superou ao outro em desenvolvimento micelial, apenas alguns se destacaram dentro dos isolados de pimentão e jiló.

O meio de cultura BDA mostrou características desejáveis, previamente determinadas para *C. gloeosporioides* (MADEIRA et al., 1987; SIMMONDS, 1965), como sendo um bom meio para produção de esporos e massa micelial.

Especialmente importante entre todos os fatores fisiológicos, influenciando o crescimento micelial, esporulação e formação do apressório é a temperatura.

A influência da temperatura sobre o crescimento micelial dos isolados se fez notar desde o crescimento inicial até o crescimento final (aos 10 dias de incubação), sendo, neste último caso, determinante na diferenciação dos isolados de pimentão e jiló.

Agrupando-se os isolados de pimentão e contrastando-os com os de jiló, observou-se que a distinção entre os grupos se deu principalmente pela temperatura ótima de crescimento. Enquanto que para os isolados de pimentão a temperatura ótima ficou entre 24°-26°C, à exceção do isolado 54p, nos isolados de jiló esta faixa de temperatura foi inferior, ficando estabelecida entre 18°-21°C. A temperatura de 32°C foi a limitante do desenvolvimento em todos os isolados.

Grandes variações observadas no isolado 54p e 27j, contrastaram com todos os isolados de cada grupo, mas a variabilidade entre isolados de *C. gloeosporoides*, mesmo sendo provenientes de culturas monospóricas, é comum para esta espécie, sendo já relatada para vários parâmetros e explicada por sua instabilidade genotípica. CASELA et al.(1994), em recente revisão, apontaram vários mecanismos que explicariam as variações morfológicas e patogênicas em *Colletotrichum*, como a heterocariose, aneuploidia, recombinação e mutação.

O estabelecimento da temperatura ótima de crescimento e a temperatura limite, permitiu a SMITH (1990) distinguir *C. gloeosporioides* de *C. acutatum* e *C. fragariae*, isolados de morango.

Também SLADE et al. (1987) mostraram que isolados de *C. gloeosporioides*, não cresceram bem em temperaturas acima de 32°C, em concordância com outros trabalhos de outras espécies de *Colletotrichum*, como o de ISHIDA et al. (1969) em *C. lagenarium* e o de MATHUR et al. (1949) em *C. lindemuthianum*.

AGOSTINI et al. (1992) observaram que o crescimento máximo de *C. gloeosporioides* isolados de citrus foi à 31°C e que a resposta dentro do grupo dos isolados à temperatura foi semelhante, ficando o crescimento máximo em torno de 27°C. Em *C. gloeosporioides* isolado de maracujá, KAGIWATA (1986) observou que o crescimento micelial aumentou com o aumento da temperatura de 5 a 25°C, decrescendo a seguir até 35°C, sendo o mesmo fato observado por FRANCISCO NETO et al. (1994) em isolados de maracujá, constatando maior velocidade de crescimento 25°C, dentro de uma faixa de 8°-33°C.

O tamanho e a morfologia dos conídios sempre foram enfatizados como um importante critério taxonômico, embora bastante variável.

As observações dos conídios de *C. gloeosporioides* isolados de pimentão e jiló mostraram que a

forma destas estruturas coincidiu com aquela tradicionalmente descrita para *C. gloeosporioides*: conídios cilíndricos e de extremidades arredondadas (SIMMONDS, 1965; MORDUE, 1971a), diferindo das descrições feitas para *C. capsici* e *C. indicum*, identificadas com conídios falcados (ROBERTS et al, 1990).

A coloração da massa conidial em meio de cultura mostrou variações entre cor creme a salmon fortemente brilhante para os isolados de pimentão e para os isolados de jiló a cor ficou entre oliva e cinza escuro. A variação de cor entre creme à cinza escuro, passando por salmon e oliva correspondeu à descrita por diversos autores para *C. gloeosporoides* (SIMMONDS, 1965; MORDUE, 1971a; KULSHRESTHA, 1976).

A dimensão dos conídios tem sido um parâmetro importante na distinção entre espécies de *Colletotrichum* e subtipos dentro das espécies.

O comprimento dos conídios dos isolados de *C. gloeosporoides*, obtidos de pimentão e jiló, variou de 7,82-21,85 μm de comprimento e 2,53 -7,36 μm de largura. Dentro dessa amplitude de comprimento e largura, constatou-se que os isolados de pimentão tiveram as medidas de comprimento dos conídios ligeiramente menores do que as do jiló e as de largura foram maiores para o grupo do pimentão em relação ao do jiló.

O contraste entre os isolados de pimentão e jiló, embora não tenha mostrado diferenças estatisticamente

significativas, evidenciou-se que a largura foi mais diferenciadora entre os grupos do que o foi o comprimento dos conídios.

Embora a variação das medidas dos conídios tenha sido expressiva, suas dimensões ficaram compreendidas para aquelas descritas na literatura para *Colletotrichum gloeosporioides* (SIMMONDS, 1965; MORDUE, 1971a; COX et al, 1988) e contrastando com os relatos para *C. capsici* ou *C. indicum* com conídios de comprimento de 16,9 - 28,6 μm para o primeiro e 13,6 - 29,9 para o segundo, de acordo com ROBERTS et al., 1990) e ADIKARAM et al. (1983).

Os apressórios se desenvolveram na extremidade do tubo germinativo, aproximadamente 8 horas após a germinação dos conídios. Os apressórios dos isolados do jiló foram escuros e de forma mais constante que os do pimentão, mostrando sempre a forma arredondada e de paredes grossas. Os dos isolados do pimentão apresentaram formas variáveis entre ovalado e lobado e com paredes finas. O comprimento e a largura destes apressórios não foram um bom critério para a separação dos grupos, tendo o isolado 35j apresentado o maior apressório (9,57 X 7,50 μm) e o isolado 25p o menor (5,19 x 4,11 μm). Estas dimensões estão de acordo com as referidas por MORDUE (1971a) para *C. gloeosporioides*.

Estes resultados estão em consonância com os comentários de COX et al. (1988) que, trabalhando com isolados de *C. gloeosporioides*, concluíram que a morfologia do

apressório e não o tamanho é um critério útil na taxonomia. Entretanto, GUNNELL et al. (1992) afirmaram que o apressório produzido em cultura não é útil para a separação de tipos dentro de *Colletotrichum*, já que eles são muitos semelhantes em tamanho e variando pouco na forma. Aqueles autores enfatizaram também a morfologia das setas como um critério taxonômico.

Nos isolados de *C. gloeosporioides* estudados, tanto os isolados do pimentão como os do jiló, não foi encontrada a presença de setas, nem em meio de cultura e nem no hospedeiro. Esta observação mais uma vez vem a se contrapor, junto com as dimensões dos conídios, aos estudos de ROBERTS et al. (1990), que se referiram ao *C. capsici* e *C. indicum* como agentes de antracnose em *Capsicum*, caracterizando-os como possuidores de numerosas setas. Além das setas, a morfologia e o tamanho dos apressórios de *C. capsici* se diferenciaram do *C. gloeosporioides* observados em pimentão, pois se apresentaram marrons, triangulares e com 3 μm de diâmetro, segundo ADIKARAM et al. (1983).

5.2. Patogenicidade, Serologia e Eletroforese

Dados morfológicos têm sido instrumentos importantes na interpretação da variabilidade e taxonomia do *Colletotrichum*, mas a contribuição se restringe a nível de espécie, enquanto que estudos de patogenicidade e análise

molecular permitem a resolução do complexo *C. gloeosporioides* a nível subespecífico (HAYDEN et al., 1994).

O teste de patogenicidade em frutos verdes destacados de pimentão e jiló mostrou diferenças de comportamento entre os isolados. Enquanto os isolados de pimentão foram capazes de induzir o desenvolvimento de lesões em ambos os tipos de frutos, os isolados de jiló só foram patogênicos aos frutos de jiló. Isto evidencia uma distinção fisiológica entre os isolados de pimentão e jiló, destacando a forma altamente patogênica dos isolados de pimentão ou uma especialização fisiológica para os isolados de jiló. TAKATSU (1970) já havia feito esta constatação, só que para este autor a especialização fisiológica se referia à fase de maturação dos frutos: uma forma fisiológica altamente patogênica em qualquer fase do desenvolvimento e a outra patogênica apenas em frutos maduros.

O aspecto da fase de maturação dos frutos na avaliação da patogenicidade do *C. gloeosporioides* é uma discussão relevante.

Como já foi comentado, embora o *C. gloeosporioides* seja um patógeno que se manifeste em frutos maduros, sob determinadas condições tais como ferimentos, alta pressão de inóculo e condições ambientais favoráveis, os sintomas podem ser notados também em frutos verdes e o fungo permanece latente na planta ou em qualquer estágio de desenvolvimento do fruto (BINYAMINI et al., 1972).

De fato, PRAKASAM et al. (1989), usando a técnica de clarear tecidos infectados de *Capsicum annuum*, observaram que o apressório esteve presente em frutos de todas as idades.

A opção de não usar tecido maduro ou senescente também foi explicitada por AGOSTINI et al. (1992), em testes de patogenicidade com citrus. Estes autores afirmaram que pelo fato de *C. gloeosporioides* colonizar rapidamente tecidos senescentes, as pétalas senescentes não tinham resistência à infecção por nenhum isolado de *C. gloeosporioides* e que por isso os isolados não podiam ser distinguidos em sua patogenicidade naquela situação. Por outro lado, botões florais jovens foram afetados apenas quando a pressão de inóculo era alta.

No presente trabalho, a concentração usada de 10^4 conídios/ml não é considerada por alguns autores uma alta pressão de inóculo, embora os frutos tivessem sido feridos.

MADEIRA et al. (1987) compararam inoculações de fruto de pimentão, jiló e beringela com 10^4 e 10^6 conídios/ml de *C. gloeosporioides*, com ferimento. Concluíram que a inoculação com 10^6 conídios/ml não diferenciou os isolados de beringela do isolado de pimentão e que isso foi possível ao se usar 10^4 conídios/ml, que permitiu diferenciações de genótipos de frutos e patogenicidade dos isolados.

A serologia, pelo teste de dupla-difusão em ágar, não permitiu a distinção entre os isolados de pimentão e jiló.

Neste teste, os antissoros preparados para isolados de *C. gloeosporioides* foram analisados contra antígenos obtidos de micélio e conídios e não houve reações de precipitação entre antissoros-antígenos homólogos e heterólogos.

Algumas hipóteses talvez possam explicar a ausência de reações de precipitação. Por exemplo, talvez o extrato micelial não contivesse antígenos no micélio e, se presentes, esses antígenos não foram liberados pela extração, muito embora a concentração dos antígenos nos extratos miceliais não tenha sido determinada.

Em *Colletotrichum truncatum* BRILL et al. (1994) observaram que 4 de 6 antissoros, obtidos através de filtrados de cultura, não reagiram com antígenos obtidos de extrato micelial, sugerindo que componentes reativos podem se modificar após secreção no meio e não são extraíveis em uma forma reativa.

Outras explicações se somariam à anterior, como as que sugerem PURKAYASTHA et al. (1987), como a baixa afinidade dos antígenos, idade da cultura e pequena taxa de difusão no ágar.

PURCIFULL et al. (1977) apontam ainda que impurezas contidas no ágar tornam seu uso inadequado e que adição de SDS (Dodecyl Sulfato de Sódio) ao ágar facilita a dissociação dos antígenos e minimiza problemas com precipitações não específicas; apontam ainda a adição de azida

de sódio à 1% é um sal que pode influir nas reações de precipitação.

Técnicas serológicas mais sensíveis podem detectar determinantes antigênicos específicos, não visualizados pelo teste de dupla-difusão em ágar.

O teste de ELISA tem maior sensibilidade para as reações antígeno-anticorpo.

A maior sensibilidade do teste de ELISA se deve, segundo CONVERSE et al. (1990), à ligação covalente entre a molécula de imunoglobina a uma enzima que imprime ao complexo a imuno-especificidade da imunoglobina e a atividade catalítica da enzima, sobre reagentes ligados a uma fase sólida. A característica do teste de ELISA indireto é que a enzima está ligada a uma molécula que detecta a imunoglobina.

O teste de ELISA indireto foi capaz de detectar antígenos comuns ou de reação cruzada presentes nos extratos miceliais de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pimentão e jiló.

Os antissoros de isolados de *C. gloeosporioides* de pimentão não diferenciaram os isolados do grupo do pimentão daqueles do grupo do jiló, visto que o reconhecimento dos antígenos foi igual para ambos.

Apesar dos antissoros de isolados de *C. gloeosporioides* do jiló ter tido comportamento semelhante ao anterior, a reação com seus homólogos foi muito expressiva, como nos antígenos dos isolados 36j, 31j e 30j.

Algumas diferenças ocorreram entre antígenos do mesmo grupo, como o do isolado 10p, que foi mais reativo entre os do grupo pimentão e o 31j do grupo jiló.

A reatividade para extratos miceliais de outros grupos foi restrita ao isolado 10p, que reagiu fortemente com o antissoro do jiló e o antígeno do isolado 30j, que reagiu fortemente com o antissoro de pimentão. Os antígenos dos isolados 50p, 51p e 7p de pimentão e 35j e 32j reagiram moderadamente entre os antissoros homólogos e também com seus heterólogos.

A alta sensibilidade dos antissoros ao isolado 30j pode ser explicado como sendo devido à sua alta atividade, expressa como valores de A405. Talvez isso se justifique pela alta quantidade de níveis de anticorpos 30j ou pela alta afinidade entre antissoro-antígeno, ou ainda ambas as proposições podem ter contribuído para a alta sensibilidade.

De uma maneira geral, pode-se observar que o teste de ELISA indireto mostrou que os determinantes antigênicos, no grupo dos isolados de pimentão e no grupo dos isolados de jiló, são semelhantes, podendo o antissoro dos isolados de jiló apresentar um reconhecimento sorológico maior do que ao do pimentão.

Os perfis eletroforéticos de esterase vieram a confirmar variações ocorridas nas características entre isolados do mesmo grupo.

Observou-se por exemplo, que o isolado 31j possui uma banda estreita e de Rm 1,5, inexistente entre os outros de seu grupo. Da mesma forma, o isolado 25p teve seu padrão de esterase muito diferente do observado dentro do grupo pimentão.

O gel preparado para suporte da enzima esterase, mostrou que os isolados 32j, 30j, 35j, 31j e 36j tiveram migração no mesmo padrão, mas diferente do padrão de migração dos isolados de pimentão 50p, 51p, 25p, 10p, 1p e 7p.

A diferença encontrada na posição, intensidade e números de bandas distinguiu nitidamente um grupo do outro, caracterizando o grupo jiló como possuidores de uma banda esterase polimorfica de Rm 2,0 e assim tido como banda diferenciadora.

Alguns autores têm discutido a correlação entre patogenicidade com diferenças nos padrões enzimáticos.

JUNQUEIRA et al. (1987) observaram a existência de uma relação entre virulência de isolados de *Microcyclus ulei* com padrões isoenzimáticos, principalmente de esterase, peroxidase e lactato desidrogenase.

Em *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Stylosantes guianensis*, LENNÉ et al. (1990) fizeram comparações de virulência e fenótipos multilocus de isozimas com uma população onde ambos os caracteres variavam e não foi encontrada nenhuma associação.

Muito embora no presente trabalho tenha sido estudado apenas o padrão enzimático de esterase, observou-se que o comportamento de patogenicidade específica dos isolados de *C. gloeosporioides* do grupo jiló coincide com a expressão de uma banda polimórfica a mais no perfil eletroforético, em todos os isolados de jiló e principalmente no 31j, o mais patogênico do seu grupo, que apresentou uma outra banda com atividade não constatada em seus homólogos.

Além dessa correlação, o teste de ELISA indireto mostrou para o isolado 31j e também o 30j alta atividade antigênica com alto reconhecimento sorológico.

5.3. Sensibilidade à fungicidas

5.3.1. Sensibilidade "in vitro"

O fungicida benomyl foi inefetivo no controle do crescimento micelial para a maioria dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, já que se evidenciou desenvolvimento "in vitro" até a concentração de 400 µg/ml. Alguns isolados mostraram sensibilidade ao produto, sendo o crescimento reduzido a partir da adição de 100 ppm do ingrediente ativo.

A ED₅₀ elevada, quase sempre superior a 100 µg/ml, reafirma a insensibilidade dos isolados do pimentão e jiló.

O benomyl é um fungicida que vem sendo empregado pelos agricultores há algum tempo e não tem mostrado resultados satisfatórios (FERNANDES et al., 1994a/b). Esses autores também obtiveram resultados que evidenciaram a resistência de isolados de *C. gloeosporioides*, obtidos de pimentão, berinjela e jiló, à concentração de até 1000 µg/l.

Os fungicidas diniconazole, prochloraz e tebuconazole inibiram o crescimento dos isolados a partir da concentração de 1 µg/ml, à exceção de alguns isolados que se desenvolveram à 10 µg/ml. Já o triadimenol necessitou de doses superiores à 10 µg para inibir o crescimento dos isolados.

O tebuconazole e o diniconazole à 1 µg/ml mostraram efeito sobre os isolados de jiló, considerados sensíveis, exceção feita ao 31j, desenvolvido sob tebuconazole.

O prochloraz e o triadimenol não diferenciaram os 2 grupos, havendo oscilações de maior e menor insensibilidade entre eles, dependendo do isolado. O isolado 27j foi insensível até mesmo na dose de 100 ppm.

Estudos "in vitro" feito por outros autores apontavam para a eficiência dos compostos inibidores da biossíntese do ergosterol sobre alguns patógenos. Assim, o

prochloraz havia fornecido bom controle dos patógenos que não são inibidos por benzimidazóis (ECKERT et al., 1985). Esses autores afirmaram também que o aparecimento de tolerância ou insensibilidade ao prochloraz foi acompanhada por perda de patogenicidade.

Para o *C. gloeosporioides* essa correlação não foi constatada, sendo observado que os isolados considerados menos sensíveis, como os do jiló, tiveram especialização patogênica.

Alguns outros produtos novos ou sem registro para a cultura e a doença foram testados e os resultados indicaram que mesmo à concentração de 100 ppm do princípio ativo, não foi o suficiente para a inibição total do crescimento.

No entanto, alguns fungicidas forneceram algum controle, reduzindo o crescimento micelial em 70-80% em relação à testemunha, para a maioria deles.

Os fungicidas que tiveram maior efeito fungitóxico foram o pyremetanil e o tricyclazole, sendo seguido com médias muito próximas pelo carbendazin e o cyprodinil.

O cyprodinil é um novo fungicida pertencente a uma nova família química das pyrimidaminas. É considerado como altamente eficiente contra *Pseudocercospora*, *Erisiphe graminis*, *Drechslera teres*, *Septoria* e outros (BOCQUET et al., 1994). Segundo MCKENZIE (1994), seu modo de ação se dá pela inibição da biossíntese de aminoácidos, não apresentando

resistência cruzada com triazóis, benzimidazóis ou dicarboximidas.

O carbendazin é um derivado de benzimidazol, entre os quais está o benomyl, e apesar da insensibilidade já constatada dos isolados para com o benomyl, o carbendazin tem-se mostrado mais eficiente. A eficiência do carbendazin já foi relatada "in vitro" por KORE et al. (1989), que adicionaram 50 ppm de carbendazin em meio de cultura e observaram que não houve bom crescimento para *C. capsici*. Em estudos "in vivo", foi relatada a ocorrência de resistência de *C. coffeanum* ao carbendazin. Entretanto, OKIOGA (1976) relata que o efeito do carbendazin é inibir a esporulação e os trabalhos "in vitro" observam a inibição sobre o crescimento micelial.

Na cultura do pimentão, MISHRA (1988) encontrou um bom controle da antracnose pulverizando *Capsicum annuum* com 0,50 ppm de carbendazin, recomendando seu uso para o controle da antracnose.

Fenbuconazole e imebenconazole tiveram nível de controle semelhante mas foram melhores do que iminoctadine, flutolonil, fludioxonil e o fluquinconazole.

O fludioxonil é um novo fungicida não sistêmico de amplo espectro pertencendo ao grupo dos fenilpirroles. Foi desenvolvido para aplicações foliares para vegetais, algumas fruteiras no controle de *Botrytis*, *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* e *Alternaria* (LIGUORI et al., 1994).

O iminoctadine à 10 ppm mostrou ser efetivo contra vários fungos testados in vitro por KOIZUMI (1994). Este autor relata que houve inibição do crescimento e esporulação de *Penicillium*, *Geotrichum candidum* e que no campo controlou *Alternaria* e *Diaporthe*, mas não fez nenhuma referência ao *Colletotrichum*.

O fluquinconazole é um novo fungicida inibidor da biossíntese do ergosterol e é considerado como um fungicida de amplo espectro de atividade em pulverizações contra asco e deuteromycetos.

Segundo RUSSEL et al. (1992), o fluquinconazole fornece excelente controle contra *Cercospora*, *Phoma*, *Septoria* e outros. Também não foi estudado em *Colletotrichum* como todos os outros.

5.3.2. Sensibilidade "in vivo"

Da mesma forma que foi observado "in vitro", o tratamento com benomyl, pré e pós inoculação, e o tratamento preventivo com o diniconazole não controlaram a antracnose em plantas de pimentão.

O melhor controle foi obtido primeiramente com o tratamento curativo com o tebuconazole e com menor eficiência o triadimenol e esses resultados coincidem com os encontrados "in vitro".

O triadimenol e tebuconazole são produtos que não são recomendados para a cultura e nem para o controle da doença em estudo. A fitotoxidez observada para tebuconazole talvez possa ser evitada com adequação da dose, modo e época de aplicação. O detalhamento desses aspectos tornar-se-ia importante, já que o tebuconazole mostrou controlar a doença quando aplicado após a inoculação.

À exceção do benomyl, os outros produtos são novos ou nunca foram estudados para a cultura, não se encontrando trabalhos que possam complementar os resultados e contribuir para o estudo.

Devido ao uso intensivo de fungicidas na cultura, tolerância ao benomyl já havia sido relatada, inclusive para *Colletotrichum* em solanáceas e também para outras famílias como em citrus, morango, abacate, manga etc. (ECKERT, 1990). Essa tolerância e insensibilidade dos isolados de *C. gloeosporioides* explica porque o tratamento preventivo e curativo com esse fungicida não apresentou efeito sobre a doença e seus resultados se igualaram à testemunha.

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de pimentão e jiló se distinguiram na morfologia do apressório; os de jiló tendo paredes grossas e forma arredondada e os do pimentão tendo forma lobada e com paredes finas.

- As dimensões dos apressórios e conídios variaram pouco entre os isolados, sendo a largura dos conídios um fator de diferenciação mais expressivo do que o comprimento. Apenas essas características não permitiram separar os isolados.

- A temperatura ótima de crescimento micelial mostrou ser um método útil para separar os isolados do pimentão e jiló.

- Os isolados de *C. gloeosporioides* foram mais agressivos aos frutos dos quais se originaram, sendo os isolados de pimentão agressivos também aos frutos de jiló, sendo que estes exibiram especialização fisiológica na patogenicidade.

- O teste de ELISA-indireto mostrou que os determinates antigênicos, entre os grupos estudados, foram semelhantes, embora o antissoro do isolado de jiló tivesse um reconhecimento serológico maior do que o antissoro do pimentão.

- A eletroforese do padrão esterase distinguiu nitidamente os isolados de pimentão dos isolados de jiló, pela presença nestes últimos de uma banda diferenciadora de Rm 2,0.

- O fungicida benomyl não controla *C. gloeosporoides* "in vivo" ou "in vitro".

- Alguns fungicidas não testados na cultura de *Capsicum* e sobre *C. gloeosporioides*, mostraram algum potencial no controle da antracnose, como tebuconazole e sobre o crescimento micelial como o tricyclazole, pyrimetanil, carbendazin, cyprodinil. Nas concentrações estudadas não foi possível correlacioná-los como mais um critério taxonômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIKARAM, N.K.B.; BROWN, A.E.; SWINBURNE, T.R. Observations on infection of *Capsicum annuum* fruit by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum capsici*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 80(3):395-401, 1983.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, 82(11):1377-82, 1992.
- ALFENAS, A.C. & BROMMONSCHENCKEL, S.H. Eletroforese de proteínas e isoenzimas na taxonomia e genética de fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 14(1):108-9, 1989.

ALMEIDA, A.M.; NOGUEIRA, E.M.C.; FERRARI, J.T.; MARTINS, G.A.
Controle químico da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., Itajaí, (Supl.) 1994. Resumo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 19:296, 1994. (Resumo).

ANDRADE, G.M. & KIMATI, H. Insensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* do pimentão a BENOMYL. *Summa Phytopatologica*, Jaguariúna, 17(1):23, 1991.

ARX, J.A. Von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologisch Zeitschrift*, Berlin, 29:413-68, 1957.

BACCHI, L.M.A. Quantificação de parâmetros monocíclicos relacionada a epidemias no sistema *Uromyces appendiculatus* - feijoeiro. Piracicaba, 1993. 99p. (Doutorado - Escola Superior "Luiz de Queiroz"/USP).

BACH, E.E. Utilização da eletroforese no estudo de alterações enzimáticas na interação planta-patógeno. In: I ENCONTRO SOBRE APLICAÇÕES DA ELETROFORESE NA AGROPECUÁRIA, 1., Nova Odessa, 1989. Instituto de Zootecnia, 1989. p.1-4.

BACH, E.E. Comparação morfológica, patogênica, serológica e eletroforética de *Exserohilum turcicum* (PASS.) Leonard & SUGGS. isolado de milho, sorgo e capim massambará. Piracicaba, 1991. 137p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

BACH, E.E. & KIMATI, H. Curso teórico prático de eletroforese. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1993. 33p.

BAKER, C.A.; LECOQ, H.; PURCIFULL, D.E. Serological and biological variability among Papaya Ringspot Virus Type-W isolates in Flórida. *Phytopathology*, St. Paul, **81**(7):722-8, 1991.

BAXTER, A.P.; VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A.; EICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytopylactica*, Pretoria, **17**:15-8, 1985.

BINYAMINI, N. & NADEL-SCHIFFMANN, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*, St. Paul, **62**:592-4, 1972.

BOCQUET, G.; SYLVESTRE, M.; SPEICH, J. Le cyprodinil: fungicide céréales. In: NYFELE, R. & SOZZI, D. ed. **Ciba's contribution to progress in crop protection**. Basle, 1994, p.120.

BOER, S.H. Evaluation of Serological tests for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in composite potato stem and tuber samples. **Plant Disease**, St. Paul, 78(7):725-9, 1994.

BOLLEN, G.J. A comparison of the "in vitro" antifungal spectra and "in vivo" antifungal activity of benomyl. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, 76:299-312, 1972.

BOLLEN, G.J. & FUCHS, A. On the specificity of the "in vitro" and "in vivo" antifungal activity of benomyl. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, 76:299-312, 1970.

BONDE, M.R.; PETERSON, G.L.; MAAS, J.L. Isozyme comparisons of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Phytopathology**, St. Paul, 81(12):1523-28, 1991.

- BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum cloeosporoides* infecting *Stylosanthes* spp. in Austrália. **Mycological Research**, Cambridge, 94:1129-37, 1990.
- BRILL, L.M.; McCLARY, R.D.; SINCLAIR, J.B. Analysis of two ELISA formats and antigen preparations using polyclonal antibodies against *Phomopsis longicolla*. **Phytopathology**, St. Paul, 84(2):17309, 1994.
- BUXTON, E.W.; CULBRETH, W.; ESPOSITO, R.G. Serological separation of forms and physiologic races of pathogenic *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, 51:575, 1961.
- CASELA, C.R. & FREDRIKSEN, R.A. Pathogenic variability in monoconidial isolates of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola* from single lesions and from monoconidial cultures. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 19(2):149-53, 1994.
- CERKAUSKAS, R.F. Latent colinization by *Colletotrichum* spp.: Epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, 10:297-310, 1988.

- CHUPP, C. Some *Colletotrichum* on potato and tomato. *Mycologia*, Lancaster, 56:393-7, 1964.
- CLARK, M.F. Immunosorbent assays in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 19:83-106, 1981.
- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, London, 34:475-85, 1977.
- CONVERSE, R. & MARTIN, R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. eds. *Serological Methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. American Phytopathology Society, St. Paul, 1990. p.179-196.
- COX, M.L. & IRWIN, J.A.G. Conidium e apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. *Australian Systematic Botany*, Melbourne, 1(2):139-49, 1988.

- DALE, J.L.; MANNERS, J.M.L; IRWIN, J.A.G. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Austrália carry distinct double-stranded RNAs. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 91:671-6, 1988.
- DENNIS, C. **Post-harvest pathology of fruits and vegetables**. New York, Academic Press, 1993. 264p.
- ECKERT, J.W. Recent developments in the chemical control of postharvest diseases. *Acta-Horticulturae*, The Hague, 269:477-94, 1990.
- ECKERT, J.W. & OGAWA, J.M. The chemical control of post harvest diseases: subtropical and tropical fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 23:421-54, 1985.
- ECKERT, J.W. & SOMMER, N.F. Control of diseases of fruits and vegetables by post-harvest treatments. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 5:391-432, 1967.
- FANCELLI, M.I. Comparação patogênica, cultural serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* f. sp. *lycopersici* M.F. Piracicaba, 1991. 80p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FERNANDES, M.C.A.; RIBEIRO, L.D.; ECHER, M. Variabilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de *Capsicum annuum*, *Solanum melongena* e *S. gilo*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., Itajaí, 1994. Resumo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 19 (supl.):313, 1994a. (Resumo).

FERNANDES, M.C.A.; RIBEIRO, L.D.; SANTOS, A.S.; AKIBA, F. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* resistentes ao fungicida Benomyl. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., Itajaí, 1994. Resumo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 19 (supl.):284, 1994b. (Resumo).

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método Castellani para a conservação de fungos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, 33:9-13, 1967.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos fisiológicos e sorológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e sobre a doença por ele causada em berinjela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, 1972. 130p. (Doutrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FIGUEIREDO, M.B. & NAMEKATA, T. *Ascochyta phaseolum* Sacc. e outros fungos do gênero *Ascochyta*. I. Sorologia e sua aplicação na sistemática. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 41:67-93, 1974.

- FIGUEIREDO, M.B.; ALBA, A.P.C.; OLIVEIRA, A.R. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatológicos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, 3(4):233-59, 1977.
- FITZELL, R.D. Effects of regular applications of Benomyl on the population of *Colletotrichum* in mango leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 77(3):529-33, 1981.
- FRANCISCO NETO, E.; NAKAMURA, K.; OLIVEIRA, J.C. Influência de alguns fatores na germinação de conídios, no crescimento micelial e na esporulação de alguns isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de *Passiflora*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 20(2):96-100, 1994.
- GERALDI, M.A.P. & KIMATI, H. Caracterização patogênica e serológica de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957) do trigo (*Triticum aestivum* L.). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, 8(3/4):16-28, 1982.
- GUNNELL, P.S. & GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, Lancaster, 84(2):157-65, 1992.
- HALL, R. Fungitoxicants and fungal taxonomy. **The Botanical Review**, New York, 45(1):1-14, 1979.

HARRISON, J.G.; BARKER, H.; LOWE, R.; REES, E.A. Estimation of amounts of *Phytophthora infestans* mycelium in leaf tissue by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Pathology*, London, 39:274-7, 1990.

HAU, B. & KRANZ, J. Mathematical and statistics for analyses in Epidemiology. In: KRANZ, J., ed. *Epidemics of Plant Diseases*. Berlin, Spring-verlag, 1990, p.12-52.

HAYDEN, H.L.; PEGG, K.G.; AITKEN, E.A.B.; IRWIN, J.A.G. Genetic relationships as assessed by molecular markers and cross-infection among strains of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, 42:9-18, 1994.

HIGGINS, B.B. Anthracnose of pepper (*Capsicum annum* L.). *Phytopatology*, St. Paul, 16(1):333-45, 1926.

HOLTZ, B.A.; KARU, A.E.; WEINHOLD, A.R. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Thyelaviopsis basicola*. *Phytopatology*, St. Paul, 84(9):977-83, 1994.

IGARASHI, S. & KIMATI, H. Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica, patogênica e serológica de *Colletotrichum* spp. de morango (*Fragaria* spp). *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 11(1/2):34-5, 1985.

- ISHIDA, N. & AKAI, S. Relation of temperature to germination of conidia and apressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Mycologia*, Lancaster, 61:382-7, 1969.
- JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGGER, M.J.; PUMBLEY, R.A. *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, London, 39:343-66, 1990.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; ALFENAS, A.C.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; GASPAROTTO, L. Variabilidade isoenzimática de isolados de *Microcyclos ulei* com diferentes níveis de virulência. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 12(3):208-14, 1987.
- JVO, P.S. & STOTSKY, G. Eletrophoretic analyses of isozymes from seeds of *Pinus abces* and *Pseudotsuga*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 51:2201-5, 1973.
- KAGIWATA, T. An antracnose of passion fruit caused by *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et Schrenk. *Journal of Agricultural Science*, Tóquio, 31(2):90-100, 1986.
- KENDRICK, J.B. & WALKER, J.C. Anthracnose of tomato. *Phytopathology*, St. Paul, 38:247-60, 1948.

- KIM, W.G.; CHO, E.K.; LEE, E.J. Two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose on pepper fruits. *Korean Journal of Plant Pathology*, Seoul, 2:107-13, 1986.
- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957). Piracicaba, 1975. 103p. (Livre Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz")/USP.
- KOIZUMI, M. Iminoctadine for control of citrus storage diseases. *Japan Pesticide Information*, Tóquio, 60:12-4, 1994.
- KORE, S.S. & APET, K.T. Adaptation of *Colletotrichum capsici* to fungicides. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*, New Delhi, 14(1):103-4, 1989. Apud *Review of Plant Pathology*, Wallingford, 69: 1990. (Resumo).
- KOZAR, F. & NETOLITZKY, H.J. Studies on hyphal development and apressorium formation of *Colletotrichum graminicola*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 56:2234-42, 1978.
- KULSHRESTHA, D.D.; MARTHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Identification of seed-borne species of *Colletotrichum*. *Friesia*, Copenhagen, 11(2):116-25, 1976.

- KWEE-TONG, L. & OOI-CHOIW. Effects of selected fungicides "in vitro" on the mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 11:67-74, 1986.
- LEITE, R.M.V.B.C. & KUROZAWA, C. Variabilidade patogênica, morfológica e serológica de *Elsinoe fawcettii*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 19(1):5-10, 1994.
- LENNÉ, J.M. & BURDON, J.J. Preliminary study of virulence and isozyme variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosantes guianensis*. *Phytopathology*, St. Paul, 80(8):728-31, 1990.
- LIGUORI, R.; CASOLA, F.; BASSI, R.; FILI, V.; FILIPPI, G.; GEBERT, H.; RUBERTI, R.; SAPORITI, G. Fludioxonil (CGA 173506): nuovo fungicida fenilpirrolo a largo spettro d'azione. In: NYFELER, R. & SOZZI, D. ed. *Ciba's contribution to progress in crop protection*. Basle, 1994, p.118.
- LOMMEL, S.A.; MCCAIN, A.H.; MORRIS, T.J. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology*, St. Paul, 72:1018-22, 1982.

- MCCLEAN, K.S. & ROY, K.W. Weeds as source of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose on tomato fruit and cotton seedlings. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, 13:131-4, 1991.
- McKENZIE, D. A novel broad spectrum fungicide. In: NYFELER, R. & SOZZI, D. ed. *Ciba's contribution to progress in crop protection*. 1994. p.120.
- MADEIRA, M.C.B. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Avaliação de método de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de berinjela. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 12(4):406-8, 1987.
- MAIELLO, J.M. Acervulus initiation in *Colletotrichum capsici*. *Mycologia*, Lancaster, 80(3):410-3, 1988.
- MATHUR, R.S.; BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology*, St. Paul, 40:104-14, 1950.
- MENTEN, J.O.M. & KIMATI, H. Relações morfológicas e serológicas entre raças patogênicas de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *curcubitae* (Berk. et. Mont.) n. comb. *Ecosystema*, Espírito Santo do Pinhal, 4:5-11, 1979.

- MISHRA, D. Fungicidal control of anthracnose and fruit-rot (*Colletotrichum capsici*) of chilli (*Capsicum annum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, New Delhi, 58(2):147-9, 1988.
- MOHAN, S.B. Cross-reactivity of antiserum raised against *Phytophthora fragariae* with other *Phytophthora* species and its evaluation as a genus-detecting antiserum. *Plant Pathology*, London, 38:352-63, 1989.
- MORDUE, J.E.M. *Colletotrichum capsici*. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, 1971a (CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 315).
- MORDUE, J.E.M. *Glomerella cingulata*. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, 1971b (CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 315).
- NAIR, P.; SASIKUMARAN, S.; PILLAI, Y.S. Time of application of fungicide for control of anthracnose disease of pepper. *Agricultural Research Journal of Kerala*, Trivandrum, 25(1):136-9, 1987. Apud *Review of Plant Pathology*, 68: 1989. (Resumo)

NAKAMURA, A.M. Caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Bipolaris* e de *Exserohilum* isoladas do milho (*Zea mays* L.) e do sorgo (*Sorghum* spp.) no Estado de São Paulo. Jaboticabal, 1992. 129p. (Doutorado-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP).

OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1(1):61-4, 1975.

OKIOGA, D. Occurrence of strains of *Colletotrichum coffeanum* resistant to methyl benzimidazol-2-ylcarbamate (carbendazin) and chemically similar compounds. *Annals of Applied Biology*, London, 84:21-30, 1976.

OUCHTERLONY, O. & NILSON, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D.M. *Handbook of experimental immunology*. Oxford, Blackwell, 1979, cap. 19.

PARK, W.N.; PARK, S.H.; LEE, Y.S.; KO, J.H.; CHO, E.K. Differentiation of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on *Capsicum annum* L. by eletrophoretic method. *Korean Journal of Plant Pathology*, Seoul, 3(2):85-92, 1987.

PRAKASAM, V. & JEYARAJAN, R. Role of surface wax of chilli fruits in inducing resistance to fruit rot pathogens *Colletotrichum capsici* and *Helminthosporium rostratum*. *Current Science*, Bangalore, 58(17):976-7, 1989.

PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion tests with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) - Treated Plant Viruses and Plant viral inclusions. *Institute of Food and Agricultural Sciences*, Gainesville, Bulletin Técnico 788, 1977, 39p.

PURKAYASTHA, R.P. & GHOSAL, A. Immunoserological studies on root rot of ground nut (*Arachis hypogea* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 33:647-51, 1987.

REGO, A.M.; MAFFIA, L.A.; ALFENAS, A.C. Virulência e análise de isoenzimas de *Colletotrichum orbiculare*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 19(4):552-9, 1994.

RIBEIRO, W.R.C. & BOLKAN, H.A. Microflora de frutos de tomate comercializados no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 6:367-75, 1981.

RICHARDSON, L.T. Adaptative tolerance of *Fusarium solani* to benzimidazole derivatives "in vitro". *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 51:1725-32, 1973.

ROBERTS, R.G. & SNOW, J.P. Morphological and pathological studies of *Colletotrichum capsici* and *C. indicum*. *Mycologia*, Lancaster, 82(1):82-90, 1990.

RUSSEL, P.E.; PERCIVAL, A.; COLTMAN, P.M., GREEN, D.E. Fluquinconazole, a novel broad-spectrum fungicide for foliar application. In: British Crops Protection Council ed. Brighton Crop Protection conference, Pests and Diseases, London, Vol 1, 411-18, 1992.

SHATTOCK, P.M.F. The use of serology in the classification of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, London, 12:367-74, 1955.

SIMMONDS, J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science*, Brisbane, 22:437-59, 1965.

SLADE, S.J.; HARRIS, R.F.; SMITH, C.S.; ANDREWS, J.H. Microcycle conidiation and spore-carrying capacity of *Colletotrichum gloeosporioides* on solid media. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 53(9):2106-10, 1987.

- SMITH, B.J. Morphological, Cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*. St. Paul, 74(1):69-76, 1990.
- SMITH, R.W. & CROSSAN, D.F. The taxonomy, etiology, and control of *Colletotrichum piperatum* (E. & E.) E. & H. and *Colletotrichum capsici* (Syd.) B. & B. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 15:1099-103, 1958.
- STANGHELLINI, M.E. & ARAGAKI, M. Relation of periderm formation and calose deposition to anthracnose resistance in papaya fruit. *Phytopathology*, St. Paul, 56:440-50, 1982.
- SUNDARAM, S.; PLASENCIA, J.; BANTTARI, E.E. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Verticillium* spp. using antisera produced to *V. dahliae* from potato. *Phytopathology*, St. Paul, 81:1485-9, 1991.
- SUTTON, B.C. *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fries) Grove and *C. trichellum* (Fr. ex Fr.) Duke. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 45:222-32, 1962.
- SUTTON, B.C. *The Coleomycetes*. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.

TAKATSU, A. Estudos sobre os agentes causais das antracoses dos frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.) e jiló (*Solanum gilo* Raddy) que ocorrem nos núcleos rurais do Distrito Federal. Piracicaba, 1970. 69p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

THIND, T.S. & JHOOTY, J.S. Studies on variability in two *Colletotrichum* species causing anthracnose and fruit rot of chillies in Punjab. *Indian Phytopathology*. New Delhi, 43(1):53-8, 1990.

TIMMER, L.W. & ZITKO, S.E. Timming of fungicide applications for control of post bloom fruit drops of citrus in Florida. *Plant Disease*, St. Paul, 76(8):820-3, 1992.

ULLASA, B. Influence of time of application of some fungicides on their efficacy against mango anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease Research*, Ludhiana, 4(2):196-7, 1989.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.; BARTLETT, A. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of viral infections. In: ROSE, N. & FRIEDMAN, H., ed. *Manual of clinical immunology*. Washington, American Society for Microbiology, Washington, 1980. p.359-71.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: Análise de variância do crescimento micelial média dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	
		5 dias	10 dias
Isolado	17	6,05**	5,55**
Resíduo	36	0,48	0,94
C.V. (%)		17,34	15,09

** Significativo ao nível de 1%.

APÊNDICE 2: Análise de variância do diâmetro médio das colônias de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidas sob diferentes temperaturas.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	
		5 dias	10 dias
Isolado (I)	17	9,27**	8,28**
Temperatura (T)	4	113,48**	379,79**
I X T	68	2,20**	3,35**
Resíduo	180	0,18	0,25
C.V. (%)		17,56	12,62

** Significativo ao nível de 1%. de probabilidade

APÊNDICE 3: Análise de variância do comprimento e largura (μm) dos conídios, dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	
		comprimento	largura
Isolado	20	106,75**	7,77**
Resíduo	1000	3,10	0,32
C.V. (%)		12,39	12,40

** Significativo ao nível de 1%. de probabilidade

APÊNDICE 4: Análise de variância do comprimento e largura (μm) dos apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	
		comprimento	largura
Isolado	10	47,35**	24,69**
Resíduo	209	0,93	0,79
C.V. (%)		14,44	16,88

** Significativo ao nível de 1%. de probabilidade

APÊNDICE 5: Análise de variância do diâmetro (cm) das lesões em frutos destacados de pimentão e jiló, inoculados com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio
Hospedeiro (H)	1	1,94**
Isolado (I)	19	2,54**
H * T	19	1,53**
Resíduo	120	0,06

C.V. (%) 17,78

** Significativo a nível de 1% de probabilidade

APÊNDICE 6: Análise de variância e do diâmetro médio (cm) das colônias dos isolados de *Colletotrichum gloeosporoides*, sob diferentes doses de benomyl.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	
		5 dias	10 dias
Isolado (I)	14	2,41**	3,84**
Doses (D)	3	55,45**	204,02**
I * D	42	1,22**	3,64**
Resíduo	120	0,09	0,17
C.V. (%)		12,89	10,12

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

APÊNDICE 7 : Análise de variância do crescimento micelial (cm) em relação à testemunha, dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos "in vitro" sob diferentes doses (ppm) dos fungicidas diniconazole, prochloraz, triadimenol, tebuconazole*

Causas da variação	G.L.	Quadrado Médio
Fungicida (F)	3	457,04**
Dose (D)	2	9974,18
Isolado (I)	14	966,17**
F * D	6	107,84**
F * I	42	633,66**
D * I	28	279,48**
F * D * I	84	203,59**
Resíduo	360	11,05
CV(%)		12,43

* Dados transformados para Arco seno $\sqrt{x/103}$

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 8 - Médias dos fungicidas dentro dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

ISOLADO	FUNGICIDAS			
	prochloraz	triadimenol	tebuconazole	diniconazole
1p	3,0 cde*	3,40 cde**	2,81 d**	3,35 bcd*
2p	3,22 bc	3,5 cd	2,80 d	2,80 cdef
7p	3,20 bc	3,53 cd	5,47 a	5,67 a
10p	2,75 cde	2,51 g	4,87 b	5,36 a
25p	3,22 bc	3,31 cdef	2,73 d	3,0 bcdef
27j	5,41 a	5,45 a	2,71 d	2,72 ef
31j	3,04 cde	3,55 cd	4,25 c	3,27 bcde
32j	3,72 b	4,58 b	2,76 d	2,78 def
35j	2,6 e	2,86 fg	2,51 d	2,89 bcdef
36j	3,10 cde	3,21 def	2,77 d	2,64 f
39j	2,81 cde	3,18 def	2,65 d	2,79 cdef
50p	3,12 cd	3,83 c	2,65 d	3,21 bcde
51p	2,76 cde	3,47 cd	2,71 d	3,41 b
53p	2,69 de	2,92 efg	2,80 d	3,35 bc
54p	3,07 cde	3,25 def	5,05 ab	5,54 a
Média	3,18 C	3,50 A	3,30 B	3,52 A

DMS (5%) = 0,51 DMS(1%) = 0,57

* Médias seguidas de letras minúsculas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância, pelo Teste de Tukey.

** Médias seguidas por letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si ao nível de 1% de significância pelo Teste Tukey.

APÊNDICE 9 : Análise da variância do crescimento (%) em relação à testemunha, dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, desenvolvidos em meio de cultura com 100 ppm dos fungicidas flutolanil, fludioxonil, fluquinconazole, iminoctadine, imebendazole, fenbuconazole, cyprodinil, carbendazin, tricyclazole e pyremetanil*.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio
Fungicida (F)	9	1681,28**
Isolado (I)	16	275,76**
F x I	144	122,45**
Resíduo	340	8,71
C.V.(%)		10,99

* Dados transformados para Arco seno $\sqrt{x/103}$

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 10 - Análise de variância da nota e da incidência de lesões de antracnose em frutos de pimentão sob tratamento preventivo e curativo com os fungicidas benomyl, diniconazole, tebuconazole e triadimenol.

Causas da variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Incidência ¹	Nota ²
Blocos	3		
Tratamento	8	19114,67*	0,24**
Resíduo	24	133,32	0,03
C.V. (%)		19,82	13,17

¹ Dados transformados para Arco seno $\sqrt{x/100}$

² Dados transformados para Arco seno $\sqrt{x+0,5}$

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade.