

CLAUDIA APARECIDA GUGINSKI PIVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR  
DE *Colletotrichum* spp. E *Pestalotiopsis* spp. EM VIDEIRA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Ph.D. Amauri Bogo  
Coorientador: Dr. Leocir José Welter

**LAGES – SC**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Guginski Piva, Claudia Aparecida  
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. E *Pestalotiopsis*  
spp. EM VIDEIRA / Claudia Aparecida Guginski Piva. -  
Lages , 2017.  
110 p.

Orientador: Amauri Bogo  
Co-orientador: Leocir José Welter  
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Produção Vegetal, Lages, 2017.

1. *Vitis* spp.. 2. taxonomia. 3. antracnose. 4.  
mancha de pestalotia. I. Bogo, Amauri. II. Welter,  
Leocir José. , .III. Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Produção Vegetal. IV. Título.

CLAUDIA APARECIDA GUGINSKI PIVA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE  
*Colletotrichum* spp., E *Pestalotiopsis* spp. EM VIDEIRA

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção vegetal.

Banca Examinadora



Orientador:

Prof. PhD. Amauri Bogo  
Universidade do Estado de Santa Catarina

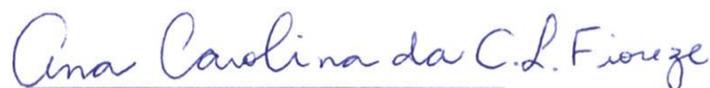
Membros:

Prof. Dr. Ricardo Trezzi Casa  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva  
Universidade do Estado de Santa Catarina



Prof. Dra. Neusa Steiner  
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dra. Ana Carolina da Costa Lara  
Fioreze  
Universidade Federal de Santa Catarina

## **DEDICO**

A meu esposo Jonatas e as minhas filhas,  
meus dois raios de sol, Maria e Sophia...meu  
amor infinito e eterno!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar força e perseverança nos momentos mais difíceis.

Ao prof. PhD Amauri Bogo, pelos ensinamentos e orientação deste trabalho;

Ao prof. Dr. Leocir José Welter, pela coorientação, pela disponibilidade em ensinar e ajudar, pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis;

Ao professor Dr. Rubens Onofre Nodari, pelas sugestões e apoio nas análises;

A UDESC, principalmente aos professores do programa de pós-graduação em produção vegetal, pelos conhecimentos repassados, mas também aos secretários, sempre atenciosos e as amizades feitas ao longo desses quatro anos;

A UFSC, campus Curitibanos e campus Florianópolis, onde este experimento foi realizado.

Aos laboratoristas e amigos da UFSC campus Curitibanos (Renata, Gabriel, Viviane, Jéssica, Beatriz, Anderson e Kelen) e campus Florianópolis (Gustavo, Luciano e Morgana), pelo companheirismo e pelo decisivo apoio nos trabalhos de laboratório;

A todos os amigos que me ajudaram nos momentos difíceis e me incentivaram a olhar sempre em frente;

A FAPESC pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto.

A Embrapa Uva e Vinho pela ajuda no financiamento do trabalho, especialmente a Dra. Patrícia.

Aos meus pais Elio e Pasquina e a minha irmã Cleusa, pelos bons exemplos, pelo incentivo constante e amor incondicional.

Principalmente ao meu amado esposo, pelo incentivo, pela ajuda, por nunca me deixar desistir, por cuidar da nossa filha, mesmo cansado, pra que eu tivesse mais tempo pra escrever. Seu amor e apoio foram fundamentais.

## RESUMO

A produção de uva sofre com diversos problemas de ordem fitossanitária, destacando-se como um dos mais importantes, a antracnose. Originalmente no Brasil, o agente causal da antracnose em videira é descrito como sendo o fungo *Elsinoe ampelina*. Em outros países a doença é também causada por diferentes espécies de *Colletotrichum*. A determinação das espécies dos patógenos associadas aos diversos tipos de sintomas é essencial para os programas de quarentena, de melhoramento genético de plantas, para o entendimento do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, da epidemiologia do patógeno e, conseqüentemente, o manejo e controle da doença. A classificação taxonômica de *E. ampelina* como agente causal de antracnose em videira por De Bary na Alemanha em 1874, sempre levou ao entendimento que todo sintoma e isolamento de esporos característicos eram considerados *E. ampelina*. Estudos recentes na Europa e Ásia associam espécies de *Colletotrichum* como agentes causais, podendo não ser o único associado aos sintomas de antracnose em videira, ou a possibilidade de mais de um agente causal ser responsáveis pela doença. Além disso, outro patógeno, *Pestalotiopsis* spp., foi recentemente associado a podridão em uva madura e também a manchas foliares tipo “antracnose”, contudo não há no Brasil relato desses dois patógenos, *Colletotrichum* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados ao sintoma de antracnose em videira. Os objetivos deste estudo foram identificar a possível ocorrência de mais de um gênero e/ou diferentes espécies de *Colletotrichum* associadas aos sintomas de antracnose e caracterizar a ocorrência de *Pestalotiopsis* em folhas, ramos e frutos de videira em diferentes regiões do Sul do Brasil. Isolados de folhas, pecíolos, caules e bagas de videira com sintomas visuais de antracnose de diferentes regiões produtoras dos estados do Sul do Brasil foram identificados e caracterizados de forma morfológica e molecular, sendo 52 como *C. acutatum* e 34 como *C. gloesporioides*. O sequenciamento da região genômica ITS e a grande diversidade morfológica sugerem que existam diferentes espécies dentro do complexo *Colletotrichum* spp. (*C. acutatum* e *C. gloesporioides*). Dentro do grande grupo de isolados, foram ainda identificados 41 isolados do fungo *Pestalotiopsis* spp. que através da análise multivariada de diferentes características morfológicas foram separados em cinco grupos os quais foram confirmados através do sequenciamento da região ITS, como sendo espécies diferentes de *Pestalotiopsis*, *Pestalotia* e *Neopestalotiopsis*. Testes de patogenicidade (Postulado de Kock), em folhas e bagas confirmaram que *C. acutatum* e *C. gloesporioides* estão associados como agentes causais da antracnose em videira e que *Pestalotiopsis* spp. está associada à mancha foliar e podridão de uva madura. Nenhum isolado foi identificado como sendo *E. ampelina*.

**Palavras-Chave:** *Vitis* spp., taxonomia, antracnose, mancha de pestalotia.

## ABSTRACT

The grape production suffers from several phytosanitary problems, mainly with to anthracnose. Originally in Brazil the causal agent of anthracnose on grapevine is described as *Elsinoe ampelina*. In other countries the disease is also caused by different species of *Colletotrichum*. The determination of the pathogen species associated with various types of symptoms is essential for quarantine programs, breeding programs, understanding of the cycle of pathogen-host relationships, pathogen epidemiology and, consequently the management and control of the disease. The taxonomic classification of *Elsinoe ampelina* as the causal agent of anthracnose on vines has always led to the understanding that all symptoms and isolation of characteristic spores were considered *E. ampelina*. Recent studies in Europe and Asia associate species of *Colletotrichum* as causative agents, and may not be the only one associated with the symptoms of anthracnose on the vine, or the possibility of more than one causal agent being responsible for the disease. In addition, another pathogen, *Pestalotiopsis* spp, has recently been associated with rot in mature grapes and also with anthracnose leaf spots. However, there are no reports of these two pathogens, *Colletotrichum* spp. and *Pestalotiopsis* spp. Associated with the anthracnose symptom on the vine. The objectives of this study were to identify the possible occurrence of more than one genus and/or different species of *Colletotrichum* associated with anthracnose symptoms and to characterize the occurrence of *Pestalotiopsis* in leaves, branches and grape fruits in different regions of southern Brazil. Leaf isolates, petioles, stems and grape berries with visual symptoms of anthracnose from different regions of Southern Brazil were identified and characterized morphologically and molecularly, being 54 such as *C. acutatum* and 32 as *C. gloesporioides*. The sequencing of the ITS genomic region and the great morphological diversity suggest that there are different species within the complexes *Colletotrichum* spp. (*C. acutatum* and *C. gloesporioides*). Within the large group of isolates, 41 isolates of the fungus *Pestalotiopsis* spp. The multivariate analysis of the morphological characteristics separated these isolates into five groups, which were confirmed by sequencing the ITS region, as different species of *Pestalotiopsis*, *Pestalotia* and the indicative of the presence of *Pseudopestalotiopsis*. Pathogenicity tests (Kock Postulate) in leaves and berries have confirmed that *C. acutatum* and *C. gloesporioides* are associated as causative agents of anthracnose on vines and that *Pestalotiopsis* spp. is associated with leaf spot and ripe grape rot. No isolates were identified as *E. ampelina*.

**Keywords:** *Vitis* spp., taxonomy, anthracnose, spot of pestalotia.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa ilustrativo dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com a distribuição geográfica dos isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, após análise dos dados. Números indicam os 23 municípios de coletas de folhas, pecíolos, ramos e bagas com sintomas de antracnose em videira, coletados nas safras 2013/14 e 2014/15.....34
- Figura 2 Planta de *Vitis spp.* apresentando os sintomas típicos da antracnose nas folhas, pecíolos e ramos (A) e baga (B).....35
- Figura 3 Dendograma de dissimilaridade genética de 54 isolados do complexo *Colletotrichum acutatum* originários de diversas regiões produtoras de uva dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, baseado nas características capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>), diâmetro final das colônias (DFC; mm), comprimento, largura e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia), utilizando o método de agrupamento UPGMA.....53
- Figura 4 Dendograma de dissimilaridade genética de 32 isolados do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* originários de diversas regiões produtoras de uva dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, baseado nas características capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>), diâmetro final das colônias (DFC; mm), comprimento, largura e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia), utilizando o método de agrupamento UPGMA.....55
- Figura 5 Dendograma gerado pelo método *Maximum Likelihood*, a partir do “software” MEGA 6.0. Os códigos à direita representam os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, sequenciados a partir do gene ITS e, os números entre os ramos representam a porcentagem de “bootstrap”.....60
- Figura 6 Dendograma gerado pelo método *Maximum Likelihood*, a partir do “software” MEGA 6.0. Os códigos à direita representam os isolados de *Colletotrichum acutatum* sequenciados a partir do gene ITS e, os números entre os ramos representam a porcentagem de “bootstrap”.....62
- Figura 7 Sintomas de antracnose em folhas de videira cultivar Niágara inoculadas com os isolados sequenciados do Grupo I e Grupo II após 14 dias de inoculação por aspersão. (A) *Colletotrichum acutatum* e (B) *C. gloeosporioides*.....63
- Figura 8 Mapa ilustrativo dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com a distribuição geográfica dos 21 municípios onde foi coletado folhas, ramos e bagas sintomáticos de videira .....68
- Figura 9 Dendograma de dissimilaridade genética de 41 isolados de *Pestalotiopsis spp.* originários de diversas regiões produtoras de uva dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, baseado no diâmetro final das colônias (DFC), comprimento, largura de esporos, número e tamanho de apêndices apicais, utilizando o método de agrupamento UPGMA.....77

Figura 10 Morfologia dos conídios, com aumento de 400 x, dos cinco grupos formados a partir da análise de agrupamento das características de colônia e morfologia dos conídios dos 41 isolados de *Pestalotiopsis* spp. obtidos de diferentes tecidos (folhas, pecíolos, ramos e bagas) de videira, coletados em 21 municípios da região Sul do Brasil.....78

Figura 11 Dendograma gerado pelo método *Maximum Likelihood*, a partir do “software” MEGA 6.0. Os códigos à direita representam os isolados de tipo *Pestalotiopsis*, sequenciados a partir do gene ITS e, os números entre os ramos representam a porcentagem de “bootstrap” .....82

Figura 12 Sintomas em folhas por ocorrência natural (A) e inoculação em folha destacada (B), frutos com micélios do fungo 4 dias após a inoculação (C) e frutos com apresentando podridão 7 dias após a inoculação (D) de *Pestalotiopsis* sp. ....83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição dos iniciadores utilizados para amplificar de forma específica, via PCR, o DNA de quatro espécies causadoras de antracnose.....	39
Tabela 2 Identificação dos isolados obtidos de sintomas de antracnose em videira, parte da planta de onde o tecido infectado foi coletado, localidade de procedência e data de coleta. Separados em dois grupos ( <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> ), de acordo com a análise molecular.....	42
Tabela 3 Comparação das sequências nucleotídicas das regiões ITS e GAPDH, de isolados obtidos de lesões de antracnose em videira, com sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website).....	45
Tabela 4 Capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$ conídios.mL <sup>-1</sup> ) após sete dias, diâmetro final das colônias (DFC; mm) sete dias após a repicagem (mm), comprimento e largura ( $\mu$ m) dos conídios, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia) de isolados do complexo <i>Colletotrichum acutatu</i> , em meio de cultura BDA, obtidos de plantas de videira com sintomas típicos de antracnose.....	47
Tabela 5 Capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$ conídios.mL <sup>-1</sup> ) após sete dias, diâmetro final das colônias (DFC) sete dias após a repicagem (DFC; mm), comprimento e largura ( $\mu$ m) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia) de isolados do complexo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , em meio de cultura BDA, obtidos de plantas de videira com sintomas típicos de antracnose.....	50
Tabela 6 Características morfológicas das colônias dos complexos <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> isolados de plantas de videira com sintomas de antracnose.....	56
Tabela 7 Comparação das sequências nucleotídicas das regiões ITS e CAL, de isolados obtidos de lesões de antracnose em videira, com sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI ( <i>National Center for Biotechnology Information website</i> ).....	58
Tabela 8 Identificação dos isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp., parte da planta de onde foi isolado, o local e a data de coleta.....	73
Tabela 9 Número e tamanho de apêndices apicais, comprimento e largura dos conídios, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro final das colônias sete dias após a repicagem (DFC; mm) de isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. obtidos de diferentes tecidos de videira com sintomas de antracnose, coletados em 21 municípios da região Sul do Brasil.....	75
Tabela 10 Isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. sequenciados e comparados com sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI ( <i>National Center for Biotechnology Information website</i> ).....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	A CULTURA DA VIDEIRA.....	15
2.2	ANTRACNOSE DA VIDEIRA .....	17
2.2.1	<i>Pestalotia</i> e/ou <i>Pestalotiopsis</i> da videira .....	20
2.2.2	<i>Sphaceloma</i> / <i>Elsinoe</i> .....	21
2.2.3	<i>Glomerella</i> / <i>Colletotrichum</i> .....	23
2.3	<i>Pestalotia</i> / <i>Pestalotiopsis</i> .....	28
<b>3</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. COMO AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSE EM VIDEIRA</b> .....	32
3.1	RESUMO.....	32
3.2	INTRODUÇÃO .....	33
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.3.1	Obtenção de isolados .....	35
3.3.2	Caracterização morfológica dos isolados de antracnose.....	37
3.3.3	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) .....	38
3.3.4	Diâmetro final da colônia (DFC) .....	38
3.3.5	Produção de esporos .....	38
3.3.6	Dimensão dos conídios .....	38
3.3.7	Análise estatística.....	39
3.3.8	Características das colônias .....	39
3.3.9	Extração e quantificação do DNA .....	39
3.3.10	Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	40
3.3.11	Sequenciamento .....	41
3.3.12	Teste de patogenicidade .....	43
<b>3.4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
3.4.1	Identificação dos isolados .....	43
3.4.2	Caracterização molecular dos isolados .....	48

3.4.3	Caracterização de culturas e morfologia dos isolados .....	49
3.4.4	Sequenciamento .....	60
3.5	CONCLUSÕES .....	66
4.	<b><i>Pestalotiopsis</i> spp. EM LESÕES NECRÓTICAS DE FOLHAS, RAMOS E BAGAS DE VIDEIRA NO SUL DO BRASIL .....</b>	<b>67</b>
4.1	RESUMO.....	67
4.2	INTRODUÇÃO .....	68
4.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	69
4.3.1	Obtenção dos isolados.....	69
4.3.2	Análise estatística.....	71
4.3.3	Extração do DNA genômico .....	72
4.3.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	73
4.3.5	Sequenciamento .....	73
4.3.6	Teste de patogenicidade .....	74
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4.5	CONCLUSÕES .....	88
5.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>89</b>
6.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>
	APÊNDICES.....	105

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A viticultura é uma atividade de grande importância econômica e social no mundo, sendo a uva a terceira fruta mais produzida, totalizando a produção (para processamento e mesa) de 67 milhões de toneladas por ano (FAO, 2014). A cultura da videira (*Vitis* spp.) exerce um papel importante também no contexto da fruticultura brasileira, ocupando atualmente uma área de 79.094 hectares, com vinhedos desde o extremo Sul do país até regiões próximas à Linha do Equador, com produção de aproximadamente 1,5 milhões de toneladas em 2015, sendo que a Região Sul contribui com 66 % dessa produção (IBGE, 2016). A viticultura contribui ainda para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil e tem se tornado, nos últimos anos, importante na geração de empregos em grandes empreendimentos que produzem uvas de mesa e uvas para processamento (MELLO, 2015). Um dos grandes entraves à produção é a ocorrência de doenças fúngicas.

Dentre as várias doenças que afetam a cultura, a antracnose é uma das mais importantes, causando danos em anos com elevada precipitação, alta umidade relativa (acima de 80%) e longos períodos de molhamento foliar e de frutos. Em alguns anos a antracnose pode ser severa a ponto de comprometer não só a produção do ano como também as produções futuras (SÔNEGO, 2000).

Inicialmente, um levantamento de isolados obtidos de sintomas de antracnose em videira em áreas produtoras dos estados do Sul do Brasil foi realizado com o objetivo de identificar a variabilidade genética de isolados de *Elsinoe ampelina* (de Bary) Scheer para o processo de melhoramento de variedades de um banco de germoplasma ativo. Porém, após análise morfológica e molecular deste grupo de 8 isolados, foi observado que a suposta *E. ampelina* não se encontrava entre os isolados do grupo, iniciando-se assim, uma nova linha de pesquisa.

O agente causal da antracnose da videira no Brasil é classificado como *Sphaceloma ampelinum* de Bary (= *Gloeosporium ampelophagum* (Pass) Sacc.), forma assexuada de *E. ampelina* (SÔNEGO e GARRIDO, 2003; AMORIM e KUNIYUKI, 2005; NAVES et al., 2006), provavelmente por ser o mesmo agente causal dessa doença em diversos países (ELLIS e ERINCIK, 2008; POOLSAWAT et al., 2009, JANG et al., 2011; LOUIME et al., 2011). Contudo, estudos recentes na Índia e China associam também espécies de *Colletotrichum*, tais como *C. gloeosporoides* (Penz.) Sacc., *C.*

*acutatum* Simmonds (CHOWDAPPA et al., 2009; YAN et al., 2014) e *C. capsici* Sydow. (SAWANT et al., 2012(b)) como agentes causais da antracnose na videira.

Com a possibilidade de associação do gênero *Colletotrichum* ao agente causal da antracnose da videira, um estudo mais amplo foi necessário, pois acontecimentos e dados adicionais permitiram que outro Gênero de fungo associado a lesões em videira tipo fosse identificado como *Pestalotiopsis* spp, corroborando com informações recentes do Dr. Ricardo Trezzi Casa (citação pessoal), que isolou *Pestalotiopsis* spp. de folhas, bagas e hastes de uva no Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages/SC.

No Brasil ainda não se tem relatos de *Pestalotiopsis* spp. como agente causal da doença na cultura da videira. No entanto, estudos realizados em países como Austrália (CASTILLO-PANDO et al., 2001; SERGEEVA et al., 2005), Estados Unidos da América (URBEZ-TORRES et al., 2009) e recentemente na Coréia do Sul (DENG et al., 2013), identificaram várias espécies de *Pestalotiopsis* através de comparação morfológica e molecular e testes de patogenicidade associado à podridão em bagas de videira.

A identificação de agentes patogênicos a um determinado hospedeiro é fundamental para o estudo da epidemiologia da doença, do desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, bem como no programa de melhoramento genético. No Brasil existem poucos estudos referentes à caracterização de isolados do agente causal da antracnose em videira, e estes, em geral, citam *E. ampelina* como o agente causal principal da doença e para *Pestalotiopsis* spp., os estudos descrevem o fungo na cultura da videira apenas como saprofítico.

Os objetivos deste estudo foram: 1) identificar e caracterizar a possível ocorrência de mais de um gênero (*Colletotrichum* spp. e *Pestalotiopsis* spp.) e/ou diferentes espécies (*C. acutatum* e *C. gloeoporioides*) associadas aos sintomas de antracnose da videira e 2) caracterizar a ocorrência de *Pestalotiopsis* em folhas, ramos e frutos de diferentes regiões do Sul do Brasil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A CULTURA DA VIDEIRA

A videira, pertencente à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, é uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem (ALVARENGA et al., 1998). A viticultura é uma atividade de grande importância econômica e social no mundo, sendo a uva, a terceira fruta mais produzida, com produção mundial (processamento e mesa) de 67 milhões de toneladas por ano (FAO, 2014).

No Brasil, a viticultura iniciou-se com a chegada dos colonizadores portugueses, mas tornou-se atividade comercial apenas no início do século XX, com predomínio de cultivares americanas (*V. labrusca* L.). Em meados do século XX, iniciou-se o plantio comercial de videiras europeias (*V. vinifera* L.). As regiões Sul e Sudeste foram os principais polos de produção até a década de 1960. Com a utilização de novas técnicas de produção, a uva foi difundida como alternativa econômica em diversas regiões tropicais do País e ganhou nova dimensão nas zonas temperadas de cultivo (CAMARGO, TONIETTO e HOFFMANN, 2011).

A produção anual brasileira varia entre 1,3 e 1,4 milhões de toneladas, com área de aproximadamente 79.094 hectares (IBGE, 2016). Há uma grande variabilidade no material genético utilizado, sendo que mais de 120 cultivares de *Vitis vinifera* L. e mais de 40 cultivares de uvas americanas, incluindo castas de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* Munson e de cultivares híbridas interespecíficas são cultivadas (CAMARGO, TONIETTO e HOFFMANN, 2011).

A cultura está difundida desde o Rio Grande do Sul até o Rio Grande do Norte e Ceará. Destaca-se no Norte do país a região do Vale do São Francisco, única região no mundo que produz duas safras e meia por ano. A variação de altitude também é grande, havendo considerável diversidade ambiental entre as zonas de produção, incluindo regiões de clima temperado, subtropical e tropical (CAMARGO, TONIETTO e HOFFMANN, 2011).

Atualmente a viticultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil. Nos últimos anos, também tornou-se importante na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento, sendo que os três estados do sul do país destacam-se como os principais produtores nacionais (MELLO, 2015).

O sul do Brasil se destaca também pela produção de vinhos finos, a exemplo do estado de Santa Catarina, onde a vitivinicultura sofreu um grande impulso na última década. Estudos realizados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI) demonstraram que a região de altitude de Santa Catarina (acima de 900 m) é uma das melhores regiões do Brasil para a produção de vinhos finos e espumantes. Nestas regiões, o clima oferece as condições ideais para uma maturação fenólica mais longa e completa das uvas, proporcionando a produção de vinhos de excelente qualidade. Tais características permitiram que inúmeras vinícolas se instalassem na região e produzissem vinhos de excelente qualidade, premiados nacional e internacionalmente.

No entanto, estas regiões apresentam algumas características climáticas, como a elevada precipitação pluviométrica (acima de 1600 mm/ano), que favorece o desenvolvimento de muitas doenças, especialmente as fúngicas, que se constituem num dos principais entraves para a sustentabilidade da produção e qualidade da uva. Na região Sul do Brasil destacam-se entre as principais doenças fúngicas foliares a antracnose (*Sphaceloma ampelinum* de Bary (= *Gloeosporium ampelophagum* (Pass) Sacc.), forma assexuada de *Elsinoe ampelina* (de Bary) Schear) e o míldio (*Plasmopara viticola* Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni), podendo causar sérios prejuízos em épocas do ano e regiões com precipitação pluviométrica elevada e, eventualmente, em verões com baixa umidade relativa, o oídio (*Uncinula necator* Schwein. Burrill). As doenças fúngicas, além de afetar a qualidade da uva, podem representar grande parte do custo de produção, sendo que em regiões onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento dessas doenças, os tratamentos fitossanitários podem atingir 30% do custo de produção (SÔNEGO e GARRIDO, 2005).

Uma das alternativas mais eficientes para o controle dessas doenças é a utilização de variedades resistentes. As diversas espécies do gênero *Vitis* reagem de forma distinta a fungos fitopatogênicos. Em geral, as cultivares de *V. vinifera* são bastante suscetíveis a patógenos e pragas. Por outro lado, as videiras americanas, asiáticas e híbridas interespecíficas podem ser tolerantes ou mesmo resistentes a patógenos (OLIVEIRA et al., 2005). Contudo, o conhecimento do agente causal, bem como da diversidade e variabilidade genética destes é fundamental para a seleção de material genético adequado.

## 2.2 ANTRACNOSE DA VIDEIRA

A antracnose é uma doença destrutiva que afeta vários cultivares de uva. As folhas infectadas caem prematuramente e as epidemias resultam perda de toda a produção. É uma das principais doenças fúngicas da videira em regiões úmidas. Devido ao sintoma característico nas bagas, esta doença é conhecida também por “olho de passarinho”, varíola, varola, carvão e negrão (SOUZA e PINHEIRO, 1996; AMORIM e KUNIYUKI, 2005).

A doença é responsável por ocasionar danos severos na produção, reduzindo significativamente a qualidade e quantidade de frutos em variedades suscetíveis. Quando a severidade da doença é alta, o vigor da planta também é afetado e pode comprometer a safra do ano e as safras futuras (AMORIM e KUNIYUKI, 2005; SÔNEGO et al., 2005; NAVES et al., 2006).

Historicamente, a doença causou sérias perdas nas culturas na Austrália, e epidemias foram relatadas na Nova Zelândia, Índia, China, Japão, Coreia, África do Sul, América do Sul, Estados Unidos e, mais recentemente, Canadá. Embora todas as cultivares do gênero *Vitis* sejam mais ou menos susceptíveis a antracnose, as da espécie vinífera são geralmente altamente susceptíveis (CARISSE e LEFEBVRE, 2011).

Chuvas fortes e temperaturas entre 24°C a 26°C são ideais para o desenvolvimento e propagação do patógeno. Uma vez que o patógeno é estabelecido, corpos frutíferos assexuados, acérvulos, são formados nos tecidos doentes. Estes acérvulos produzem conídios em presença de umidade, os quais são a fonte secundária de inóculo e são responsáveis pela disseminação contínua do fungo ao longo da estação de crescimento (ELLIS e ERINCIK, 2016).

Um dos fatores que pode agravar a ocorrência de antracnose é quando o período de infecção ocorre no início das primeiras brotações, devido a maior suscetibilidade dos órgãos jovens da videira. Isso ocorre devido à maior concentração de ácido tartárico quando comparado com órgãos mais velhos, já que o desenvolvimento do fungo é favorecido pelos ácidos orgânicos (málico, tartárico e cítrico) (OLMOS, 1983).

A infecção pode ocorrer numa grande amplitude térmica, desde que associada, a primaveras chuvosas, nevoeiros ou cerrações, umidade relativa superior a 90 % e ventos frios (AMORIM e KUNIYUKI, 2005; BOTELHO et al., 2009).

O fungo coloniza desde folhas, gavinhas e ramos até inflorescências e frutos, contudo, lesões nos frutos e ramos novos são os mais comuns. Em brotos, primeiramente

aparecem numerosas manchas pequenas, circulares e avermelhadas e com o desenvolvimento da doença as lesões tornam-se mais fundas, com centro cinza e bordas arredondadas ou angulares. Inicialmente formam-se, nas folhas, manchas circulares castanho escuras e levemente deprimidas que necrosam posteriormente. As folhas jovens são mais suscetíveis à infecção do que as folhas mais velhas. Quando as nervuras são afetadas, especialmente nas folhas jovens, ocorre desenvolvimento desuniforme dos tecidos, causando a deformação da folha. As lesões podem cobrir toda a lâmina foliar ou aparecer principalmente ao longo das nervuras (AMORIM e KUNIYUKI, 2005; ELLIS e ERINCIK, 2008).

Nas bagas, formam-se pequenas manchas circulares avermelhadas que aumentam para um diâmetro médio de 60 mm e podem ficar ligeiramente deprimidas. No centro as lesões ficam cinza esbranquiçadas e são rodeadas por uma borda marrom avermelhada a negro, que assemelha-se a um olho de passarinho. Eventualmente desenvolvem-se acérvulos. Com período prolongado de umidade forma-se uma massa rosada de conídios (NAVES et al., 2006; ELLIS e ERINCIK, 2008).

O controle químico da antracnose deve ser realizado desde o início da brotação, uma vez que os tecidos tenros aliados a alta umidade favorecem a infecção (SÔNIGO, 2000). Após estabelecida no pomar a antracnose é de difícil controle, assim, devem ser adotadas medidas preventivas, como escolha do local adequado de plantio, uso de material de propagação sadio, adubação equilibrada e a eliminação de plantas ou partes vegetais doentes (NAVES et al., 2006).

A doença atinge variedades européias, americanas e híbridas, inclusive porta-enxertos. Aliado a isso, a antracnose pode causar perdas elevadas, com até 50% de dano de safra em uma temporada. Portanto, o uso de produtos químicos geralmente é necessário para permitir a proteção suficiente do vinhedo. As características varietais associadas às condições climáticas locais determinam o número de tratamentos necessários para o controle do fungo (NAVES et al., 2006).

Em anos chuvosos, aplicações semanais de fungicidas são necessárias para o controle de antracnose. Sendo assim, o cultivo de videira na mesorregião serrana de Santa Catarina, bem como em todo o Sul do Brasil, somente é possível por meio de aplicações massivas de fungicidas. O uso excessivo destes produtos, além de aumentar o custo de produção e o *input* energético necessário ao cultivo das videiras, oferece também uma série de riscos à saúde humana e ao meio ambiente, comprometendo a competitividade e a sustentabilidade da vitivinicultura catarinense e brasileira. As mudanças climáticas

previstas podem aumentar ainda mais a pressão desta doença sobre o cultivo das videiras, resultando no uso ainda mais intensivo de fungicidas.

Em todo o mundo, o fungo *Sphaceloma ampelinum* é relatado como o agente causal da antracnose em videira (SÔNEGO e GARRIDO, 2003; NAVES et al., 2006; ELLIS e ERINCIK, 2008; POOLSAWAT et al., 2009, JANG et al., 2011; LOUIME et al., 2011). Contudo, outro fungo, *C. gloeosporioides*, foi também descrito como agente causal da antracnose da uva (PORWAL e SHARMA, 1974; KUMAR et al., 1994). Esses autores observaram que o patógeno é mais frequentemente isolado durante as estações chuvosas.

Recentemente, na Índia pesquisadores identificaram *C. gloeosporioides* e *C. capsici* associados à lesões de antracnose em videira. Trezentos e oitenta e dois isolados representando diferentes áreas geográficas, cultivares e partes das plantas foram isolados, purificados e identificados por características morfológicas e moleculares e destes, 363 foram identificados como *C. gloeosporioides* e 14 como *C. capsici* (SAWANT et al., 2012(a)).

Várias espécies de complexo acutatum (*C. acutatum*, *C. godetiae* e *C. fioriniae*) foram relatadas causando doenças na videira na Austrália, Itália, Portugal e Reino Unido (DAMM et al., 2012a).

Yan et al. (2015) estudaram a diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose em videira na China e, segundo esse autores, a antracnose da uva ou a podridão da uva madura é uma das doenças mais graves na viticultura. A antracnose da uva pode também ser causada por *Elsinoe ampelina*, mas os sintomas diferem dos causados por *Colletotrichum*, sendo que este induz lesões necróticas com borda encharcada, enquanto *Elsinoe* induz lesões com centros cinza circundada por estreitas margens avermelhadas a pretas (ELLIS e ERINCIK, 2008).

No Brasil são poucos os trabalhos realizados com antracnose em videira, especialmente se tratando de identificação, etiologia ou mesmo epidemiologia da doença, e em todos eles descrevem *E. ampelina* como agente causal.

Durante o processo de coleta, isolamento e identificação de isolados obtidos de lesões típicas de antracnose em Curitiba-SC, foi identificado morfológicamente apenas *Colletotrichum* spp., e não o suposto agente causal da antracnose, *E. ampelina*. Baseado nestes achados e fundamentado cientificamente em estudos recentes realizados em outros países, como o realizado por Sawant et al. (2012(a; b)), novas coletas e estudos foram realizados, levantando a hipótese de que também no Brasil, a exemplo do que

ocorre na Índia e em outros países, *Colletotrichum* spp. está associado a antracnose da videira (PIVA et al., em preparação).

### 2.2.1 *Pestalotia* e/ou *Pestalotiopsis* da videira

Os primeiros relatos de fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* em videira descritos como patogênicos foram realizados por Mundkur e Thirumalachar (1946) que descreveram *Pestalotiopsis menezesiana* causando severa desfolha de videiras e podridão de bagas na Índia e por Guba (1961), que descreveram esse patógeno em videira nos EUA (Arkansas, Missouri e Texas), incluindo um relato de ocorrência no Brasil.

Vários outros trabalhos comprovaram a patogenicidade desse fungo em videira causando morte das plantas na Austrália e causando a podridão de frutos na Itália, Japão e Coreia (XU et al., 1999; SERGEEVA et al., 2005; URBEZ-TORRES et al., 2009, URBEZ-TORRES et al., 2012; DENG et al., 2013). *Pestalotiopsis uvicola* (Speg.) foi relatado em várias espécies de *Vitis* spp., incluindo *V. vinifera* e *V. indusa* na Austrália, Brasil, Europa, Itália, Japão e os Estados Unidos (GUBA 1961, SERGEEVA et al., 2005, URBEZ-TORRES et al., 2009, URBEZ-TORRES et al., 2012). Estudos recentes na Austrália e EUA confirmam que os fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* ocorreram não apenas em ramos, bagas e flores, mas também no caule (CASTILLO-PANDO et al., 2001; SERGEEVA et al., 2001; URBEZ-TORRES et al., 2012; DENG et al., 2013). Fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* foram predominantemente isolados a partir dos cancos de videiras em Arkansas e Missouri (URBEZ-TORRES et al., 2009), e o segundo fungo mais comumente isolado de cancos de videira no Texas (URBEZ-TORRES et al., 2012).

Observa-se que nos últimos anos houve um número maior de trabalhos demonstrando que estes fungos podem causar prejuízos econômicos, tanto em folhas e ramos, como em frutos. Deng et al. (2013) identificaram espécies de *Pestalotiopsis* causando podridão em bagas na Coreia do Sul. Uma cultivar de uva de mesa, 'Cheongsoo', uma das oito cultivares lançadas pelo programa de melhoramento genético que começou no início dos anos 1960, apresentou severa podridão pós-colheita. Os sintomas iniciais da doença foram de podridão e ocorreram principalmente na ligação de ruptura entre o pedúnculo e a baga e em feridas sobre o fruto. Jayawardena et al. (2016) descreveram o primeiro relato de espécies de *Neopestalotiopsis* spp. associadas a uma podridão pós-colheita e a doença do tronco de videira na China. Os autores relataram uma

nova espécie, *Neopestalotiopsis vitis*, isolado da mancha da folha de uva que, inicialmente foram observadas pequenas manchas circulares, ligeiramente afundadas, necróticas, desenvolvidas na superfície foliar, principalmente nas regiões internervais. As manchas aumentaram rapidamente tornando-se irregulares e necróticas.

Até o presente estudo não há referências na literatura científica da ocorrência de *Pestalotia* e/ou *Pestalotiopsis* como agente causal de doenças na viticultura brasileira. No entanto, além dos relatos científicos descritos anteriormente, que identificaram *Pestalotia* e/ou *Pestalotiopsis* causando lesões em folhas e frutos de videira, outros dois eventos estimularam os estudos apresentados nesta tese: 1) Folhas de videira apresentando lesões, foram levadas para diagnose, ao laboratório de fitopatologia de UDESC –CAV, e sob orientação do prof. Dr, Ricardo Casa, foi isolado como agente causal fungos do tipo *Pestalotia* ou *Pestalotiopsis*; 2) Nos isolamentos realizados a partir de lesões características de antracnose, foi muito frequente a obtenção de colônias com características típicas de *Pestalotia* ou *Pestalotiopsis*. Baseado nestas duas evidências, levantamos a hipótese de que diferentes espécies de *Pestalotia* e/ou *Pestalotiopsis* também causam doenças na videira no Brasil, e também estão associadas aos sintomas da antracnose.

### 2.2.2 *Sphaceloma/Elsinoe*

*Sphaceloma ampelinum* pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Dothideomycetes*, ordem *Myriangiales*, família *Elsinoaceae* e gênero *Elsinoe*, *Elsinoe ampelina* (de Bary) Schear, forma sexuada *Sphaceloma ampelinum* de Bary (= *Gloeosporium ampelophagum* (Pass) Sacc.). Plínio foi o primeiro a referir esta doença na Itália no primeiro século da Era Cristã. De Bary descreveu esta doença na Alemanha em 1874 e Burrill em 1886 na região central de Illinois, Indiana nos EUA. Na Rodésia (Zimbabué atual) foi relatada como a doença mais destrutiva, resultando em perda total do cultivo da uva. Da mesma forma, grandes perdas foram relatadas em 1929 na Argentina. Jenkins e Bittencourt (1943) em uma revisão da história da antracnose da videira relataram que a doença atraiu a atenção de viticultores no Brasil, Argentina, Paraguai, Chile e Uruguai, já em 1880-1890.

A forma conidial do patógeno foi descrita por De Bary (1874) e denominada como *Sphaceloma ampelinum* de Bary. A maioria dos estudos iniciais deste patógeno foram

realizados por Viala e Pacottet (1906), na França, que estabeleceram a natureza polimórfica do patógeno e o nomearam como *Manginia ampelina* Viala e Pacottet. Brown (1922) relatou o isolamento de uma espécie de *Gloeosporium* em uva, mas não o caracterizou.

O nome *Gloeosporium ampelophagum* (Pass) Sacc. foi mantido para o estado imperfeito do patógeno até a descoberta do estado perfeito por Shear em 1929, que o chamou como *E. ampelina* (de Bary) Shear. O estado perfeito foi encontrado em cancras do ano anterior e em ramos podados, que haviam sido deixados no chão. Esses cancras produzem ascocarpos pequenos, negros e discretos, os quais continham ascas globulares e cada asca continha ascósporos hialinos, triseptados com 4-5 x 15-16 µm de tamanho.

Os conídios de *S. ampelinum* são unicelulares, hialinos, oblongos a ovóides, pequenos (3-6 x 2-8 µm), formados sobre conidióforos curtos e cilíndricos, em acérvulos, sobre uma base estromática (CONO et al., 2009). Outro tipo de esporo, chamado ascósporos, é produzido dentro dos corpos frutíferos sexuais e pode também formar em ramos infectados e bagas deixadas no chão no ano anterior. Contudo, a importância dos ascósporos no desenvolvimento da doença não é claramente compreendida (ELLIS e ERINCIK, 2008). Ainda não foi relatado no Brasil a ocorrência de ascocarpos e ascósporos (NAVES et al., 2006).

Em condições artificiais, colônias de *E. ampelina* crescem lentamente e raramente esporulam (MORTENSEN, 1981). A dificuldade na preparação de suspensões de conídios da cultura pura faz com que seja difícil avaliar a resistência de cultivares de videira à antracnose (CONO et al., 2009).

Os conídios são a fonte mais importante de inóculo primário da doença. No início da brotação, com presença de água livre da chuva ou do orvalho, os conídios germinam e infectam os tecidos jovens. Os conídios, sob temperaturas de 2°C a até 32°C, germinam e infectam o hospedeiro, sendo o ótimo de temperatura para desenvolvimento do patógeno é de 24 a 26°C. Há necessidade de no mínimo 12 horas de água sobre o tecido vegetal para que ocorra a infecção do patógeno na planta (AMORIM e KUNIYUKI, 2005; BOTELHO et al., 2009). A produção de conídios ocorre 14 dias depois da infecção com a temperatura de 12°C, e, depois de 5 dias na temperatura de 21 °C (BROOK, 1973).

O progresso da doença ocorre na fase de crescimento vegetativo da planta, quando há formação de conídios, favorecido por alta umidade (AMORIM e KUNIYUKI, 2005). A fase assexuada pode sobreviver de um ano para o outro, tanto em lesões dos sarmentos e gavinhas, como em restos culturais no solo. Em condições de alta umidade os

conidióforos produzem abundantes esporos (conídios). As novas infecções ocorrem pela disseminação dos conídios, através da ação dos respingos da água de orvalho ou da chuva e do vento (NAVES et al., 2006; ELLIS e ERINCIK, 2008).

### 2.2.3 *Glomerella/Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* encontra-se na divisão *Deuteromycota*, classificado como fungo verdadeiro e com cerca de 900 espécies atualmente descritas (SUTTON, 1992). Engloba os fungos imperfeitos pertencentes à ordem *Melanconiales* da classe *Coelomycetes*, os quais apresentam uma associação teleomórfica com estirpes homotáticas ou heterotáticas de ascomicetos do gênero *Glomerella* (BAXTER et al., 1983; SKIPP et al., 1995). Os fungos filamentosos deste gênero e sua forma perfeita *Glomerella* são considerados os maiores patógenos de plantas em todo o mundo, causando danos econômicos significativos em culturas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FREEMAN et al., 1998). Esse gênero, que possui várias espécies fitopatogênicas, foi descrito por Corda como *Colletotrichum lineola* em 1837 na República Checa e a doença denominada de antracnose (VON ARX, 1957; MENEZES, 2002).

Segundo Von Arx (1957), foi Stoneman que em 1898 encontrou a forma ascógena em antracnose provocada por espécies de *Gloeosporium*, e as colocou em um novo gênero, ao qual chamou de *Gnomoniopsis*. Porém, esse nome já havia sido ocupado com outro fungo descrito por Berlese (1892). Então, em 1903, Von Schrenk e Spaulding mudaram a classificação para *Glomerella*, contendo cinco espécies.

Cinquenta novos táxons a nível de espécies ou abaixo foram descritos entre 1880 e 1900 e esta tendência de reconhecimento de novas espécies acelerou no início do século XX com o desenvolvimento das ferramentas moleculares e genéticas. Von Arx realizou seu primeiro trabalho sobre *Colletotrichum* em 1957 e já existiam cerca de 750 nomes. Esta explosão, que poderia agora ser atividade taxonômica em grande parte fútil, foi impulsionada pela hipótese acrítica de que as espécies de *Colletotrichum* eram específicas do hospedeiro. O resultado foi que, em muitos casos, um novo táxon foi erguido cada vez que uma infecção causada por *Colletotrichum* era descoberto em um gênero de plantas para o qual nenhuma doença tinha sido relatado anteriormente, mesmo na ausência de caracteres morfológicos para o diagnóstico (CANNON et al., 2012)

A monografia de Von Arx (1957) baseou-se principalmente em caracteres morfológicos, com pouca ou nenhuma ênfase colocada na patologia, levando à diminuição em espécies aceitas de cerca de 750 para 11 (VON ARX 1957; DAMM et al., 2012a). No entanto, este trabalho foi a base para todos os trabalhos taxonômicos e morfológicos subsequente sobre o gênero *Colletotrichum*.

Importantes contribuições foram feitas por Simmonds (1965) quando da identificação da espécie *C. acutatum* e por Sutton (1966 e 1968) sobre a taxonomia do complexo de *C. graminicola* e a importância da morfologia paramétrica na classificação.

Sutton (1992) reorganizou o gênero, incluindo as espécies do gênero *Colletotrichum* no gênero *Vermicularia*. Mais tarde, o gênero foi reorganizado sob vários nomes, sendo os mais comumente empregados: *Di cladium*, *Ellisieola*, *Vermicularia*, *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. Esses e outros nomes foram usados de maneira desordenada durante os séculos XIX e XX para várias espécies que hoje se encontram incluídas no gênero *Colletotrichum* (SOUSA, 2004).

Recentemente, Hyde et al. (2009), listaram 66 espécies de *Colletotrichum* que são comumente utilizados, e 19 espécies que são consideradas duvidosas. Este trabalho foi o primeiro abrangente do gênero em 17 anos, e foi o primeiro a descrever espécies de *Colletotrichum* incorporando dados gerados através de análise de DNA e sistemática filogenética. Em outro trabalho, também com identificação de espécies, Cannon et al. (2012), usando análise multilocus, avaliaram 119 espécies de *Colletotrichum* e obtiveram nove grandes clados e vários outros pequenos grupos de espécies isoladas.

Atualmente, muitos estudos estão focados na epitipificação, identificando as variações morfológicas e moleculares de *Colletotrichum* em todo o mundo (WEIR et al., 2012; DAMM et al., 2012a; CANNON et al., 2012; PENG et al. 2012; DOYLE et al., 2013; GUNJAN et al., 2013; HYDE et al., 2014).

O gênero *Colletotrichum* pode apresentar nutrição biotrófica ou necrotrófica e desenvolve uma série de estruturas especializadas de infecção, tais como: tubos germinativos, apressórios, grampo de penetração, vesículas infecciosas, hifas primárias e secundárias. As etapas de formação destas estruturas são marcadas pela produção de metabólitos específicos, que podem atuar como fatores de patogenicidade. A penetração do tecido é favorecida pela ação de enzimas pectinolíticas, excretadas no tecido do hospedeiro e pela força mecânica exercida pelo apressório no grampo de penetração (MACIEL et al., 2010).

Apresenta acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforo simples e alongado, conídios hialinos unicelulares que podem ser ovalados ou oblongos. Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz provavelmente protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2002).

A espécie *C. gloeosporioides* é considerada a mais disseminada, heterogênea e importante, principalmente nos trópicos. Seus conídios são hialinos e unicelulares produzidos no interior de acérvulos subepidérmicos dispostos em círculos (SUTTON, 1992; VON ARX, 1957, GUNNEL; GUBLER, 1992), geralmente formados em conjuntos de coloração salmão, retos e cilíndricos, com ápices obtusos e bases às vezes truncadas, medindo 12- 17 µm de comprimento por 3,5-6,0 µm de largura (MENEZES, 2002). Em meio de cultura, *Colletotrichum* forma colônias variáveis, de coloração branco-gelo a cinza escuro, com quantidade variável de micélio aéreo. É variável também a produção de estruturas reprodutivas em meio de cultura (SUTTON, 1992).

Outra espécie que apresenta grande importância dentro deste gênero é *C. acutatum*. Essa espécie apresentam conídios, geralmente, elipsóides e fusiformes, pelo menos em uma extremidade, ao invés de ambas as extremidades arredondadas como ocorre normalmente em *C. gloeosporioides* (ADASKAVEG e FORSTER, 2000). A principal produção de conídios está nos acérvulos, no entanto, também é capaz de formar conídios secundários na superfície do hospedeiro (LEANDRO et al., 2001). *Colletotrichum acutatum* apresenta colônias inicialmente de coloração branca e depois ficam cobertas por uma massa de conídios róseos a laranjas (ZULFIQAR e TIMMER, 1996).

O desenvolvimento do patógeno é favorecido por temperaturas entre 22 e 25°C, e alta umidade relativa do ar. Para que os esporos germinem, deve haver disponibilidade de água livre. As temperaturas ótimas de germinação de conídios e formação de apressórios estão entre 22 e 23 °C. Os esporos são liberados dos acérvulos respingos de chuva são o meio de disseminação do fungo. Luz solar, baixa umidade e temperaturas extremas (abaixo de 18°C ou acima de 28°C) inativam os esporos rapidamente (PEREIRA, 2009).

Como patógenos das plantas, as espécies de *Colletotrichum* são, na maioria das vezes, descritas como causadoras de antracnose, embora outras doenças como a podridão vermelha de cana-de-açúcar, podridão nas bagas, podridão de coroa de morango e

banana, e mancha marrom em caupi também podem ser causadas por espécies deste gênero (LENNÉ, 2002).

Os sintomas da doença são bastante característicos e atingem a parte aérea das plantas, com sintomas e sinais nas folhas, flores e frutos. Nas folhas apresentam-se como lesões irregulares no limbo ou nas nervuras, as quais são inicialmente pardo-escurecidas e posteriormente esbranquiçadas no centro e com pontuações escuras e salientes (LOPEZ e PEREIRA, 2010). Nos frutos os sintomas são caracterizados pela ocorrência de depressão circular de diâmetro variável, ocorrendo a presença de uma massa alaranjada de esporos no centro das mesmas, em condições de alta umidade. Em condições de clima ameno a quente e épocas chuvosas, os prejuízos podem chegar a 100%, quando não se faz um controle adequado. Muitas vezes, os sintomas só se manifestam após a colheita e transporte dos frutos, devido à ocorrência de infecção latente, estendendo os prejuízos aos comerciantes e consumidores (TOZZE Jr et al., 2006).

O gênero *Colletotrichum* tem sido relatado como agente causal de doenças em mais de uma centena de angiospermas. A produção de algumas frutas, de grande valor econômico, é especialmente afetada, como o morango, a manga, o abacate e a banana. *Colletotrichum* spp. causam doenças devastadoras nos frutos do café na África, cana-de-açúcar, sorgo e cereais, incluindo milho. O gênero foi recentemente eleito o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos no mundo, com base em dados científicos e importância econômica (DEAN et al., 2012). Dentre estes patógenos, há especialização para determinados grupos de hospedeiros (TOZZE Jr et al., 2006). Porém, segundo Freeman et al. (1998), é comum a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada a um mesmo hospedeiro e uma mesma espécie pode atacar múltiplos hospedeiros. Esta variabilidade pode ocorrer para *C. gloeosporioides* e especialmente com *C. acutatum* (TOZZE Jr et al., 2006)

Espécies de *Colletotrichum* eram usualmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Para diferenciar espécies morfológicamente próximas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, eram analisadas certas características, como: morfologia de conídios, presença de setas e do teleomorfo, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998). As dificuldades encontradas na identificação das espécies de *Colletotrichum* eram referentes à grande diversidade fenotípica, que pode ser influenciada por fatores ambientais, pela existência de formas intermediárias ou por falta de padronização das

condições culturais empregadas nos diversos estudos (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998; LOPEZ, 2001).

Para minimizar problemas na identificação dos patógenos, devem ser considerados estudos visando a integração de diferentes métodos de avaliação. Desta forma, outros critérios também têm sido utilizados na caracterização dessas espécies (TOZZE Jr et al., 2006). Métodos moleculares são ferramentas úteis que podem auxiliar na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* (LOPEZ, 2001).

O progresso da biologia molecular observado nas últimas décadas gerou conhecimento e ferramentas importantes para estudos filogenéticos e populacionais, possibilitando a identificação de espécies e caracterização da biodiversidade de diversos ecossistemas. A utilização de marcadores moleculares pode fornecer informação necessária para verificação de relações filogenéticas, estimativa de distâncias genéticas, discriminação de subpopulações e história biogeográfica (ROSA e PAIVA, 2009). A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) é hoje a região de DNA mais amplamente sequenciada em fungos. Tem sido muito útil para sistemática molecular em nível de espécie, e até mesmo dentro da espécie. A comparação de sequências da região ITS 1 do rRNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero levaram ao desenvolvimento de oligonucleotídeos (iniciadores) taxon-específicos para a diferenciação entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por PCR (reação da polimerase em cadeia) (MILLS et al., 1992). Esses iniciadores têm sido utilizados para a identificação de isolados patogênicos a diversos hospedeiros (FREEMAN et al., 1998).

Além do uso das regiões ITS para a discriminação de espécies do gênero *Colletotrichum*, regiões como a Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) tem sido também utilizadas neste tipo de estudo e distinção dos complexos estudados. Nesse caso o iniciador *forward* GDF (5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3') e o iniciador *reverse* GDR (5'-GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT-3') anelam-se a regiões codificadoras do gene G3PD (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) promovendo a amplificação de produtos úteis para a diferenciação de espécies ou complexos de espécies do gênero *Colletotrichum* (PERES et al., 2004). O gene calmodulin, através do par de iniciadores CL1 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC e CL2A5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC, também têm sido amplificado e utilizado na identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* (O'DONNELL, 2000). Essas três regiões estão entre as mais indicadas para a caracterização molecular de fungos fitopatogênicos.

As filogenias multilocos são normalmente utilizadas para descrever novas espécies de *Colletotrichum* e a tendência é incluir mais e mais sequências nas análises. Pode-se concluir que a análise filogenética é fortemente correlacionada com o número de caracteres (neste caso pares de base) incluídos na análise (ADANSON, 1763), mas os genes são diferenciais em diferentes posições. A inclusão de múltiplos genes em posições semelhantes na filogenia podem, portanto, aumentar o tamanho (sem mencionar o custo) do conjunto de dados sem esclarecer o sinal filogenético. Isto é altamente relevante para o diagnóstico de espécies (CANNON et al., 2012). Esses autores afirmam, com base em estudos preliminares sobre *Colletotrichum* que, em algumas circunstâncias, o aumento do número de *Loci* pode diminuir o desempenho da análise filogenética.

Em geral, as diversas metodologias moleculares desenvolvidas têm contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a variabilidade genética de microrganismos. Embora se tenham ferramentas para identificação dos mais diferentes agentes patogênicos, para o agente causal de antracnose em videira, não foram encontrados na literatura brasileira, estudos demonstrando ou mesmo confirmando tratar-se de *E. ampelina*. Nesse sentido, estudos como o que está sendo desenvolvido tornam-se de fundamental importância, por tratar-se de confirmação não só por características morfológicas do patógeno, mas também, por aspectos moleculares.

### 2.3 *Pestalotia/Pestalotiopsis*

O gênero *Pestalotiopsis* pertence a ordem *Xylariales*, compreendendo ascomicetos periteciais com ascos unitunicados e com cerca de 92 gêneros e 795 espécies (SMITH et al., 2003). Porém, a delimitação desta ordem e das famílias que a compõem, baseada principalmente em caracteres morfológicos, tem sido problemática, gerando as diferenças entre as classificações ocasionadas pela maior ou menor ênfase atribuída a certos caracteres (ERIKSSON et al., 2003). Kirk et al. (2001), incluíram oito famílias na ordem *Xylariales*: *Amphisphaeriaceae*, *Clypeosphaeriaceae*, *Diatrypaceae*, *Graphostromataceae*, *Hyponectriaceae*, *Xylariaceae*, *Cainiaceae* e *Myelospermataceae*. Uma classificação mais recente, realizada por Eriksson et al. (2003), aceita apenas as seis primeiras famílias nesta ordem. Hibbett et al. (2007) incluem a ordem *Xylariales* e a sub ordem *Xylariomycetidae* na classe *Sordariomycetes* com base em relações filogenéticas. Dentre as famílias da ordem *Xylariales*, à *Amphisphaeriaceae* abrange cerca de 41 gêneros incluindo as fases anamórfica e teleomórfica. Seus conídios são multiseptados,

com células centrais escuras, e células da extremidade hialinas, com apêndices no ápice, simples ou ramificados usualmente desenvolvidos em um estroma (KANG et al., 1998). A essa caracterização incluí-se o gênero *Pestalotiopsis* que é a fase anamórfica de *Pestalosphaeria*.

O gênero *Pestalotia* De Not. foi introduzido por De Notaris (1839) com base na espécie-tipo *Pestalotia pezizoides* De Not., inoculado de folhas de *V. vinifera* na Itália. O gênero *Pestalotia* pertence à classe *Ascomycetes* da família *Amphisphaeriaceae* (BARR, 1975; KANG ET AL., 1998).

Com base apenas no formato dos conídios, Steyaert (1949), dividiu *Pestalotia* em três gêneros, sendo eles: *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* e *Truncatella*. O gênero *Pestalotia* foi definido por características que incluem conídios com seis células, sendo as quatro células medianas marrom-oliváceas, células terminais hialinas e apêndices simples ou ramificados resultante do ápice da célula apical. *Pestalotia* foi mantido como um gênero monotípico, com uma única espécie de seis células, *P. pezizoides*. O gênero *Pestalotiopsis* foi introduzido para espécies com conídios de 5 células e subdivididos em sessões especiais com base no número de apêndices apicais: Monosetulatae, Bisetulatae, Trisetulatae e Multisetulatae. Já o gênero *Truncatella* foi definido para aqueles indivíduos com conídios com 4 células.

Em 1961 Guba em sua "Monografia de Monochaetia e Pestalotia," na qual ele descreveu 220 espécies, discordou do que foi proposto por Steyaert (1949), separando *Pestalotia* nas seções quadriloculate (conídio com 4 células), quinqueloculatae (conídio com 5 células) e sexloculatae (conídio com 6 células) e sinonizou os dois novos gêneros (*Pestalotiopsis* e *Truncatella*).

Com base em avaliações microscópicas de isolados de *Pestalotia* e *Pestalotiopsis*, Sutton (1969) preferiu considerar *Pestalotia* como um gênero monotípico, de acordo com o que Steyaert (1949) havia proposto. Sutton (1969, 1980) transferiu todas as espécies de *Pestalotia* anteriormente designadas, com exceção de *P. pezizoides*, para outros gêneros, sendo muitos para *Pestalotiopsis*. Na mesma direção, Nag Raj (1985, 1993) achou necessário redistribuir muitas espécies descritas em *Pestalotia* para outros gêneros, no entanto, preferiu adotar um conceito mais amplo de *Pestalotiopsis*.

Todos os estudos anteriores sobre esses gêneros dependiam fortemente de caracteres morfológicos, sendo estes os principais critérios para a classificação, sem levar em consideração as relações filogenéticas. Jeewon et al. (2002) avaliaram as relações filogenéticas de *Pestalotiopsis* e os gêneros que possuem características semelhantes,

(*Bartalinia* Tassi, *Discosia* Libert, *Monochaetia* (Saccardo) Allescher, *Pestalotia* de Notaris, *Seimatosporium* Corda, *Seiridium* Nees: Fries, e *Truncatella* Steyeart), baseados na sequência de DNA ribossomal e características morfológicas, e mostram que as espécies avaliadas de *Pestalotiopsis* e *Pestalotia* estão estreitamente relacionados e agrupam-se em um único clado monofilético com alto valor de *bootstrap*. Esses autores afirmam que as espécies de *Pestalotia* diferem ligeiramente em morfologia de *Pestalotiopsis*, uma vez que os esporos possuem células medianas com paredes ligeiramente mais grossas, taxa de crescimento mais lenta, sendo essas as diferenças que poderiam ter confundido alguns micólogos durante a identificação.

Morfologia de conídios é o caráter taxonômico ainda amplamente usado para diferenciar gêneros e espécies. O comprimento e a largura, na maioria dos casos, são marcadores taxonômicos estáveis (HU et al., 2007). Além disso, a cor da célula mediana, o comprimento e o número dos apêndices apicais também são caracteres amplamente utilizados para a identificação da espécie. Algumas espécies também podem ser identificadas pela presença de apêndice apical nodoso. Em algumas espécies presença ou ausência de apêndices basais é outra característica para diagnóstico de espécies (JEEWON et al., 2003).

Recentemente, em um amplo estudo, com base em caracteres morfológicos e comparação de sequência de nucleotídeos multigênica, algumas espécies de *Pestalotiopsis* foram divididas em três gêneros: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Os gêneros parecidos com *Pestalotiopsis* são diferenciados principalmente por características como tamanho de conídios, septação, pigmentação e presença ou ausência de apêndices (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012, MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Contudo, em nível de espécie, é difícil classificar com base apenas em caracteres morfológicos, devido à variação de características tais como taxa de crescimento, morfologia dos conídios e estruturas de frutificação dentro da espécie (JEEWON et al., 2003; KEITH et al., 2006). Estudos moleculares recentes têm utilizado análise filogenética das regiões ITS,  $\beta$ -tubulina e *tef1*, para diferenciar as espécies (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012, MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

Outra forma para agrupamento de identificação de gêneros e espécies em *Pestalotiopsis* é a biologia molecular. De acordo com Liu et al. (2010) a análise e alinhamento adequado da região ITS pode ser uma ferramenta-chave no agrupamento

*Pestalotiopsis* para a filogenia das espécies. A técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) também pode ser utilizado para detectar a diversidade genética em espécies do gênero.

Espécies de *Pestalotiopsis* são comuns em ecossistemas tropicais e temperados (BATE-SMITH e METCALFE, 1957) e são muitas vezes isolados como endofíticos (LIU et al., 2006; WEI et al., 2007; WATANABE et al., 2010), como saprofíticos (WU et al., 1982; YANNA et al., 2002; LIU et al., 2008) ou ainda podem causar doenças de plantas (RYU et al., 1993; DAS et al., 2010; DENG et al., 2013). O gênero *Pestalotiopsis* recebeu maior atenção nos últimos anos, não só devido ao seu papel como fitopatógeno, mas também como microrganismo endófito que produz uma vasta gama de metabólitos químicos (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011).

O gênero *Pestalotiopsis* é conhecido principalmente nos trópicos, onde causa doenças foliares em muitas espécies de plantas (HYDE e FRÖHLICH 1995; XU et al., 1999; DAS et al., 2010). Algumas espécies também podem causar podridões de frutas e outras doenças pós-colheita (KORSTEN et al., 1995; XU et al., 1999).

No Brasil são poucos os relatos de fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* sp. como patógeno em videira ou em outras culturas de importância econômica.

### **3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. COMO AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSE EM VIDEIRA**

#### 3.1 RESUMO

Originalmente no Brasil o agente causal da antracnose em videira é descrito como sendo o fungo *Sphaceloma ampelinum*. Em outros países a doença é também causada por diferentes espécies de *Colletotrichum*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar de forma morfológica e molecular o agente causal da antracnose da videira na região sul do Brasil. Folhas, ramos e bagas de videira com sintomas típicos de antracnose em foram coletados em 86 vinhedos de 23 municípios dos três estados da Região Sul do Brasil, no período de novembro de 2013 à março de 2015. Amostras de tecido foliar, pecíolo, ramos e bagas foram desinfestadas com 3% de hipoclorito de sódio por 5 minutos e inoculadas em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), água-ágare aveia-ágar. As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz. Após a obtenção de culturas monospóricas os isolados foram caracterizados por critérios morfológicos, através de reação de PCR empregando iniciadores espécie-específicos e sequenciamento da região ITS (*Internal transcribed spacer*). Baseado nas reações de PCR, 54 e 32 isolados foram identificados como pertencentes ao complexo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente. A avaliação morfológica, revelou haver grande diversidade dentro dos dois complexos, sendo que estes foram divididos, através de análise multivariada destas características, em seis grupos para o complexo *C. acutatum* e seis para o complexo *C. gloeosporioides*. O sequenciamento da região ITS de ao menos um indivíduo representativo de cada grupo morfológico confirmou os dados morfológicos e de PCR, e indicou haver mais de uma espécie dentro de cada complexo. Não foi encontrada relação quanto ao órgão da planta em que o isolado foi obtido ou localidade e as espécies de *Colletotrichum* spp. Os testes de patogenicidade confirmaram que ambos complexos causam antracnose em videira, sendo considerado o primeiro relato no Brasil. Nenhum isolado foi identificado como sendo *E. ampelina*.

### 3.2 INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis vinifera* L.) é a espécie frutífera mais antiga domesticada pelo homem. Registros associam seu cultivo às mais antigas civilizações que se tem conhecimento (THIS et al., 2006). Sua produção mundial foi de 73.700 milhões de quilos em 2014, sendo a terceira fruta em termos de produção (OIV, 2015).

No Brasil a cultura ocupa atualmente uma área de 79.094 hectares, com vinhedos desde o extremo Sul do país até regiões próximas à Linha do Equador, com produção de 1.499.353 toneladas em 2015, sendo que a Região Sul contribui com 66% dessa produção (IBGE, 2016).

A antracnose é uma das principais doenças na cultura da videira, principalmente em regiões com elevada precipitação e clima ameno, como no sul do Brasil. Em alguns anos a antracnose pode ser severa a ponto de comprometer não só a safra do ano como também as safras seguintes (AMORIM e KUNIYUKI 2005). A antracnose da videira é descrita na literatura como sendo causada pelo fungo *Elsinoe ampelina* (de Bary) Scheer, forma sexuada de *Sphaceloma ampelinum* de Bary (= *Gloeosporium ampelophagum* (Pass) Sacc.) (AMORIM e KUNIYUKI, 2005; ELLIS e ERINCIK 2008; LOUIME et al., 2011). É originária da Europa e ocorre em todas as regiões vitícolas do mundo (POOLSAWAT et al., 2009). No Brasil, a doença começou a surgir após a introdução da cultivar 'Isabel' e de outras cultivares americanas, procedentes do hemisfério Norte (SOUZA e PINHEIRO 1996). A descrição original do agente causal no Brasil como *E. ampelina* ocorreu, provavelmente, por ser o agente causal da doença descrito em diversos países vitivinícolas do mundo. Esta classificação sempre levou ao entendimento de que todo sintoma de antracnose em videira fosse causado por *E. ampelina*.

Estudos recentes na Índia e China associam espécies de *Colletotrichum* como *C. gloeosporoides*, *C. acutatum* (CHOWDAPPA et al., 2009; YAN et al., 2014) e *C. capsici* (SAWANT et al., 2012 (b)) como agentes causais da antracnose na videira.

O gênero *Colletotrichum* inclui espécies importantes economicamente por causar doenças em plantas cultivadas em todo o mundo (HYDE et al., 2009; CANNON et al., 2012). Tradicionalmente, a identificação de espécies deste gênero tem se baseado na forma e tamanho de conídios, formação de apressórios, produção de teleomorfos, presença ou ausência de cerdas e morfologia da colônia (SMITH e BLACK 1990; SUTTON 1992; URENA-PADILLA et al., 2002).

Apesar do gênero ser muito bem definido, o conceito de espécies ainda é fator de estudo, especialmente entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, que são considerados espécies compostas por diversas subpopulações (SUTTON 1992; SCHILLER et al., 2006). A taxonomia e nomenclatura do gênero *Colletotrichum* têm sido revista constantemente devido à instabilidade dos seus caracteres morfológicos (CANNON et al., 2012). Esta situação levou a erros de identificação da mesma espécie em diferentes outras espécies (AGOSTINI et al., 1992; SUTTON 1992; TIMMER et al., 1994).

A importância da diferenciação de espécies é crítica para fins de controle, pois em população mista de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, a sensibilidade de uma espécie ao fungicida benomyl contra a outra pode causar uma mudança na estrutura da população (BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG e HARTIN 1997). Mais recentemente, as espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas com sucesso devido ao emprego da diferenciação morfológica, aliada a utilização da filogenia molecular (DAMM et al., 2012a).

Com a comprovação de que existem complexos de espécies dentro das espécies anteriormente determinadas (CANNON et al., 2012), novos estudos foram realizados, baseados no sequenciamento em multilocus usando as regiões dos genes ITS (Espaçador Interno Transcrito), GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), CHS-1 (Quitina sintetase 1), HIS3 (Histona-3), ACT (Aquitina), TUB2 ( $\beta$ -tubulina) e GS (Glutamina sintetase), separando em complexos espécies deste gênero. O complexo acutatum ficou constituído por 31 espécies (DAMM et al., 2012a), o complexo gloeosporioides por 22, graminicola com 13, spaethianum por cinco, truncatum por três, orbiculare por oito e dematium e destructivum por seis espécies (DAMM et al., 2013; WEIR et al., 2012) e o complexo boninense por 18 espécies (DAMM et al., 2012b),

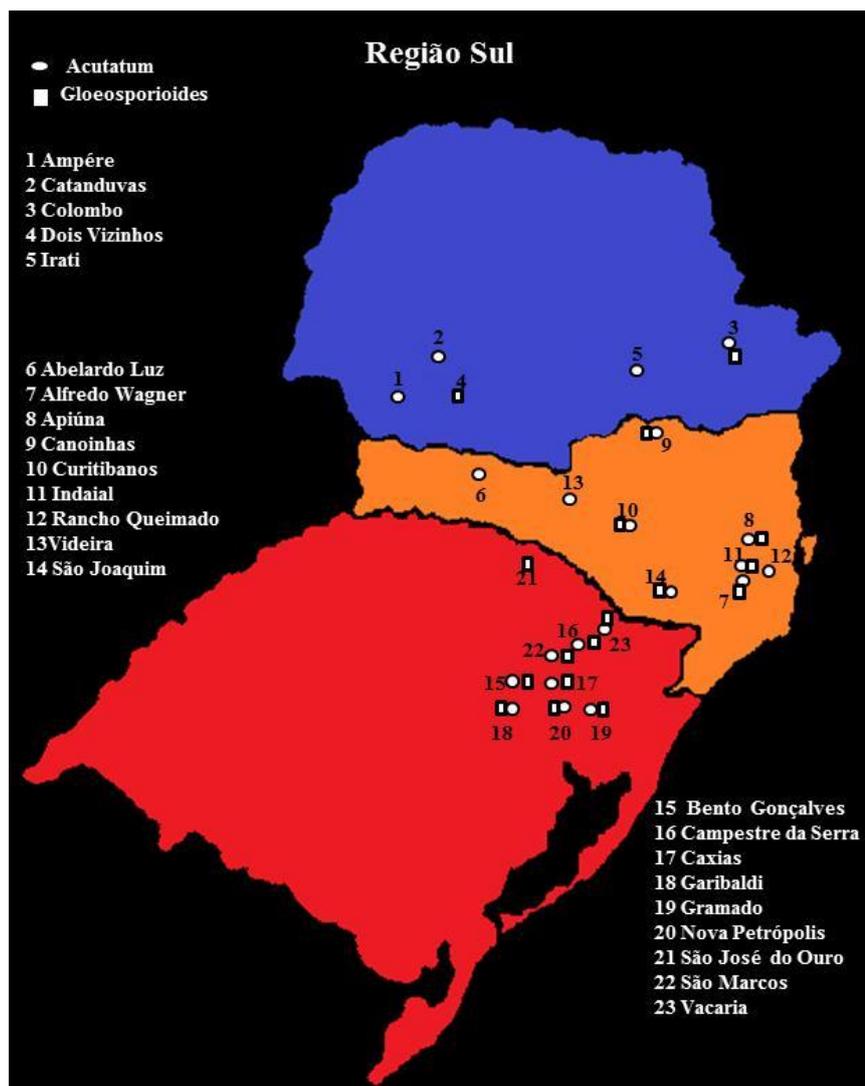
No Brasil, a literatura tem associado a antracnose da videira à *E. ampelina*, enquanto que em outros países também ao *Colletotrichum* spp. Até o momento no Brasil, nenhum estudo etiológico foi realizado para avaliar a presença de espécies de *Colletotrichum* como agente causal da antracnose. Assim, os objetivos desse estudo são identificar e caracterizar de forma morfológica e molecular o agente causal da antracnose da videira e diferenciar as espécies do gênero *Colletotrichum* encontradas no Sul do país.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia do campus de Curitibanos e no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, campus Florianópolis, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### 3.3.1 Obtenção de isolados

Buscando representar a diversidade de isolados de antracnose, foram coletadas amostras de tecidos vegetais de videira (*Vitis* spp.) com sintomas ou sinais típicos de antracnose em 86 vinhedos de 23 municípios dos três estados da Região Sul do Brasil, no período de novembro de 2013 à março de 2015. A distribuição geográfica dos municípios amostrados e a distribuição das isolados pertencentes as dois complexos, *C. acutata* e/ou *C. gloeosporioides*, após a análise dos dados, podem ser observados na Figura 1. Não objetivou-se neste experimento identificar a espécie de videira da qual estava sendo realizada a coleta, mas sim amostrar regiões com altitude e diversidades climáticas em diferentes épocas de coleta.



**Figura 1.** Mapa ilustrativo dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com a distribuição geográfica dos isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, após análise dos dados. Números indicam os 23 municípios de coletas de folhas, pecíolos, ramos e bagas com sintomas de antracnose em videira, coletados nas safras 2013/14 e 2014/15.

Os isolados foram obtidos de lesões típicas de antracnose nas folhas, pecíolos, ramos e bagas (Figura 2 A e B). Os tecidos foram desinfestados superficialmente em uma solução de hipoclorito de sódio (3% de cloro disponível) durante cinco minutos e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada autoclavada durante 30 segundos e secas com toalhas de papel estéril. As amostras de tecidos foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, em câmara BOD (*biochemical oxygen demand*). Objetivando isolar também *E. ampelina*, além do meio de cultura BDA, foram utilizados no isolamento os meios água-ágare aveia-ágare, seguindo as mesmas descrições citadas

acima. Para obtenção de cultura pura, micélio das diferentes culturas foram transferido assepticamente para novas placas com BDA e armazenadas nas mesmas condições descritas anteriormente por sete dias até esporulação.



**Figura 2.** Planta de *Vitis* spp. apresentando os sintomas típicos da antracnose nas folhas, pecíolos e ramos (A) e baga (B).

Para o isolamento monospórico foi vertido 10 mL de ágar água em placas de Petri estéreis, deixando solidificar. Uma suspensão de esporos diluída para  $10^5$  conídios/mL de cada isolado foi preparada em água destilada estéril, e a partir desta, 40  $\mu$ L da suspensão de esporos foi espalhada uniformemente sobre as placas contendo meio de cultura água-ágar 1,5%, sendo o excesso drenado para fora das placas. As placas foram incubadas a 25 °C por 12 horas e examinadas sob o microscópio para localizar esporos germinados isoladamente, sendo estes, então, transferidos assepticamente com a ajuda de estilete estéril às placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

### 3.3.2 Caracterização morfológica dos isolados de antracnose

A caracterização morfológica dos 86 isolados foram realizadas através de características quantitativas de índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), diâmetro final da colônia (DFC), produção, comprimento e largura de conídios e características qualitativas de aspecto de colônias e formato dos conídios. As análises

foram feitas sob eilineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Cada repetição representada por uma placa.

### **3.3.3 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)**

Discos de cultura monospórica (três mm de diâmetro) foram retirados de placas com colônias dos isolados e transferidos para placas de Petri com nove centímetros de diâmetro (cinco placas por isolado) contendo meio de cultura BDA (Merck). Estas placas foram acondicionadas em BOD por oito dias, regulada a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada pela medição, a cada 24 h, registrando-se o diâmetro em milímetros das colônias, em posição ortogonal, durante sete dias, a partir do segundo dia em que foram colocados os discos de micélio contendo o isolado. O diâmetro das colônias foi medido em milímetros, com auxílio de paquímetro digital. O IVCM foi determinado utilizando-se a fórmula apresentada por Oliveira (1991):

$IVCM = \sum (D - Da)/N$ , sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação.

### **3.3.4 Diâmetro final da colônia (DFC)**

O DFC foi considerado o último valor mensurado na avaliação de IVCM.

### **3.3.5 Produção de esporos**

No último dia de incubação, 10 mL de solução 0,01% de Tween 20 foi adicionada às placas, e com o auxílio de uma espátula foi raspada a superfície do meio de cultura para a remoção dos esporos. Em seguida, o número de conídios foi quantificado em câmara de Neubauer.

### **3.3.6 Dimensão dos conídios**

Foram medidos o comprimento e largura de 100 conídios em cada repetição. Os conídios foram medidos por meio de uma câmera Dp 73, acoplada ao microscópio da marca Olympus modelo Bx53, na objetiva de 40x, através do programa Cellesens.

### 3.3.7 Análise estatística

Concomitantemente as avaliações morfológicas, os resultados da análise de PCR permitiram analisar os dados separadamente para os isolados que apresentaram reação positiva para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* evitando avaliar as características morfológicas entre supostas espécies diferentes. Os resultados de todas as variáveis quantitativas foram submetidos à análise de variância univariada para constatar a existência de variabilidade entre os isolados, a 5% de probabilidade, pelo Teste F. Para o procedimento de separação de médias entre os isolados foi utilizado o teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o programa computacional Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2000). A partir da matriz de dissimilaridade dos dados quantitativos foi possível construir um dendograma gerado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*) com base na distância generalizada de Mahalanobi, estabelecendo as relações genéticas entre os diferentes isolados. Para a análise multivariada, foi utilizado o recurso computacional do programa Genes (CRUZ, 2008).

Com base no agrupamento obtido pela análise multivariada das características quantitativas, foi realizada a avaliação das características qualitativas, utilizando para isso, um indivíduo característico de cada grupo.

### 3.3.8 Características das colônias

Os isolados crescidos em câmara de crescimento tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*) (fotoperíodo 12h) a 25 °C foram observados entre sete e quinze dias de crescimento, considerando os mesmos parâmetros avaliados por Sawant et al. (2012(a)). A textura foi avaliada quanto à aparência (lisa ou enrugada), margem de crescimento (regular ou irregular), crescimento micelial (cotonoso ou plano), modelo de esporulação (anéis concêntricos ou distribuídos por toda a superfície da placa) e massa de conídios (laranja, salmão, salmão com preto, preto acastanhado, cinza escuro, preto).

### 3.3.9 Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA genômico dos isolados, foi produzida massa micelial em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura líquido, batata dextrose, inoculado com cinco discos de micélio e mantidos por cinco dias a temperatura de 28°C, sem agitação, e com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, o micélio foi filtrado e mantido a -20 °C até o momento da extração do DNA.

O DNA foi extraído de acordo com Zolan e Pukila (1986), com modificações. O micélio congelado foi macerado na presença de nitrogênio líquido, sendo transferido para um microtubo de 2 mL e adicionado 700  $\mu$ L de tampão de extração (2,0 g CTAB 2 %; 8,12 g NaCl 1,4 M; 10 mL (0,5M) Tris-HCl pH 8,0 100 mM; 4 mL (0,5 M) EDTA 20 mM; 2g PVP 2 %; 2 %  $\beta$ -mercaptoetanol e água mili-Q até 100 mL). Os microtubos foram mantidos por 20 minutos em banho-maria a 65 °C invertendo-os ocasionalmente. Em seguida, deixou-se resfriar a temperatura ambiente e foi adicionado 700  $\mu$ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo misturado até formar uma emulsão e centrifugado por 5 min a 12.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um microtubo de 1,5mL adicionado novamente clorofórmio:álcool isoamílico, misturado e centrifugado novamente por 5 min a 12.000 rpm (esse passo foi repetido duas vezes). Posteriormente, foi adicionado um volume igual ao da fase aquosa de isopropanol gelado e foi centrifugado por 5min a 12.000 rpm. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500  $\mu$ L de etanol 70% e uma vez com 500  $\mu$ L de etanol absoluto. Por fim, o DNA foi ressuspenso em 50 $\mu$ L de tampão TE + RNase [10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>], incubado em estufa à 37 °C por 30 min.

A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose a 0,8 %, através da comparação visual com o marcador DNA  $\lambda$  de concentração conhecida. Todas as amostras foram diluídas em água ultrapura autoclavada para 10 ng/ $\mu$ L e armazenadas a -20°C.

### 3.3.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 15 $\mu$ L, contendo: 1,5  $\mu$ L tampão NH<sub>4</sub> 10X; 0,45  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1,2  $\mu$ L dNTPs Mix (2,5 mM); 1  $\mu$ L do iniciador *forward* (10  $\mu$ M); 1  $\mu$ L do iniciador *reverse* (10  $\mu$ M); 0,2  $\mu$ L de TAQ DNA Polimerase (5 U/ $\mu$ L); 7,65  $\mu$ L de água ultrapura autoclavada e 2  $\mu$ L de DNA (10 ng/ $\mu$ L). Foram utilizadas as seguintes combinações de iniciadores específicos para as diferentes espécies causadoras de antracnose: EampF e EampR para *Elsinoe ampelina*; CgINT (MILLS et al., 1992) e ITS4 (WHITE et al., 1990) para *Colletotrichum gloeosporioides*; CcINT (SHEU e WANG, 2005) e ITS4 para *C. capsici*; CaINT (SREENIVASAPRASAD et al., 1996) e ITS4 para *C. acutatum* (Tabela 1).

As condições de termociclagem da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 34 ciclos formados por 94°C por 1 min, 55-58°C (dependendo do par de primer, ver Tabela 1) por 1 min e 72°C por 1 min e 30 seg; e extensão final a 72°C por 5 min.

**Tabela 1.** Descrição dos iniciadores utilizados para amplificar de forma específica, via PCR, o DNA de quatro espécies causadoras de antracnose.

Espécie	Iniciadores	Sequência dos Iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CgInt	F: GGC CTC CCG CCT CCG GGCGG	55
	ITS 4	R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>C. acutatum</i>	CaINT2	F: GGG GAA GCC TCT CGC GG	58
	ITS 4	R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>C. capsici</i>	CcINT	F: TCT CCC CGT CCG CGG GTG G	55
	ITS 4	R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>Elsinoe ampelina</i>	EampF	F: TCC GTA GGT GAA CCT GCG GA	55
	EampR	R: TCC TAC CTG ATC CGA GGT CA	

Os produtos da PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1X. Os fragmentos resultantes da PCR foram marcados com GelRed (Biotium) e visualizados e fotografados em fotodocumentador (Loccus Biotecnologia LTB-21x26HE).

### 3.3.11 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado em duas etapas: a primeira em 2014 para a qual foram amostrados isolados com características morfológicas diferentes, incluindo nessa amostragem além de isolados com características de *Colletotrichum*, todos os isolados com características distintas, para os quais, baseado apenas em característica morfológicas, não foi possível definir com precisão a qual gênero pertenciam. O objetivo foi o de não excluir possíveis isolados de *E. ampelina*. Para a melhor discriminação das espécies foi realizado o sequenciamento de duas regiões genômicas, as regiões ITS e GAPDH, utilizando-se os seguintes iniciadores: ITS - *forward* ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e *reverse* ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') e GAPDH - *forward* GDF (5'-GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA-3') e *reverse* GDR (5'-GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT-3'); com temperatura de anelamento de 55 °C para ambos os iniciadores.

A segunda etapa foi realizada em 2015 com base nos resultados da genotipagem com os marcadores específicos (que permitiram confirmar o complexo de *Colletotrichum* ao qual pertenciam) e na análise multivariada das características morfológicas destes isolados. Com base nestas informações foram definidos grupos com semelhanças

morfológicas. Foi sequenciado ao menos um isolado característico de cada grupo morfológico para a região genômica ITS e construída uma árvore filogenética.

Após a reação de amplificação pela PCR, os produtos foram purificados, objetivando a retirada de iniciadores direto, reverso e dNTPs não incorporados durante as amplificações. A cada reação, foram adicionados 20,0 µL de PEG 800 20% contendo cloreto de sódio 2,5 M. As reações foram levemente agitadas (em Vortex®) e incubadas por 30 min em estufa a 37 °C. Após, as reações foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 15 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi removido e foi adicionado 125,0 µL de etanol 80% (4,0 °C) para a lavagem do pellet. As reações foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 8 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi novamente removido e em seguida foram adicionados 125,0 µL de etanol 80% (4,0 °C) para a lavagem do pellet. As reações foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente durante 8 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi removido e deixou-se o pellet secar em estufa a 37 °C. Após esta etapa, o pellet foi ressuspendido (durante 30 min a 37 °C) em 15,0 µL de água ultra pura autoclavada. O produto de PCR purificado foi posteriormente quantificado por estimativa visual em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium®).

Depois de otimizados, amplificados e purificados, os produtos de amplificação dos iniciadores foram sequenciados, pelo método de terminação de cadeia (SANGER et al., 1977). Os 30 ciclos de amplificação foram compostos de: desnaturação a 95 °C por 20 s, seguido da hibridização do iniciador a 50 °C por 15 s e extensão enzimática (enzima Thermo Sequenase™ II DNA polimerase®, GE Healthcare) a 60 °C durante 1 min e 30 s. O sequenciamento foi realizado em analisador de DNA automático ABI 3500XL Séries (Applied Biosystems). Foram efetuadas reações em duplicata para os iniciadores *forward* e *reverse*, visando a garantia da fidelidade das sequências obtidas.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas através do programa BioEdit. Para a identificação dos isolados, as sequências consenso de nucleotídeos obtidas para cada isolado foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa Blast-n (Standard Nucleotide BLAST). A identificação do patógeno foi determinada baseada na melhor significância obtida quanto à similaridade.

Os dendogramas foram obtidos apenas pelas sequências consenso da região ITS. O alinhamento foi realizado pelo método Muscle através do software Mega 6.0 (Tamura et al., 2013). O mesmo “software” foi utilizado para a análise filogenética que foi

realizada pelo método ML (Maximum Likelihood). A consistência dos ramos obtidos no dendrograma foi avaliada pela análise de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985), com 1.500 reamostragens. Como grupo externo (outgroup) foram utilizadas as sequências de *Diaphote rudis*. Sequências de espécies do gênero *Colletotrichum* spp., disponíveis no GenBank, que apresentaram maior identidade, foram selecionadas enraizamento dos dendrogramas. As sequências finais obtidas para as diferentes regiões genômicas caracterizadas no presente trabalho serão depositadas no GenBank.

### 3.3.12 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade dos isolados foi realizado em triplicata com placas de Petri 150x20 mm contendo meio água-ágar 1,5% no qual foi inserido o pecíolo de folhas jovens destacadas das cultivares Bordo e Niágara. As folhas foram pulverizadas, na face adaxial, com aproximadamente 1,5 mL da suspensão de esporos de  $10^5$  esporos/mL. O tratamento controle foi pulverizado com água destilada e esterilizada. As Placas foram incubadas em câmara BOD por até 14 dias a temperatura de  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Ao surgimento dos sintomas o patógeno foi reisolado.

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.4.1 Identificação dos isolados

A identificação dada aos isolados encontra-se na Tabela 2, onde pode ser observada a parte da planta em que foi coletado o isolado, o município, juntamente com o local e a data de coleta. As primeiras letras maiúsculas correspondem às iniciais do município de coleta, seguidas da letra inicial da parte da planta em que foi isolado e, se no município houve mais de um local de coleta, segue a letra L e o número do ponto de coleta.

Dos 54 isolados do complexo *C. acutatum* 16 foram isolados de folhas, 15 de bagas, 12 de pecíolos e 11 de caules. Para o complexo *C. gloesporioides*, dos 32 isolados, a maioria foram obtidos de caules (12 isolados), seguido de folhas e bagas com o mesmo número de isolados (8 isolados) e quatro isolados de pecíolos (Tabela 3). Observa-se na Tabela 2 que no estado de Santa Catarina apenas um isolado foi obtido de bagas, considerando ambos os grupos, esse fato deve-se ao estágio fenológico das videiras no

momento de coleta, que neste caso coincidiu de não ter sido realizadas coletas no estádio reprodutivo, com exceção da coleta realizada no município de Abelardo Luz.

**Tabela 2.** Identificação dos isolados obtidos de sintomas de antracnose em videira, parte da planta de onde o tecido infectado foi coletado, localidade de procedência e data de coleta. Separados em dois grupos (*Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*), de acordo com a análise molecular.

<b>Código de identificação dos isolados</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Data de Coleta</b>
<b>Grupo I - <i>C. acutatum</i></b>			
AM-b	Baga	Ampére (PR)	2013/14
CA-p	Pecíolo	Catanduvas (PR)	2013/14
CA-b	Baga	Catanduvas (PR)	2013/14
CA-f	Folha	Catanduvas (PR)	2013/14
CO-c	Caule	Colombo (PR)	2013/14
IR-b	Baga	Irati (PR)	2013/14
AL-b	Baga	Abelardo Luz (SC)	2013/14
AW-f-L1	Folha	Alfredo Wagner - Local 1 (SC)	2013/14
AW-p-L1	Pecíolo	Alfredo Wagner - Local 1 (SC)	2013/14
AW-p-L2	Pecíolo	Alfredo Wagner - Local 2 (SC)	2013/14
NA-c	Caule	Apiúna (SC)	2013/14
CN-f-L1	Folha	Canoinhas- Local 1 (SC)	2014/15
CN-p-L2	Pecíolo	Canoinhas- Local 2 (SC)	2014/15
CB-f-L1	Folha	Curitibanos - Local 1 (SC)	2013/14
CB-p-L1	Pecíolo	Curitibanos - Local 1 (SC)	2013/14
CB-f-L2	Folha	Curitibanos - Local 2 (SC)	2013/14
CB-f-L3	Folha	Curitibanos - Local 3 (SC)	2013/14
CB-f-L4	Folha	Curitibanos - Local 4 (SC)	2014/15
CB-p-L4	Pecíolo	Curitibanos - Local 4 (SC)	2014/15
IN-f	Folha	Indaial (SC)	2013/14
RQ-c	Caule	Rancho Queimado (SC)	2013/14
SJ-p-L1	Pecíolo	São Joaquim - Local 1 (SC)	2014/15
VI-c	Caule	Videira (SC)	2013/14
BG-c-L2	Caule	Bento Gonçalves -Local 2 (RS)	2014/15
BG-c-L4	Caule	Bento Gonçalves -Local 4 (RS)	2014/15
CS-b-L1	Baga	Campestre da Serra-Local 1 (RS)	2014/15
CS-f-L2	Folha	Campestre da Serra-Local 2 (RS)	2014/15
CS-b-L2	Baga	Campestre da Serra-Local 2 (RS)	2014/15
CS(a)-p-L2	Pecíolo	Campestre da Serra-Local 2 (RS)	2014/15
CS(b)-p-L2	Pecíolo	Campestre da Serra-Local 2 (RS)	2014/15
CX-f-L1	Folha	Caxias do Sul (RS)	2014/15
CX-c	Caule	Caxias do Sul (RS)	2014/15

CX-b	Baga	Caxias do Sul (RS)	2014/15
GA-f-L2	Folha	Garibaldi - Local 2 (RS)	2014/15
GA-c-L3	Caule	Garibaldi-Local 3 (RS)	2014/15
GM-b-L1	Baga	Gramado - Local 2 (RS)	2014/15
GM-p-L2	Pecíolo	Gramado- Local 1 (RS)	2014/15
GM-b-L1	Baga	Gramado- Local 1 (RS)	2014/15
GM-f-L1	Folha	Gramado- Local 1 (RS)	2014/15
NP-f-L1	Folha	Nova Petrópolis -Local 1 (RS)	2014/15
NP-b-L1	Baga	Nova Petrópolis -Local 1 (RS)	2014/15
NP-c-L1	Caule	Nova Petrópolis -Local 1 (RS)	2014/15
NP-b-L2	Baga	Nova Petrópolis -Local 2 (RS)	2014/15
SM-f	Folha	São Marcos (RS)	2014/15
SM-c	Caule	São Marcos (RS)	2014/15
VA-f-L6	Folha	Vacaria - Local 6 (RS)	2014/15
VA-b-L8	Baga	Vacaria - Local 8 (RS)	2014/15
VA-b-L2	Baga	Vacaria -Local 2 (RS)	2014/15
VA-c-L2	Caule	Vacaria -Local 2 (RS)	2014/15
VA-f-L3	Folha	Vacaria -Local 3 (RS)	2014/15
VA-p-L4	Pecíolo	Vacaria -Local 4 (RS)	2014/15
VA(a)-b-L6	Baga	Vacaria -Local 6 (RS)	2014/15
VA(b)-b-L6	Baga	Vacaria -Local 6 (RS)	2014/15

---

*Grupo II - C. gloeosporioides*

---

DV-b	Baga	Dois vizinhos (PR)	2013/14
CO-c	Caule	Colombo (PR)	2013/14
AW-c-L1	Caule	Alfredo Wagner - Local 1 (SC)	2013/14
AW-p-L2	Pecíolo	Alfredo Wagner - Local 2 (SC)	2013/14
NA-c	Caule	Apiúna (SC)	2013/14
NA-f	Folha	Apiúna (SC)	2013/14
CN-f-L2	Folha	Canoinhas- Local 2 (SC)	2014/15
CN-f-L2	Folha	Canoinhas- Local 2 (SC)	2014/15
CN-c-L2	Caule	Canoinhas- Local 2 (SC)	2014/15
CN-c-L2	Caule	Canoinhas- Local 2 (SC)	2014/15
CB-c-L1	Caule	Curitibanos - Local 1 (SC)	2013/14
CB-f-L4	Folha	Curitibanos - Local 4 (SC)	2014/15
IN-c	Caule	Indaial (SC)	2013/14
IN-p	Pecíolo	Indaial (SC)	2013/14
IN-f	Folha	Indaial (SC)	2013/14
SJ-p-L1	Pecíolo	São Joaquim - Local 1 (SC)	2014/15
BG-c-L1	Caule	Bento Golçalves - Local 1 (RS)	2014/15
BG-b-L3	Baga	Bento Golçalves - Local 3 (RS)	2014/15
BG-c-L2	Caule	Bento Gonçalves - Local 2 (RS)	2014/15
CS-b-L2	Baga	Campestre da Serra- Local 2 (RS)	2014/15
CX-c	Caule	Caxias do Sul (RS)	2014/15
GA-f-L2	Folha	Garibaldi-Local 2 (RS)	2014/15

GA-c-L3	Caule	Garibaldi-Local 3 (RS)	2014/15
GA-b-L3	Baga	Garibaldi-Local 3 (RS)	2014/15
GA-p-L3	Pecíolo	Garibaldi-Local 3 (RS)	2014/15
GM-f-L2	Folha	Gramado - Local 2 (RS)	2014/15
GM-b-L2	Baga	Gramado- Local 2 (RS)	2014/15
NP-p-L2	Pecíolo	Nova Petrópolis- Local 2 (RS)	2014/15
SJO-b	Baga	São José do Ouro (RS)	2013/14
SM-f	Folha	São Marcos (RS)	2014/15
VA-b-L2	Baga	Vacaria - Local 2 (RS)	2014/15
VA-c-L4	Caule	Vacaria - Local 4 (RS)	2014/15
VA-b-L6	Baga	Vacaria - Local 6 (RS)	2014/15

O isolamento a partir de lesões típicas de antracnose de folhas, ramos, pecíolos e bagas em diferentes meios de cultura (ágar-água, BDA, aveia-ágar) resultou em colônias monospóricas com diferentes características morfológicas. Muitas destas colônias foram descartadas com base na avaliação morfológica, pois claramente não estavam associadas a fungos patogênicos. As demais culturas foram agrupadas baseando-se no padrão morfológico e uma colônia de cada grupo morfológico foi sequenciada nas regiões genômicas ITS e GAPDH, para confirmar a avaliação morfológica ou então identificar o organismo envolvido.

O sequenciamento revelou se tratar, além de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, dos gêneros *Epicoccum* spp., *Collophora* spp., *Diaporthe* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Cylindrobasidium* spp.

Dos 32 isolados sequenciados, nove foram descritos como pertencentes aos complexos *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides* de acordo com a comparação das sequências nucleotídicas do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website). Nenhum isolado foi identificado como sendo *E. ampelina*. A confirmação do gênero/espécie se deu através das duas regiões genômicas citadas acima para quase todos os isolados, com exceção dos isolados AW-p-L2 e AW-c-L1 para os quais não amplificou o gene ITS (Tabela 3).

A comparação com as sequências depositadas no site do NCBI sugerem a presença de espécies classificadas dentro dos complexos de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (Tabela 3), como é o caso, por exemplo, do isolado AW-f-L1 para o qual as espécies *C. nymphaeae* e *C. acutatum* apresentaram a mesma identidade, tanto para o gene ITS como para GAPDH, esse resultado foi observado para quase todos os isolados sequenciados.

**Tabela 3.** Comparação das sequências nucleotídicas das regiões ITS e GAPDH, de isolados obtidos de lesões de antracnose em videira, com sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information website*).

Isolado	Gene	Descrição	Max Score	Total Score	Query cover	E-value	Identity	Número de acesso
AW-f-L1	ITS	<i>Colletotrichum acutatum</i>	1053	1053	99%	0.0	99%	KU933355.1
		<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	1033	1033	99%	0.0	99%	KU498271.1
	GAPDH	<i>Colletotrichum acutatum</i>	424	424	99%	6e-115	98%	KT228308.1
		<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	420	420	100%	8e-114	98%	KP339289.1
AW-p-L2	ITS	Não amplificou						
	GAPDH	<i>Colletotrichum acutatum</i>	414	414	96%	2e-112	98%	KF963617.1
AW-c-L1	ITS	Não amplificou						
	GAPDH	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	492	492	50%	2e-135	98%	HQ022584.1
		<i>Colletotrichum fruticola</i>	492	492	50%	2e-135	98%	JX009923.1
CB-f-L1	ITS	<i>Colletotrichum acutatum</i>	1027	1027	98%	0.0	100%	AJ301964.1
		<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	1027	1027	99%	0.0	100%	KU498271.1
	GAPDH	<i>Colletotrichum acutatum</i>	412	412	99%	1e-111	97%	KT228308.1
		<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	411	411	95%	5e-111	99%	KT777679.1
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	411	411	100%	4e-111	100%	KR183777.1
NA-f	ITS	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	405	405	98%	2e-109	100%	JX010164.1
		<i>Colletotrichum fruticola</i>	405	405	98%	2e-109	100%	JX010164.1
	GAPDH	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	486	486	98%	5e-134	97%	HQ022584.1
		<i>Colletotrichum fruticola</i>	379	474	63%	3e-101	100%	KU522231.1
NA-c	ITS	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	987	987	100%	0.0	99%	KT390189.1
		<i>Colletotrichum siamense</i>	992	992	100%	0.0	100%	KP703410.1
	GAPDH	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	407	407	100%	6e-110	99%	KX379458.1
		<i>Colletotrichum siamense</i>	418	418	100%	3e-113	99%	KJ769240.1
NA-c	ITS	<i>Colletotrichum acutatum</i>	1048	1048	99%	0.0	99%	KU933355.1
		<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	1048	1048	99%	0.0	99%	KU498271.1
	GAPDH	<i>Colletotrichum acutatum</i>	464	464	98%	2e-127	97%	KF963617.1
NP-b-L1	ITS	<i>Colletotrichum acutatum</i>	1033	1033	99%	0.0	99%	KU933355.1
		<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	1033	1033	99%	0.0	99%	KU498271.1

GAPDH	<i>Colletotrichum acutatum</i>	425	425	99%	2e-115	99%	KT228308.1
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	422	422	100%	2e-114	99%	KP339289.1
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1022	1022	97%	0.0	99%	FJ455527.1
SJO-b	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	392	392	100%	2e-105	97%	KX379458.1
	<i>Colletotrichum siamense</i>	396	396	99%	1e-106	98%	KP703335.1

Inoculações utilizando diferentes meios de cultura e em diferentes épocas do ano foram realizadas e os resultados foram sempre os mesmos. Os testes de patogenicidade revelaram que tanto *C. acutatum*, quanto *C. gloeosporioides* foram patogênicos em folhas de videira.

### 3.4.2 Caracterização molecular dos isolados

Baseado nos resultados preliminares, descritos no item anterior, coletas sistemáticas foram organizadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, representando 37 locais, com condições edafoclimáticas distintas, nas safras 2013/14 e 2014/15. Todos os isolados oriundos destas coletas com características típicas de *Colletotrichum*, *S. ampelinum* e aqueles que morfologicamente não foi possível identificar, foram genotipados com os quatro marcadores moleculares espécie-específicos descritos na metodologia. Os iniciadores utilizados para *E. ampelina* apresentaram banda no tamanho esperado para todos os isolados, indicando que o iniciador não é específico para a espécie. O mesmo resultado foi encontrado por Sawant et al. (2012(a)), indicando claramente que um novo par de iniciadores precisa ser desenvolvido para a espécie. Deste modo, foram excluídos da análise.

Dos isolados genotipados, 54 foram amplificados somente pela combinação de iniciadores CaINT2-ITS4, produzindo o fragmento específico de 496 pares de bases, indicando que estes isolados pertencem ao complexo *C. acutatum*. Trinta e dois isolados foram amplificados apenas pela combinação CgInt-ITS4, revelando o fragmento específico de aproximadamente 450 pares de bases, indicando que estes pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*. A combinação CcINT-ITS4, específica para *C. capsici*, não amplificou o fragmento específico para nenhum dos isolados avaliados.

Além da diferenciação entre os dois complexos, foi possível observar através da análise de PCR que há uma grande diversidade quanto aos locais e parte da planta em que

foram identificados esses patógenos. Da mesma forma, observa-se que em uma mesma planta e mesma parte da planta foram identificados tanto *C. acutatum* como *C. gloeosporioides*, como é o caso dos isolados AN3, AW2 (local 2) e IN1, o que demonstra que esses dois patógenos estão ocorrendo concomitantemente. A mesma associação foi observada por Chowdappa et al. (2009) que relataram a associação de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* com antracnose em videira no oeste da Índia.

### 3.4.3 Caracterização de culturas e morfologia dos isolados

Após a confirmação da identidade dos isolados a partir da análise molecular, todos os 86 isolados foram caracterizados detalhadamente quanto as característica da cultura e morfologia dos esporos. A análise univariada das características quantitativas demonstrou haver diferenças significativas entre os isolados, dentro das espécies, para todas as características avaliadas, tanto para o complexo *C. acutatum* (Tabela 4) como para o complexo *C. gloeosporioides* (Tabela 5).

#### Complexo *C. acutatum*

Baseado na capacidade de esporulação, os isolados do complexo *C. acutatum* foram divididos em sete grupos, destacando-se o isolado NA-c; que apresentou esporulação significativamente superior aos demais, seguido dos isolados NP-f-L1 e NP-c-L1, respectivamente (Tabela 4). O diâmetro final das colônias (DFC) médio dos isolados foi de 54,9 mm. Os isolados CX-f-L1, IN-f e GA-c-L3 apresentaram o maior crescimento final, enquanto que os isolados VI-c e AW-p-L2 apresentaram o menor crescimento, não diferindo apenas do isolado AW-p-L2.

O comprimento médio dos conídios dos isolados de *C. acutatum* foi 12,2 µm, variando de 6 µm a 15,1 µm, enquanto que a largura foi 4,9 µm, variando de 2,7 µm a 6,3 µm. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) médio foi de 1,78 mm/dia. O isolado IN-f apresentou o maior valor de IVCM (3,47 mm/dia).

**Tabela 4.** Capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>) após sete dias, diâmetro final das colônias (DFC; mm) sete dias após a repicagem (mm), comprimento e largura (µm) dos conídios, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia) de isolados do complexo *Colletotrichum acutatu*, em meio de cultura BDA, obtidos de plantas de videira com sintomas típicos de antracnose.

Identificação dos isolados	DFC (mm)	IVCM (mm/dia)	Comprimento dos conídios	Largura dos	n° (10 <sup>5</sup> ) conídios/ml
----------------------------	----------	---------------	--------------------------	-------------	-----------------------------------

			( $\mu\text{m}$ )	conídios ( $\mu\text{m}$ )	
NA-c	65,9 b	2,1 e	11,4 f	4,9 c	13204,2 a
NP-f-L1	60,8 c	1,9 f	12,1 e	4,7 d	11497,5 b
NP-c-L1	56,4 c	1,8 f	12,3 e	4,6 d	9164,2 c
CS-f-L2	66,1 b	2,0 e	13,2 d	5,4 c	7227,5 d
CX-f-L1	80,0 a	3,0 b	12,2 e	4,3 d	7102,7 d
BG-c-L4	57,9 c	1,5 g	11,0 g	5,5 b	6276,7 d
NP-b-L2	64,0 b	1,9 f	13,0 d	5,2 c	5483,3 e
VA-f-L3	60,4 c	2,0 e	10,9 g	4,7 d	5425,0 e
CB-f-L4	67,0 b	2,1 e	12,5 e	5,0 c	5303,3 e
CN-c-L2	63,2 b	1,8 f	12,4 e	4,9 c	4910,0 e
SM-f	52,7 d	1,6 g	10,8 g	4,5 d	4563,3 e
CS-b-L1	63,7 b	2,1 e	13,7 c	5,1 c	4333,3 e
VA-p-L4	62,4 b	1,9 f	12,1 e	5,2 c	4026,7 e
GA-f-L2	54,4 d	1,7 g	12,7 d	4,6 d	3740,0 e
VA-f-L6	64,2 b	1,8 f	12,1 e	5,4 c	3696,7 e
VA-c-L2	53,4 d	1,7 g	12,5 e	5,1 c	3623,3 e
BG-c-L2	52,5 d	1,6 g	13,0 d	5,0 c	3346,7 e
CX-c-L2	60,9 c	2,0 e	12,9 d	5,6 b	3133,3 f
GM-f-L1	46,4 e	1,2 i	13,7 c	5,0 c	2073,3 f
CA-p	62,7 b	2,0 e	11,9 e	5,0 c	2042,7 f
CB-p-L4	39,4 f	1,4 h	12,9 d	6,1 a	930,7 g
VA(b)-b-L6	52,8 d	1,6 g	8,9 i	4,0 d	900,4 g
VA-b-L8	62,3 b	1,9 f	12,1 e	5,1 c	900,3 g
AW-f-L1	39,4 f	1,5 g	12,4 e	5,9 a	746,1 g
CA-b	47,7 e	1,7 g	15,1 b	5,8 b	732,9 g
RQ-c	40,6 f	1,4 h	12,6 d	5,1 c	729,3 g
GA-c-L3	79,3 a	2,7 c	11,7 f	4,5 d	712,8 g
CX-b-L2	67,9 b	2,4 d	12,1 e	6,3 a	663,7 g
SM-c	41,5 f	1,3 h	12,1 e	4,7 d	663,7 g
CO-c	54,2 d	2,0 e	14,9 b	6,0 a	536,6 g
CA-f	48,5 e	1,5 g	12,1 e	5,3 c	485,4 g
VI-c	33,5 g	1,1 i	13,8 c	5,7 b	410,2 g
CS-b-L2	66,6 b	2,1 e	10,9 g	4,4 d	396,9 g
IR-b	43,0 f	1,5 g	7,5 j	2,7 f	356,9 g
CB-f-L1	58,3 c	1,7 g	13,1 d	5,0 c	351,0 g
CS-p-L1	47,8 e	1,5 g	12,4 e	4,6 d	301,5 g
NP-b-L1	43,2 f	1,5 g	11,1 g	4,4 d	300,4 g
CB-p-L1	41,4 f	1,5 g	12,4 e	5,7 b	286,0 g
AW-p-L2	36,6 g	1,4 h	12,5 e	5,0 c	228,4 g
GM-b-L1	49,5 e	1,6 g	17,7 a	5,1 c	109,0 g
GM-p-L2	54,7 d	1,7 g	12,1 e	5,0 c	91,0 g
VA(a)-b-L6	49,9 e	1,6 g	12,1 e	4,9 c	83,6 g

GM-b-L1	66,2 b	2,2 e	11,7 f	4,9 c	82,7 g
CN-p-L2	49,4 e	1,5 g	11,9 e	5,2 c	51,7 g
VA-b-L2	66,7 b	2,1 e	12,6 d	5,1 c	47,5 g
SJ-p-L1	60,7 c	1,9 f	10,0 h	4,4 d	46,6 g
CS-p-L2	59,1 c	2,0 e	6,6 l	2,7 f	46,5 g
AM-b	43,5 f	1,3 h	14,9 b	5,4 c	43,3 g
AW-p-L1	55,8 c	2,0 f	11,6 f	4,8 c	37,7 g
CB-f-L3	46,2 e	1,7 g	12,9 d	5,3 c	36,6 g
CB-f-L2	39,6 f	1,4 h	15,1 b	5,0 c	34,4 g
IN-f	80,0 a	3,5 a	13,7 c	5,7 b	23,5 g
AL-b	41,3 f	1,3 h	6,0 l	3,7 e	4,8 g
CN-f-L1	41,5 f	1,5 g	13,7 c	5,2 c	0,8 g
Média	54,9 ± 11,3	1,8 ± 0,4	12,2 ± 1,9	4,9 ± 0,6	2250,8 ± 3083,1
CV %	5,0	7,1	3,4	5,4	31,4

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### Complexo *C. gloeosporioides*

Para *C. gloeosporioides*, a comparação de médias entre o número de esporos dividiu os isolados em quatro grupos, sendo que os isolados GM-f-L2, CN-p-L2, GA-f-L2 e GM-b-L2 apresentaram os maiores valores de esporulação, diferindo dos demais que formaram um único grupo (Tabela 5).

Através da análise do IVCM formaram-se seis grupos significativamente diferentes, sendo que a média para este complexo foi de 2,6 mm/dia. A variação entre o maior e o menor IVCM foi relativamente grande. O maior IVCM foi obtido com o isolado CO-c, com 4,2 mm/dia e o menor com o isolado AW-c-L1, com 1,6 mm/dia. Para o DFC a maioria dos isolados apresentaram crescimento máximo, de 80 mm, contudo, foram formados quatro grupos distintos. Os valores médios encontrados para comprimento e largura de conídios foi 14,5 µm (variando de 7,15 µm a 17,46 µm) e 5,3 µm (variando de 2,1 µm a 6,8 µm), respectivamente. Embora o tamanho médio dos conídios dos isolados foi próximo ao descrito por Milholland (1988) para esta espécie (de 12- 21 × 3,5-6 µm) e por Sawant et al. (2012(a)), que foi de 10,1-14,6 × 4,2-4,9 µm, alguns isolados apresentaram comprimento menor e excederam quanto a largura.

Weir et al. (2012) afirmam que dentro de uma espécie, os tamanhos dos conídios são razoavelmente consistentes independentemente da origem geográfica ou do hospedeiro. Contudo, as diferenças entre as espécies são frequentemente pequenas e pode ocorrer sobreposição. Assim como foi observado no presente estudo, uma vez que entre

as espécies dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* ocorreram sobreposição para a maioria dos isolados, principalmente em relação a largura dos esporos.

**Tabela 5.** Capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>) após sete dias, diâmetro final das colônias (DFC) sete dias após a repicagem (DFC; mm), comprimento e largura ( $\mu$ m) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia) de isolados do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, em meio de cultura BDA, obtidos de plantas de videira com sintomas típicos de antracnose.

Identificação dos isolados	DFC (mm)	IVCM (mm/dia)	Comprimento dos conídios ( $\mu$ m)	Largura dos conídios ( $\mu$ m)	n° (105) conídios/ml
GM-f-L2	80,0 A	2,5 c	13,4 e	5,7 c	7376,66 a
CN-p-L2	73,2 B	2,1 e	13,1 e	5,4 d	5150,8 b
GA-f-L2	63,1 C	2,0 e	14,0 d	5,2 d	4835,8 b
GM-b-L2	80,0 A	2,3 d	13,7 d	5,2 d	1930,8 c
SM-f	80,0 A	2,6 c	14,9 c	5,2 d	648,0 d
BG-b-L3	76,9 B	2,3 d	15,1 c	5,0 d	498,0 d
GA-c-L3	74,1 B	2,3 d	15,0 c	5,3 d	370,0 d
VA-b-L2	74,3 B	2,2 e	15,2 c	5,2 d	284,0 d
SJ-p-L1	80,0 A	2,3 d	15,2 c	5,6 c	255,0 d
BG-c-L1	63,9 C	2,1 e	15,0 c	6,1 b	126,8 d
NP-p-L2	80,0 A	3,0 b	14,9 c	6,1 b	114,0 d
VA-c-L4	60,9 C	1,8 f	15,1 c	5,7 c	108,0 d
BG-c-L2	80,0 A	2,6 c	15,7 c	5,4 d	56,4 d
CS-b-L2	66,6 C	2,1 e	15,3 c	2,1 e	55,5 d
CN-f-L2	80,0 A	3,1 b	15,7 c	5,7 c	54,2 d
VA-b-L6	64,2 C	1,8 f	15,1 c	5,7 c	47,7 d
SJO-b	80,0 A	3,2 b	7,2 g	2,5 f	35,7 d
DV-b	80,0 A	4,0 a	14,7 c	5,4 d	29,2 d
IN-f	68,2 C	2,4 d	13,3 e	4,5 e	24,7 d
AW-p-L2	40,6 d	1,9 e	14,9 c	5,2 d	23,6 d
AW-c-L1	44,3 d	1,6 f	15,5 c	6,2 b	22,9 d
CX-c	80,0 a	2,5 c	13,9 d	5,5 d	22,3 d
GA-p-L3	77,8 a	2,6 c	16,1 b	5,4 d	16,0 d
CB-f-L4	80,0 a	2,6 c	15,0 c	5,4 d	14,8 d
CO-c	80,0 a	4,2 a	16,0 b	5,8 c	14,7 d
CB-c-L1	64,6 c	2,3 d	15,8 c	5,9 c	12,5 d
IN-c	80,0 a	4,0 a	12,9 e	4,9 e	10,0 d
NA-c	80,0 a	3,3 b	11,0 f	4,5 e	8,0 d
IN-p	80,0 a	2,9 c	17,5 a	6,8 a	7,8 d
NA-f	80,0 a	3,8 a	14,0 d	5,2 d	5,6 d
GA-b-L3	82,0 a	2,5 c	16,9 a	5,8 c	1,5 d
CN-c-L2	80,0 a	4,0 a	13,3 e	5,4 d	1,3 d

Média	73,6±10,4	2,6±0,7	14,5±1,8	5,3±0,9	476,9±1259,6
CV %	4,3	6,74	3,13	6,29	36,82

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

*C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *E. ampelina* produzem conídios hialinos, não-septados. Porém há diferença no tamanho médio dos conídios, sendo em média de 15-20 x 4-6 µm para *Colletotrichum* e 4-7,5 x 2-3,5 µm para *E. ampelina* (<http://www.mycobank.org>). Apenas os isolados de *C. acutatum* Al-b, CS-p-L1 e IR-b apresentaram tamanho e comprimento semelhantes ao descrito para *E. ampelina*. Os isolados SJO-b e VA-b-L6 do complexo *C. gloeosporioides* também produziram conídios menores que o descrito para a espécie. Os demais isolados produziram conídios maior que 10µm de comprimento.

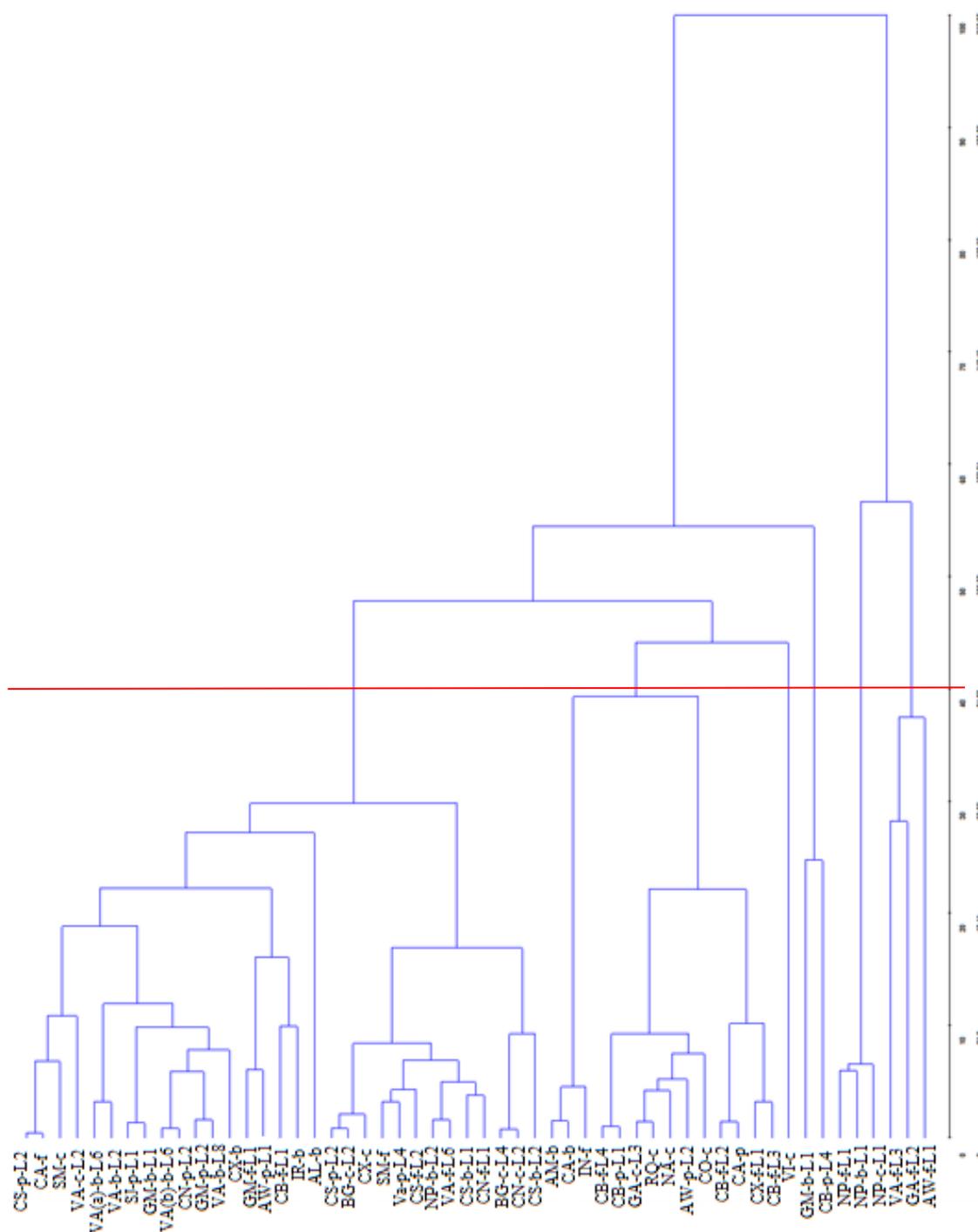
Outro fator relevante foi que as culturas das colônias de *E. ampelina* apresentam crescimento lento (3,3-5,5 cm<sup>2</sup> após 15 dias de crescimento) (POOLSAWAT et al., 2009), contrastando com o crescimento observado para os isolados do presente estudo.

Os valores médios das características avaliadas nas Tabelas 4 e 5 corroboram com a divisão dos isolados em dois complexos do gênero *Colletotrichum*: *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Peres et al. (2004) e Andrade et al. (2007) demonstraram que isolados de *C. acutatum* cresceram mais lentamente quando comparado com *C. gloeosporioides*, sendo esses parâmetros amplamente utilizados na caracterização de fungos desse gênero. Afirmaram ainda que a taxa de crescimento pode ser considerada uma das únicas características realmente estáveis para se fazer a caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp., corroborando com as diferenças encontradas para os dois complexos no presente estudo. A exceção foram os isolados do complexo *C. acutatum* CX-f-L1 e IN-f, que apresentaram crescimento máximo ao final do sétimo dia, e os isolados do complexo *C. gloeosporioides* AW-p-L2 e AW-c-L1, que apresentaram DFC de 40,6 e 44,26 mm, respectivamente. Esses isolados foram mantidos nos respectivos grupos porque apresentaram comprimento e largura de conídios condizente com a espécie na qual estão agrupados.

Aliado a isso, observa-se que o DFC, embora tenha ocorrido maior variação entre os isolados, corresponde aos dados de IVC, ou seja, os isolados que apresentaram IVC maior também apresentaram maior diâmetro das colônias ao final do sétimo dia de avaliação.

Embora as médias observadas para as variáveis quantitativas tenham sido compatíveis com as espécies encontradas na análise de PCR dos isolados, observa-se grande variabilidade dentro das espécies. Sendo assim, foi utilizada a análise multivariada de agrupamento para analisar de forma conjunta as variáveis dentro de cada espécie. Na Figura 3 é apresentado o dendrograma de dissimilaridade baseado no método de agrupamento UPGMA das características de n° de conídios, IVCM, DFC e comprimento e largura dos conídios dos 54 isolados de *C. acutatum*. Utilizando como critério 60% de similaridade, os isolados foram divididos em seis grupos.

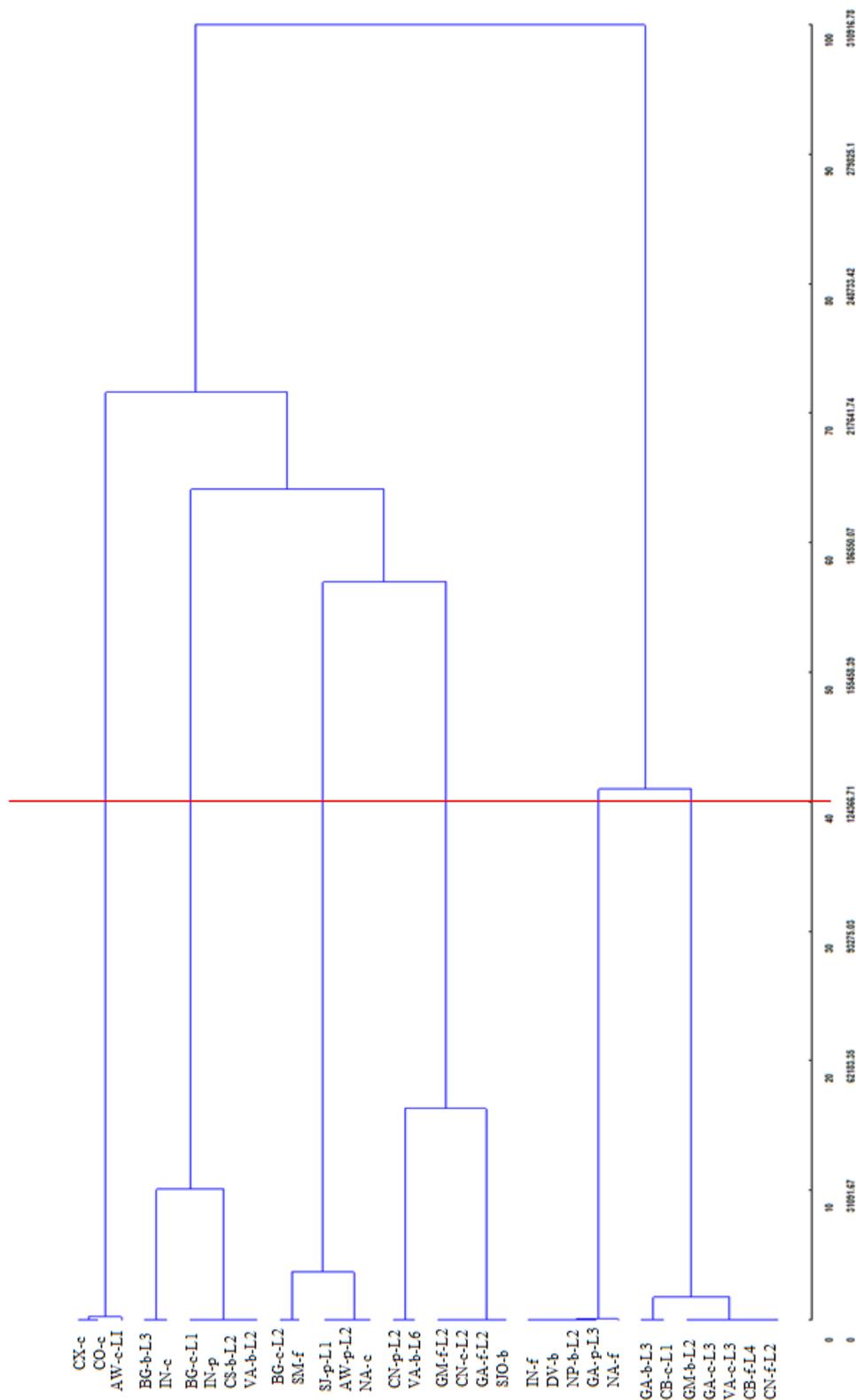
Observa-se que houve diferença mesmo entre isolados de um mesmo local de coleta, como por exemplo, os isolados GM-f-L1 e GM-b-L1, os quais foram coletados em Gramado-RS, no mesmo local, sendo o primeiro de folha e o segundo de baga. Dentre as variáveis utilizadas para obter o dendrograma, o n° de esporos/ml e o DFC foram os fatores que mais contribuíram para diferenciar os isolados, com 37,74 % e 27,83%, respectivamente. O comprimento dos conídios contribuiu com 17,35 %, largura com 5,48% e IVCM com 11,54%.



**Figura 3.** Dendrograma de dissimilaridade genética de 54 isolados do complexo *Colletotrichum acutatum* originários de diversas regiões produtoras de uva dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, baseado nas características capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>), diâmetro final das colônias (DFC; mm), comprimento, largura e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia), utilizando o método de agrupamento UPGMA.

Assim como para o complexo *C. acutatum*, no complexo *C. gloeosporioides* o n° de esporos/ml e o DFC foram os fatores que mais contribuíram para diferenciar os isolados, com 39,57% e 39,33% da variação, respectivamente. O IVCM contribuiu com 12,58%, comprimento dos conídios com 7,95 % e largura foi praticamente indiferente, com 0,54%.

Com base nos grupos formados pela análise multivariada, ao menos um indivíduo representativo de cada grupo foi utilizado para caracterizar as variáveis: margem, aparência, crescimento, esporulação e cor da massa de conídios das colônias (Apêndices 1 e 2 e Tabela 6).



**Figura 4.** Dendrograma de dissimilaridade genética de 32 isolados do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* originários de diversas regiões produtoras de uva dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, baseado nas características capacidade de esporulação ( $n^{\circ} \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>), diâmetro final das colônias (DFC; mm), comprimento, largura e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; mm/dia), utilizando o método de agrupamento UPGMA.

Todos os grupos do complexo *C. acutatum* apresentaram margem de crescimento regular e aparência lisa. Os grupos I, II e IV foram respresentados por mais de um isolado devido a diferença em alguma característica da colônia (Tabela 6). O grupo I, por exemplo, que pelos caracteres morfológicos quantitativos os isolados CB-p-L4, SM-c, VA-c-L2 e CS-f-L2 foram colocados no mesmo grupo, mas o isolado CB-p-L4 embora apresente cor da massa de conídios salmão, assim como o isolado VA-c-L2, diferencia-se deste por apresentar crescimento plano e não cotonoso.

Para os grupos do complexo *C. gloeosporioides*, os grupos I e VI apresentaram margem de crescimento irregular, contudo os seis grupos apresentaram aparência lisa, três deles apresentaram crescimento plano (grupos I, III e V) e os outros três crescimento cotonoso. Apenas o grupo IV apresentou esporulação distribuída por toda a placa (Tabela 6). A coloração da massa de conídios foi predominantemente salmão pra os grupos do complexo *C. acutatum* e preta pra os grupos do complexo *C. gloeosporioides*.

**Tabela 6.** Características morfológicas das colônias dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* isolados de videira com sintomas de antracnose.

Grupos morfológicos	Margem	Aparência	Crescimento	Esporulação	Cor da Massa de Conídios	
<i>Colletotrichum acutatum</i>						
I	CB-p-L4	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Salmão
	SM-c	Regular	Lisa	Plano	Por toda placa	Preto acastanhado
	VA(a)-b-L6	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis concêntricos	Salmão
	CS-f-L2	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Salmão com preto
II	RQ-c	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Salmão com preto
	AM-b	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Preto acastanhado
	NA-c	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis concêntricos	Salmão
	CX-f-L1	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa	Cinza
III	VI-c	Regular	Lisa	Cotonoso	Por toda placa	Cinza
IV	CB-f-L1	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Cinza
	GM-b-L1	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Preto acastanhado

V	NP-b-L1	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Salmão
VI	AW-f-L1	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Salmão
<i>C. gloesporioides</i>						
I	(CX-c)	Irregular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Preto
II	(IN-c)	Regular	Lisa	Cotonoso	Anéis concêntricos	Preto
III	(AW-c-L1)	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Salmão com preto
IV	(CN-p-L2)	Regular	Lisa	Cotonoso	Toda a placa	Preto
V	(NA-f)	Regular	Lisa	Plano	Anéis concêntricos	Salmão com preto
VI	(GM-b-L2)	Irregular	Lisa	Cotonoso	Anéis concêntricos	Cinza

A cor da massa de conídios variou entre os grupos. As colônias de ambos os complexos apresentaram diversidade com relação à cor da massa de conídios e micélios. A coloração salmão e salmão com preto foi predominante para *C. acutatum*. Segundo Wharton e Diéguez-Uribeondo (2004), estas colorações são descritas como características desse complexo. Colorações mais escuras, como preto, foram observadas para o complexo *C. gloesporioides*, que de acordo com Sutton (1992), é característica de *C. gloesporioides* (Tabela 6).

Essa grande diversidade morfológica entre os isolados dos complexos *C. acutatum* e de *C. gloesporioides* sugerem a presença de mais de uma espécie. Embora atualmente é aceito que tanto *C. gloesporioides* e *C. acutatum* são complexos de espécies, os iniciadores CgInt e CaINT2 amplificam a região dos membros das espécies dos complexos (GUERBER et al., 2003; CAI et al., 2009), ressaltando os resultados obtidos nas avaliações moleculares.

Apesar de alguns isolados terem apresentado características padrão para o gênero *Colletotrichum*, de acordo com vários autores (TOZZE JÚNIOR et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; FREEMAN, 1998) a análise morfológica possui limitações, uma vez que, as mesmas podem ter sido influenciadas por fatores ambientais ou pela própria variabilidade do patógeno. Estas características são subjetivas, variando de acordo com a interpretação de cada autor, o que torna indispensável a análise molecular dos isolados. Por isso, utilizou-se de ferramentas de biologia molecular para que as identificações dos patógenos fossem aferidas com maior precisão.

### 3.4.4 Sequenciamento

Ao menos um isolado característico de cada um dos grupos definidos com base na análise de agrupamento das características morfológicas (Tabela 6) foi selecionado para sequenciar as regiões genômicas ITS, CAL, GAPDH e TUB. Contudo, mesmo após duas tentativas, não foi possível obter as sequências para os quatro genes e também de todos os isolados.

Dos seis grupos morfológicos formados para o complexo *C. acutatum* apenas para o grupo III, formado apenas pelo isolado VI-c, não foi possível obter a sequência para a região ITS. Já para *C. gloeosporioides* todos os seis grupos foram sequenciados para a região ITS, GAPDH e/ou CAL. A especificação dos isolados e a comparação das sequências nucleotídicas do banco de dados NCBI pode ser observada na Tabela 7 e Tabela 2.

O mesmo resultado observado quando sequenciou-se os genes ITS e GAPDH, observou-se na Tabela 7 para os genes ITS e CAL, ou seja, o indicativo de se tratar de mais de uma espécie dentro dos complexos *acutatum* e *gloeosporioides*. Como por exemplo o isolado CB-f-L1, para o qual o gene ITS apresentou 100% de identidade tanto para *C. acutatum* como para *C. nymphaeae* e *C. simmondsii*, já o gene CAL além de também apresentar 100% de identidade para *C. simmondsii* apresentou o mesmo valor para *C. scovillei* e *C. citri*.

**Tabela 7.** Comparação das sequências nucleotídicas das regiões ITS e CAL, de isolados obtidos de lesões de antracnose em videira, com sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information website*).

Isolado	Gene	Descrição	Max Score	Total Score	Query cover	E-value	Identity	Número de acesso
AW-f-L1	ITS	<i>Colletotrichum acutatum</i>	893	893	100%	0,0	100%	KU933355.1
		<i>Colletotrichum simmondsii</i>	893	893	100%	0,0	100%	KT844640.1
	CAL	<i>Colletotrichum citri</i>	1295	1295	100%	0.0	100%	KT600790.1
		<i>Colletotrichum simmondsii</i>	1290	1290	100%	0.0	99%	KT600793.1
CB-p-L4	ITS	<i>Colletotrichum acutatum</i>	878	878	100%	0.0	100%	KU737519.1

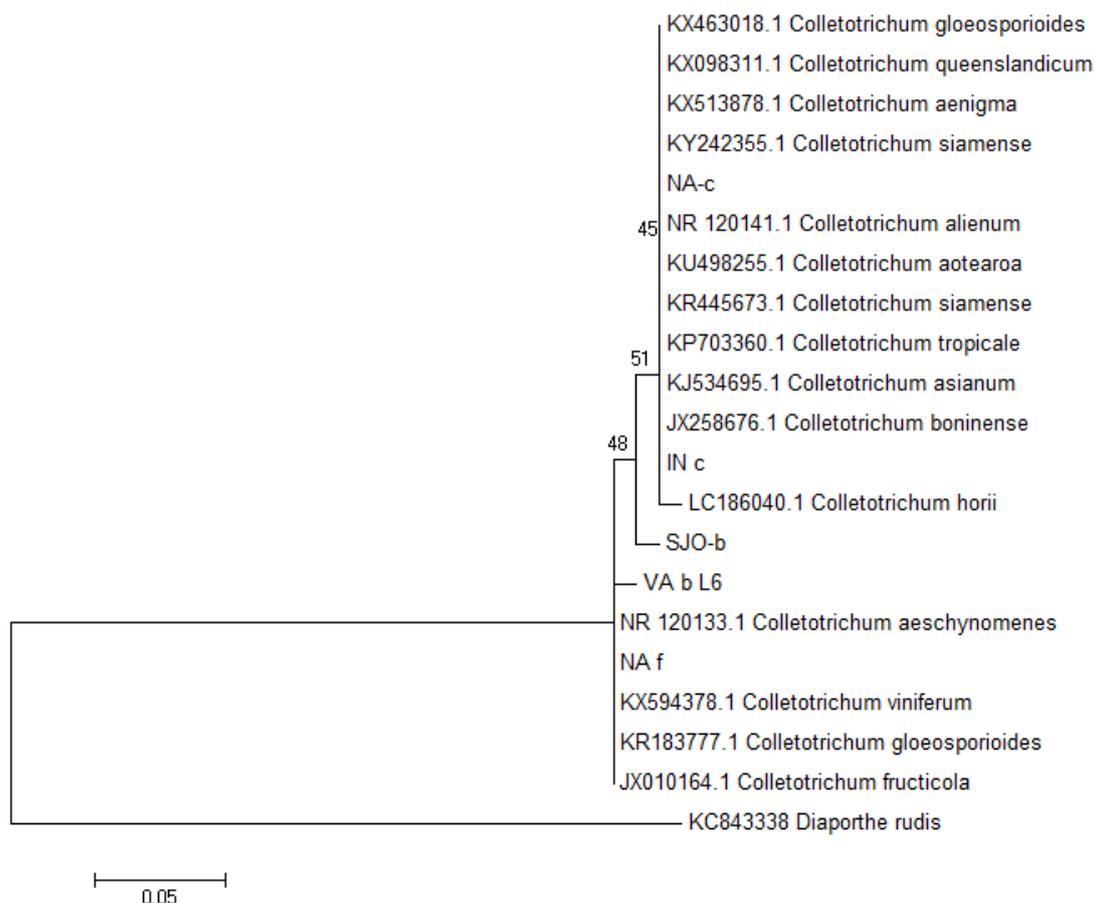
	CAL	<i>Colletotrichum henanense</i>	326	326	65%	6e-85	80%	KM610177.1
		<i>Colletotrichum acutatum</i>	891	891	100%	0.0	100%	KU933355.1
CB-f-L1	ITS	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	891	891	100%	0.0	100%	KU498271.1
		<i>Colletotrichum simmondsii</i>	891	891	100%	0.0	100%	KT844640.1
		<i>Colletotrichum citri</i>	1271	1271	100%	0.0	100%	KT600790.1
	CAL	<i>Colletotrichum simmondsii</i>	1266	1266	100%	0.0	99%	KT600793.1
<i>Colletotrichum scovillei</i>		1249	1249	100%	0.0	99%	KP943586.1	
	ITS	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	961	961	100%	0.0	100%	KX355184.1
VA-b-L6		<i>Colletotrichum viniferum</i>	1064	1064	98%	0.0	96%	JX009409.1
	CAL	<i>Colletotrichum aenigma</i>	1059	1059	98%	0.0	96%	KU251793.1
		<i>Colletotrichum fructicola</i>	1053	1053	98%	0.0	96%	KU251790.1
	ITS	Não amplificou						
AW-c-L1		<i>Colletotrichum theobromicola</i>	117	1177	100%	0.0	100%	KT223826.1
	CAL	<i>Colletotrichum viniferum</i>	966	966	100%	0.0	94%	JX009409.1
	ITS	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	416	416	100%	1e-112	99%	KT390192.1
NA-f		<i>Colletotrichum fructicola</i>	107	1070	100%	0.0	95%	KJ769239.1
	CAL	<i>Colletotrichum viniferum</i>	106	1064	100%	0.0	95%	JX009409.1
	ITS	Não amplificou						
CN-f-L2		<i>Colletotrichum camelliae</i>	129	1293	99%	0.0	99%	KJ954630.1
	CAL	<i>Colletotrichum fructicola</i>	127	1277	99%	0.0	99%	KU251812.1
	ITS	<i>Colletotrichum siamense</i>	730	730	100%	0.0	100%	KU251558.1
IN-c	CAL	<i>Colletotrichum siamense</i>	124	1240	100%	0.0	100%	KU251800.1

Para as árvores filogenéticas, montadas de acordo com a máxima parcimônia, foi utilizada apenas a sequência de nucleotídeos da região ITS.

A árvore formada para o complexo *C. gloeosporioides* confirma os resultados encontrados no BLAST. Os resultados sugerem que há diferentes espécies dentro dos dois complexos associados com os sintomas da antracnose da videira. Contudo, observa-se que a porcentagem de “bootstrap” em todos os clados foram menores que 70%, sendo assim consideradas ligação fraca (Figura 5). Os isolados NA-f e VA-b-L6 foram os únicos a agruparem no meso clado que *C. gloeosporioides*, *C. viniferum* e *C. frutícola*, corroborando com os resultados obtidos no BLAST, contudo, a sub espécie *C. aeschynomenes* também ficou neste clado e, de acordo com Weir et al., (2012), esse patógeno está descrito na literatura causando doença apenas em plantas do gênero *Aeschynomene*.

A técnica estatística chamada *bootstrapping* é uma confirmação das relações representadas na árvore. De acordo com Felsenstein (1985), o *bootstrap* é o teste mais usado para se avaliar a confiança numa filogenia molecular. Ela permite avaliar a confiança no suporte de cada nó da topologia escolhida, mediante repetição da análise filogenética sobre pseudo-réplicas do alinhamento original. Desta forma, alguns sítios serão amostrados mais de uma vez enquanto outros estarão fora do pseudo-alinhamento. Assim, árvores-réplicas são construídas, cada uma baseada em conjunto de dados diferentes. No final, o teste compara cada uma das árvores-réplicas com a árvore original e o valor do *bootstrap* obtido corresponde ao percentual de vezes que o grupamento foi recuperado nas arvores-réplicas (MATIOLI, 2001).

Alguns autores concluíram que um ponto de corte razoável seria na análise de *bootstrap* de 70%, embora a interpretação exata do limite aceitável da proporção seja abstrata, mas quanto maior a proporção maior a confiança na topologia daquele nó (ZHARKIKH e LI, 1992; HILLIS e BULL, 1993). Dessa forma todos os isolados apresentaram associação com alguma espécie com bootstrap acima de 70%.

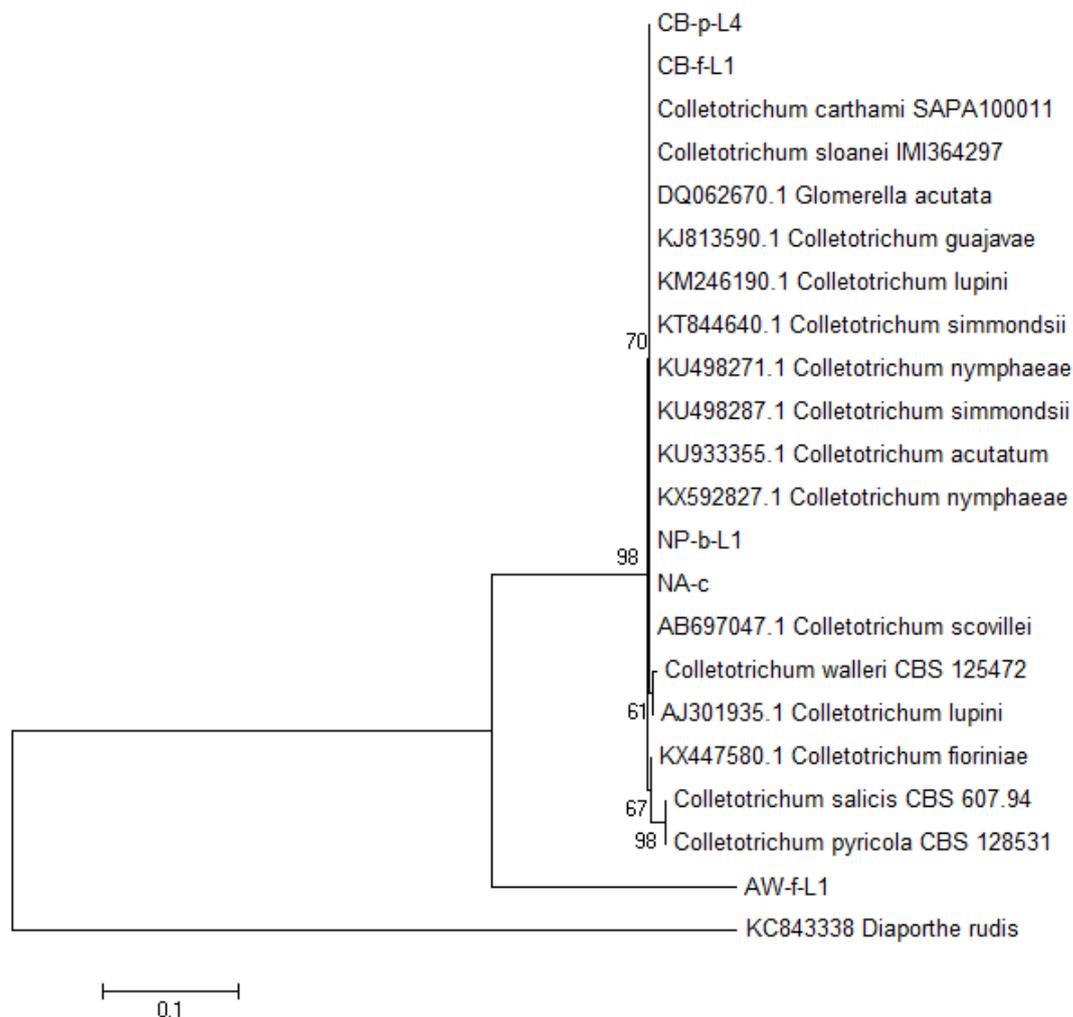


**Figura 5.** Dendrograma gerado pelo método *Maximum Likelihood*, a partir do “software” MEGA 6.0. Os códigos à direita representam os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, sequenciados a partir do gene ITS e, os números entre os ramos representam a porcentagem de “bootstrap”.

Na árvore montada a partir das sequências dos isolados de *C. acutatum* apenas um isolado, AW-f-L1 formou um clado com ligação de 98% de *bootstrap* com os demais isolados. Os demais isolados, CB-f-L1, CB-p-L4, NA-c e NP-b-L1 ficaram agrupados no mesmo clado que as demais espécies (Figura 6).

Em estudo amplo realizado por Dam et al. (2012), dos 331 isolados estudados 31 foram diferenciados em espécies, das quais, 29 espécies estão dentro do complexo de espécies de *C. acutatum*, incluindo 21 espécies que provaram ser novas para a ciência, ou seja, é possível que os isolados do presente estudo NA-c e NP-b-L1 pertençam a alguma dessas novas espécies, haja vista que ambos apresentaram, de acordo com o BLAST, 99% de identidade com a espécie *C. nymphaeae*, e agruparam com dois isolados dessa espécie. Contudo, mesmo as características de aspecto e coloração e colônia tenham sido iguais (Anexo 1), de acordo com esses autores, os conídios de *C. nymphaeae* tem em média

comprimento de  $16,1 \pm 2,3$  (desvio padrão: DP) e largura de  $4,9 \pm 0,7$  (DP)  $\mu\text{m}$ , valor maior do que o observado para os isolados NA-c e NP-b-L1 (Tabela 2).



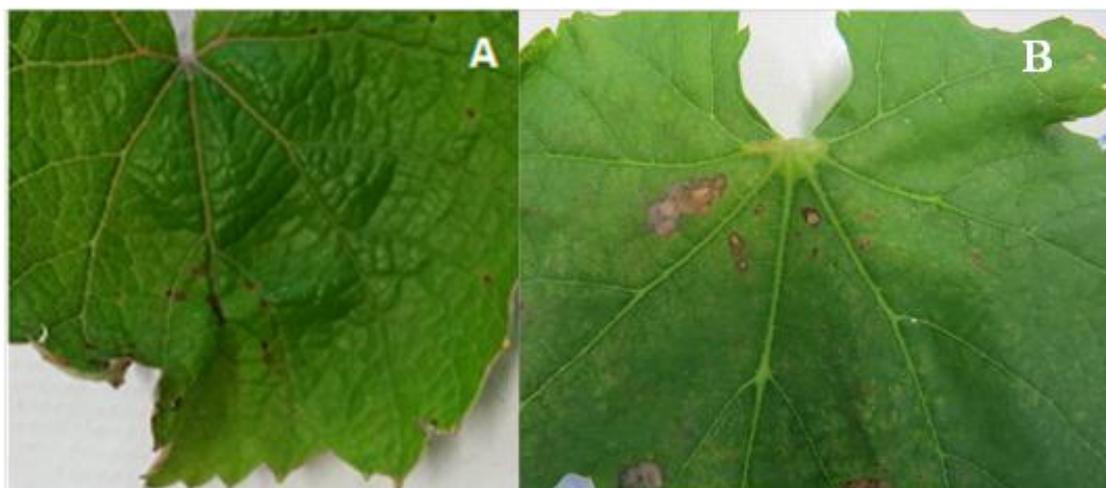
**Figura 6.** Dendrograma gerado pelo método *Maximum Likelihood*, a partir do “software” MEGA 6.0. Os códigos à direita representam os isolados de *Colletotrichum acutatum* sequenciados a partir do gene ITS e, os números entre os ramos representam a porcentagem de “bootstrap”.

Várias espécies de *Colletotrichum* foram relatadas como causadoras de doença na videira, incluindo *C. acutatum* (SHIRAISHI et al., 2007; WHITELAW-WECKERT et al., 2007; GREER et al., 2011), *C. aenigma* e *C. hebeiense* (YAN et al., 2014), *C. crassipes* (Speg.) Arx (HYDE et al., 2009), *C. capsici* e *C. gloeosporioides* (SAWANT et al., 2012(a)), *C. fructicola* (PENG et al., 2012), *C. vitis* (SACCARDO, 1913), *C. viniferum* (PENG et al., 2012) e o primeiro relato de *C. nymphaeae* causando antracnose em ramos

de videira foi realizado recentemente, na China, por Liu et al. (2016). Grande parte dessas espécies apresentaram elevada identidade com as sequencias obtidas no presente estudo.

Em outras culturas como é o caso da maçã, a doença podridão amarga é causada por espécies dos complexos de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (JOHNSTON et al., 2005), como foi identificado no presente estudo para o caso de antracnose em videira. A alta diversidade genética entre os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* é uma condição presente nos patossistemas silvestres preservados e é aumentada nos agroecossistemas. Possivelmente a maior diversidade genética na população de *Colletotrichum* spp. e a ocorrência como agente causal de antracnose em videira, resulta do longo período de coexistência dessa gênero com às plantas de videira, e pela elevada pressão de seleção decorrente das profundas modificações do ecossistema vitícola especialmente do uso intensivo de defensivos empregados na cultura nos últimos anos.

O teste de patogenicidade foi realizado com isolados sequenciados de *C. acutatum* (CB-f-L1 e AW-f-L1) e *C. gloeosporioides* (AW-c-L1 e VA-b-L6) e todos mostraram-se patogênicos nas cultivares de uva Bordo e Niágara. O início do aparecimento dos sintomas foi em média de 14 dias, surgindo como manchas circulares castanho escuras, levemente deprimidas, que necrosam posteriormente (Figura 7 A e B). Folhas em condições de alta umidade próximo a saturação, principalmente nas primeiras 48 horas, foi fator predominante para a ocorrência da doença antes do período médio de 14 dias. Após o aparecimento dos sintomas o patógeno foi reisolado e apresentou as mesmas características descritas na literatura para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (AMORIM e KUNIYUKI 2005; ELLIS e ERINCIK 2008).



**Figura 7.** Sintomas de antracnose em folhas de videira cultivar Niágara inoculadas com os isolados sequenciados do Grupos I e Grupo II após 14 dias de inoculação por aspersão. (A) *Colletotrichum acutatum* e (B) *C. gloeosporioides*.

A espécie *C. gloeosporioides* é relatado por Kummuang et al. (1996); Amorim e Kuniyuki (2005) e Greer et al. (2011) como patógeno causador de podridão de cachos em *V. vinifera*, uvas americanas e *M. rotundifolia*, contudo, no presente estudo identificou-se este patógeno causando lesões em bagas, mas também em folha, pecíolo e caule. Por outro lado, não foi encontrado na literatura brasileira relatos de ocorrência de espécies do complexo *C. acutatum* relacionado à antracnose da videira. Neste estudo foi o complexo identificado com o maior número de isolados.

A distribuição geográfica dos isolados de *C. gloeosporioides* (Figura 1) e frequência encontrada em todos os órgãos avaliados da planta (Tabela 4) é indicativo de que o predomínio de isolados de *C. acutatum* poderá ser alterado, ao longo do tempo, chegando ao equilíbrio, ou, possivelmente, com sobreposição de *C. gloeosporioides* à população de *C. acutatum*. A alteração do padrão dos cultivos, por meio do melhoramento, a ampliação de fronteiras agrícolas, e o uso intensivo de defensivos agrícolas são fatores que aumentam a força da seleção exercida sobre as populações de patógenos, favorecendo a geração de novos genes de virulência e aumento no grau de polimorfismo na estrutura dessas populações e levando uma espécie se sobressair a outra ou mesmo gêneros que antes não eram consideradas patogênicos a determinado hospedeiro se comportarem de forma diferente, como ocorreu no caso do presente estudo.

### 3.5 CONCLUSÕES

Há diversidade genética entre isolados de *Colletotrichum* associados a antracnose em folhas, caules, pecíolos e bagas de videira.

Não foi identificada a presença de *Sphaceloma ampelinum* em nenhuma das amostras coletadas.

Não há especificidade entre espécies dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* associadas a antracnose da videira e os respectivos órgãos amostrados ou procedências.

De forma inédita, foi comprovada a patogenicidade de isolados pertencentes aos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de videira no Brasil.

#### 4 *Pestalotiopsis* spp. EM LESÕES NECRÓTICAS DE FOLHAS, RAMOS E BAGAS DE VIDEIRA NO SUL DO BRASIL

##### 4.1 RESUMO

Espécies de *Pestalotiopsis* são comuns em ecossistemas tropicais e temperados e são muitas vezes isolados como endofíticos, saprofíticos ou patogênicos. Poucos são os relatos de *Pestalotiopsis* spp. como doença de importância primária em videira, especialmente em sintomas típicos de antracnose. Recentemente, *Pestalotiopsis* foi relatado na Coreia do Sul, Austrália e EUA em ramos, tecido lenhoso, frutos, flores e folhas de videira, sendo o segundo fungo mais comumente isolado de cancos de videira no Texas/EUA. O presente estudo objetivou caracterizar a ocorrência de *Pestalotiopsis* spp. em folhas, ramos e frutos de videira, com sintomas de antracnose, no sul no Brasil. Amostras de tecidos vegetais de videira (*Vitis* spp.) com sintomas típicos de antracnose foram coletadas em 21 municípios dos três estados da Região Sul do Brasil, no período de novembro de 2013 a março de 2015 e isolados em meio de cultura batata dextrose ágar. Para a caracterização morfológica dos isolados de *Pestalotiopsis* spp. considerou-se o tamanho dos conídios (largura e comprimento), tamanho e número de apêndices apicais, índice de velocidade de crescimento (IVCM) e diâmetro final da colônia (DFC). A patogenicidade dos isolados foi testada em folhas e frutos de videira. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro e os isolados agrupados pela análise multivariada. Um indivíduo representativo de cada grupo foi sequenciado na região genômica ITS. Os isolados apresentaram variação morfológica e foram agrupados em cinco grupos. A comparação da sequência nucleotídica obtida para os isolados através do BLAST e da análise filogenética confirmaram a presença de *Pestalotiopsis* spp., sugerindo a presença de mais de uma espécie do gênero. O teste de patogenicidade comprovou a capacidade dos isolados em causar lesões em folhas e podridão em frutos de videira. Este estudo representa o primeiro relato da identificação e caracterização do gênero *Pestalotiopsis* causando doenças em videira no Brasil utilizando abordagens morfológicas e moleculares.

## 4.2 INTRODUÇÃO

A videira é a espécie frutífera mais antiga domesticada pelo homem. Registros associam seu cultivo às mais antigas civilizações que se tem conhecimento. Isso se deve principalmente pelo produto originário desta fruta, o vinho, que por consequência a torna a terceira fruta mais produzida mundialmente (THIS et al., 2006; STATISTA, 2013).

O Brasil está entre os quinze maiores produtores mundiais (FAO, 2014). Além do impacto na produção nacional de frutas, agrega valor em outros setores como o turismo e a gastronomia (MELLO, 2015). A cultura ocupa atualmente uma área de 79.094 hectares, com vinhedos desde o extremo Sul do país até regiões próximas à Linha do Equador, com uma produção nacional de 1.499.353 toneladas em 2015, sendo que a Região Sul contribui com 66% dessa produção (IBGE, 2016).

A videira quando cultivada em condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de fungos, como elevada umidade e temperaturas amenas, fica sujeita à incidência de diversas doenças, que podem gerar graves prejuízos se não forem controladas apropriadamente. Uma das principais doenças que pode comprometer a produção de uva no sul do Brasil é a antracnose (SÔNEGO e GARRIDO, 2003a; SÔNEGO e GARRIDO, 2003b). Contudo, recentemente, novos patógenos têm sido identificados causando doenças em videira, como é o caso de espécies do gênero *Pestalotiopsis*.

Em 1949, Steyaert, com base apenas nas formas conidiais, dividiu *Pestalotiopsis* em três gêneros: *Pestalotia*, indivíduos com seis células, sendo as 4 medianas marrons, *Pestalotiopsis* com cinco células e *Truncatella* com 4 células. Sutton (1980), em um estudo mais detalhado sobre esses gêneros, transferiu todas as espécies de *Pestalotia* anteriormente designadas, com exceção de *P. pezizoides*, para o gênero *Pestalotiopsis*. Maharachchikumbura et al. (2014), estudando a morfologia e filogenia multigene, separaram o gênero *Pestalotiopsis* em três gêneros: *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Esses fungos (semelhantes a *Pestalotiopsis*) pertencem à família Amphisphaeriaceae (BARR, 1975; KANG et al., 1998; JEEWON et al., 2003; TEJESVI et al., 2007; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011, 2014; HYDE et al., 2014) e suas espécies são comumente presentes em ecossistemas tropicais e subtropicais (TEJESVI et al., 2007; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011).

As espécies de *Pestalotiopsis* já foram relatadas em todo o mundo causando perdas econômicas em culturas importantes como: maçãs, mirtilos, caqui, castanha,

gengibre, videira, goiabeira, avelã, lichia, manga, orquídea, pêssego (SUN e CAO, 1990; XU et al., 1999; KEITH et al., 2006; JOSHI et al., 2009; KEITH e ZEE, 2010; CHEN et al., 2011; EVIDENTE et al., 2012; ISMAIL et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2013; REN et al., 2013).

Em videira, o gênero *Pestalotiopsis* foi registrado recentemente causando podridão pós-colheita de uvas na Coreia (DENG et al., 2013) e lesões em frutos e ramos na China (JAYAWARDENA et al., 2015). Na Austrália, *Pestalotiopsis* foi relatado por Sergeeva et al. (2001), Castillo-Pando et al. (2001) e Sergeeva et al. (2005) em ramos, bagas, flores, folhas e em tecidos lenhosos de videiras. *Pestalotiopsis* foi um dos fungos prevalentes isolados dos cancos de videiras em Arkansas e Missouri nos EUA (URBEZ-TORRES et al., 2009), e foi o segundo fungo mais comum isolado de cancos de videira no Texas/EUA (URBEZ-TORRES et al., 2012). Urbez-Torres et al. (2012) relataram que *P. uvicola* foi um dos fungos mais virulentos encontrado em ramos, e poderia induzir cancos no tronco de videira.

Espécies de *Neopestalotiopsis* foram associadas a podridão pós-colheita e a doença do tronco de videira, sendo a espécie *N. vitis* isolada da mancha nas folhas na China (JAYAWARDENA et al., 2016).

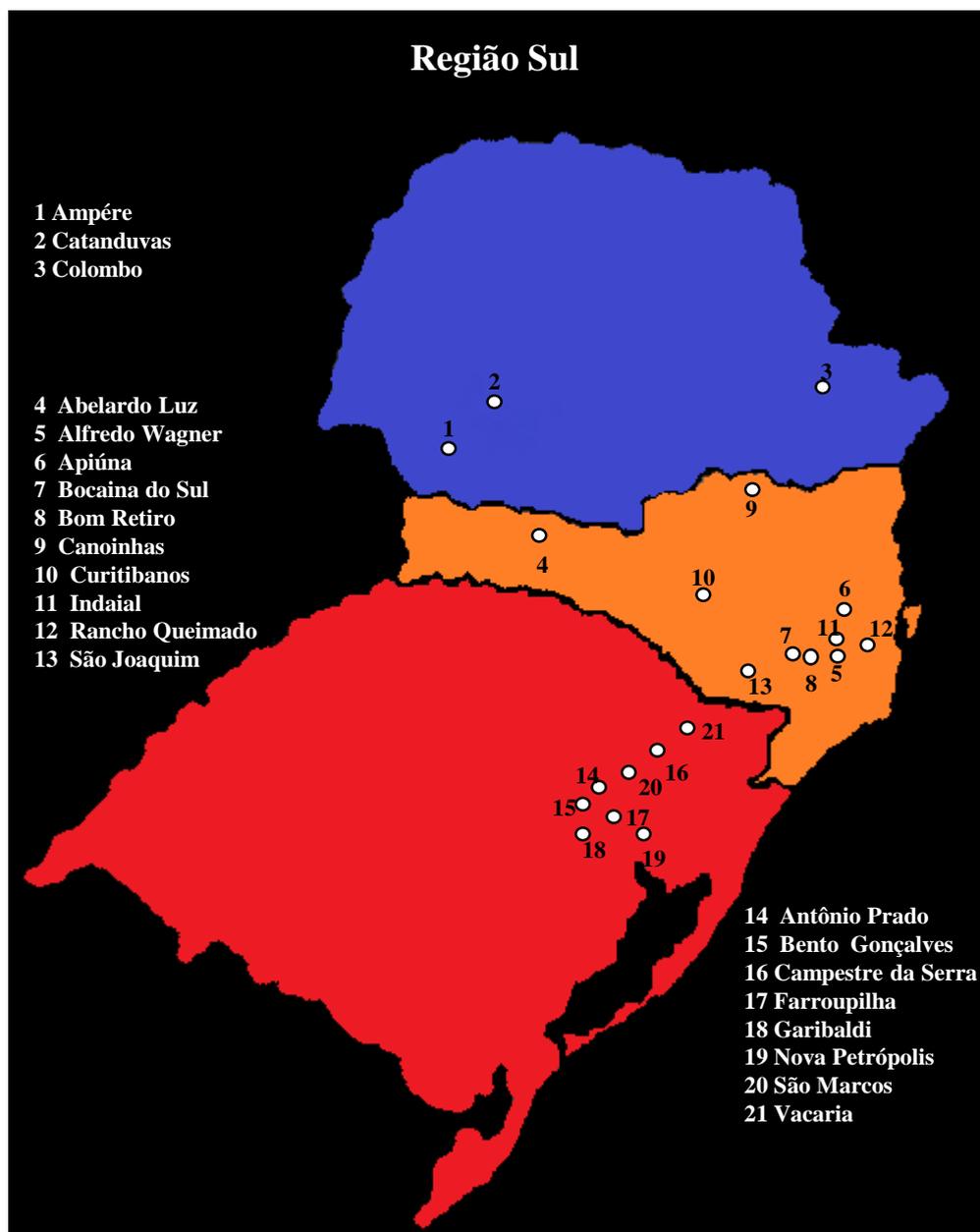
Nenhum estudo, até o presente momento, foi realizado no Brasil a fim de determinar doenças causadas por fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* spp. em videira. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar de forma morfológica e molecular espécies de fungos gênero *Pestalotiopsis* spp. associado aos sintomas de antracnose em videira no Sul do Brasil.

### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia do campus de Curitiba e no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, campus Florianópolis, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### 4.3.1 Obtenção dos isolados

Amostras de tecidos vegetais de folhas, pecíolos, ramos e bagas de videira (*Vitis* spp.) com sintomas característicos de antracnose foram coletados em 21 municípios dos três estados da Região Sul do Brasil, no período de novembro de 2013 a março de 2015.



**Figura 8.** Mapa ilustrativo dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com a distribuição geográfica dos 21 municípios onde foi coletado folhas, ramos e bagas sintomáticos de videira.

As amostras foram desinfestadas superficialmente em uma solução de hipoclorito de sódio (3% de cloro disponível) durante três minutos e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada e esterilizada. Subamostras entre o tecido sadio e lesionado foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz por 5 dias. Após a obtenção de culturas puras isolados monospóricos foram obtidos, resultando em 41 isolados. Suspensão de esporos diluída para  $10^5$  esporos/mL de cada isolado, provenientes

das diferentes regiões, foram preparada em água destilada estéril, sendo 40 µL da suspensão de esporos espalhada uniformemente sobre as placas de ágar água e o excesso drenado para fora das placas. As placas foram incubadas a 25 °C por 12 horas e examinadas sob o microscópio para localizar esporos germinados isoladamente, que foram transferidos assepticamente com a ajuda de estilete estéril às placas de Petri contendo BDA.

Para a caracterização morfológica dos isolados de foram avaliados tamanho dos esporos (largura e comprimento), tamanho e número de apêndices apicais, índice de velocidade de crescimento (IVCM) e o diâmetro final da colônia (DFC). Foram avaliadas três repetições, sendo cada placa uma repetição para cada isolado, mensurando-se 100 esporos por repetição. O IVCM foi medido utilizando-se a fórmula apresentada por Oliveira (1991):

$IVCM = \sum (D - Da)/N$ , sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação.

#### **4.3.2 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância univariada para constatar a existência de variabilidade entre os isolados a 5% de probabilidade, pelo Teste F. Para o procedimento de separação de médias entre os isolados foi utilizado o teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o programa computacional Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2000).

A partir da matriz de similaridade dos dados foi possível construir um dendograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*), com base na distância generalizada de Mahalanobis, estabelecendo as relações morfológicas e moleculares entre os diferentes isolados e considerando para isso, todas as variáveis analisadas. Para a análise multivariada foi utilizado o recurso computacional do programa Genes (CRUZ, 2008).

### 4.3.3 Extração do DNA genômico

De acordo com as variáveis morfológicas, os isolados foram divididos em cinco grupos, sendo que um isolado de cada grupo foi utilizado para as análises moleculares, sendo eles: CB-f, AP-c, IN-f, AL-f e CN-f-L3. Para a extração do DNA genômico destes isolados, foi produzida massa micelial em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura batata dextrose e água, inoculado com cinco discos de micélio e mantido por cinco dias à temperatura de 28 °C, sem agitação e com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, o micélio foi filtrado e mantido a -20 °C até o momento da extração do DNA.

O DNA foi extraído com base no método de Zolan e Pukila (1986). O micélio congelado foi macerado em cadinho de porcelana na presença de nitrogênio líquido transferido para um microtubo de 2 mL e adicionado 700 µL de tampão de extração (2,0 g CTAB (2 % concentração final); 8,12 g NaCl 1,4M; 10mL (0,5M) Tris-HCl pH 8,0 100 mM; 4 mL (0,5M) EDTA 20mM; 2g PVP 2 %; 2 % β-mercaptoetanol e água mili-Q até 100 mL). Os microtubos foram mantidos por 20 minutos em banho maria a 65 °C, invertendo-os ocasionalmente. Em seguida, deixou-se resfriar a temperatura ambiente e foi adicionado 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico - CIA (24:1), sendo homogeneizados por inversão até formar uma emulsão e centrifugado por 5 min a 12.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5mL, adicionado novamente 700 µL de CIA (24:1) e centrifugado por 5min a 12.000 rpm. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando três extrações com CIA. À fase aquosa resultante foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado, homogeneizado gentilmente por inversão até visualização de filamento de DNA e então centrifugado por 5min a 12.000 rpm para o formação do *pellet* na base do microtubo. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e uma vez com 500 µL de etanol absoluto e deixado para secar na bancada. Por fim, o DNA foi ressuspenso em 50µL de tampão TE + RNase [ $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ ], incubado em estufa à 37 °C por 30 min.

A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose a 0,8 %, através da comparação visual com o marcador DNA λ de concentração conhecida. Todas as amostras foram diluídas em água esterilizada para 10 ng/µL e armazenadas a -20 °C.

#### 4.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de PCR foram realizadas em volume final de 15  $\mu\text{L}$ , contendo: 1,5  $\mu\text{L}$  tampão  $\text{NH}_4$  10X; 0,45  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 1,2  $\mu\text{L}$  dNTPs Mix (2,5 mM); 1  $\mu\text{L}$  do iniciador *Forward* (10  $\mu\text{M}$ ); 1  $\mu\text{L}$  do iniciador *Reverse* (10  $\mu\text{M}$ ); 0,2  $\mu\text{L}$  de TAQ DNA Polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ); 7,65  $\mu\text{L}$  de água e 2  $\mu\text{L}$  de DNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ ).

Foram utilizados os iniciadores *forward* ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e *reverse* ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). As condições de termociclagem da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 34 ciclos formados por 94°C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 seg; e extensão final a 72°C por 5 min.

Para confirmar a amplificação, os produtos da PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1X. Os fragmentos resultantes da PCR foram marcados com GelRed (Biotium) e visualizados e fotografados em Transluminador (Loccus Biotecnologia LTB-21x26HE).

#### 4.3.5 Sequenciamento

Após a reação de amplificação pela PCR, os produtos foram purificados com o objetivo da retirada de iniciadores direto, reverso e dNTPs não incorporados durante as amplificações. A cada reação, foram adicionados 20,0  $\mu\text{L}$  de PEG 800 20% contendo cloreto de sódio 2,5 M. As reações foram levemente agitadas (em Vortex®) e incubadas por 30 min em estufa a 37 °C. Após, as reações foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 15 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi removido e foi adicionado 125,0  $\mu\text{L}$  de etanol 80% (4,0 °C) para a lavagem do pellet. As reações foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 8 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi novamente removido e em seguida foram adicionados 125,0  $\mu\text{L}$  de etanol 80 % (4,0 °C) para a lavagem do pellet. As reações foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente durante 8 min a 13.000 rpm (15.115 g). O sobrenadante foi removido e deixou-se o pellet secar em estufa a 37 °C. Após esta etapa, o pellet foi ressuspensionado (durante 30 min a 37 °C) em 15,0  $\mu\text{L}$  de água ultra pura autoclavada. O produto de PCR purificado foi posteriormente quantificado por estimativa visual em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium®).

Depois de otimizados, amplificados e purificados, os produtos de amplificação dos iniciadores foram sequenciados, pelo método de terminação de cadeia (SANGER et

al., 1977). Os 30 ciclos de amplificação foram compostos de: desnaturação a 95 °C por 20 s, seguido da hibridização do iniciador a 50 °C por 15 s e extensão enzimática (enzima Thermo Sequenase™ II DNA polimerase®, GE Healthcare) a 60 °C durante 1 min e 30 s. O sequenciamento foi realizado em analisador de DNA automático ABI 3500XL Séries (Applied Biosystems). Foram efetuadas reações em duplicata para os iniciadores *forward* e *reverse*, visando a garantia da fidelidade das sequências obtidas.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas através do programa BioEdit. Para a identificação dos isolados, as sequências consenso de nucleotídeos obtidas para cada isolado foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa Blast-n (Standard Nucleotide BLAST). A identificação do patógeno foi determinada baseada na melhor significância obtida quanto à identidade.

O dendograma foi obtido apenas pelas sequências consenso da região ITS. O alinhamento foi realizado pelo método Muscle através do programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013). O mesmo “software” foi utilizado para a análise filogenética que foi realizada pelo método ML (*Maximum Likelihood*). A consistência dos ramos obtidos no dendograma foi avaliada pela análise de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985), com 1.500 reamostragens. Como grupo externo (*outgroup*) foram utilizadas as sequências de *Diaphote rudis*. Sequências das espécies disponíveis no GenBank, que apresentaram maior identidade, foram selecionadas para o enraizamento dos dendogramas. As sequências finais obtidas para as diferentes regiões genômicas caracterizadas no presente trabalho serão depositadas no GenBank.

#### **4.3.6 Teste de patogenicidade**

A patogenicidade dos isolados foi testada em folhas destacadas e frutos de videira da cultivar ‘Poeloeskei de Muskotaly’. As folhas e os cachos com frutos maduros foram desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (3 % de cloro disponível) durante três minutos e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada e esterilizada e secadas em câmara de fluxo laminar. As amostras foram então pulverizadas com uma suspensão de esporos de *Pestalotiopsis* spp. contendo  $1 \times 10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>. As folhas foram dispostas em placas de Petri, de tamanho de 150 x 20 mm, com papel filtro umedecido e os cachos com frutos em caixas Gerbox e mantidas a 25 °C em BOD por 14 dias. Nas folhas e frutos foram utilizados pelo menos um isolado de cada grupo

morfológico, sendo: Grupo I: CN-f-L3, Grupo II: CB-f, Grupo III: AP-c e IN-f, Grupo IV: BR-b, Grupo V: AL-f.

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em pelo menos vinte e um municípios onde tecidos de videira com lesões características de antracnose foram coletados, foi isolado *Pestalotiopsis* spp., em pelo menos um órgão da planta amostrado (Figura 8 e Tabela 8), totalizando 41 isolados.

Todas as colônias crescidas dos 41 isolados apresentaram crescimento micelial branco e cotonoso. Todos os isolados apresentaram formação de acérvulos negros, erumpentes, com pústula oval ou com contorno irregular. Os conídios de todos os isolados apresentaram cinco células, sendo as três medianas com a mesma coloração marrom e as células apical e basal hialinas (Tabela 8). Estas características morfológicas são relatadas na literatura científica para o gênero *Pestalotiopsis* spp.

Contudo, de acordo com Jeewon et al. (2002) dentre os gêneros que se assemelham (*Bartalinia*, *Pestalotiopsis*, *Seimatosporium*, *Discosia*, *Seiridium* e *Truncatella*) e considerando o número de células medianas e o número de apêndices dos conídios o isolado AM-b enquadra-se na classificação de *Monochaetia* pois apesar de possuírem as mesmas características dos demais, diferem no número de apêndice, apresentando apenas um. Esses autores afirmam que esse gênero é estreitamente relacionado com *Pestalotiopsis* por também ter três células medianas, contudo diferem por possuir apenas um único apêndice apical, ao contrário dos de *Pestalotiopsis* que possuem dois a quatro apêndices.

Na Tabela 8, as primeiras letras maiúsculas correspondem as iniciais do município de coleta, seguidas da letra inicial da parte da planta em que foi isolado e, se no município houve mais de um local de coleta, segue a letra L e o número do ponto de coleta.

**Tabela 8.** Identificação dos isolados de *Pestalotiopsis* spp., parte da planta de onde foi isolado, o local e a data de coleta.

Código de identificação dos isolados	Parte da planta	Local de coleta	Data de Coleta
AM-b	Baga	Ampere (PR)	2013/14
AM-p	Pecíolo	Ampere (PR)	2013/14
CA-f	Folha	Catanduvas (PR)	2013/14
CO-b	Baga	Colombo (PR)	2013/14

AL-f	Folha	Abelardo Luz (SC)	2013/14
AW-c	Caule	Alfredo Wagner (SC)	2013/14
AW-p	Pecíolo	Alfredo Wagner (SC)	2013/14
AP-f	Folha	Apiúna (SC)	2013/14
BS-f	Folha	Bocaína do Sul (SC)	2013/14
BS-c	Caule	Bocaína do Sul (SC)	2013/14
BR-c	Caule	Bom Retiro (SC)	2013/14
BR-b	Baga	Bom Retiro (SC)	2013/14
CN-c-L1	Caule	Canoinhas - Local 1 (SC)	2014/15
CN-b-L1	Baga	Canoinhas - Local 1 (SC)	2014/15
CN-c-L2	Caule	Canoinhas - Local 2 (SC)	2014/15
CN-f-L3	Folha	Canoinhas - Local 3 (SC)	2014/15
CB-f	Folha	Curitibanos (SC)	2013/14
IN-f	Folha	Indaial (SC)	2013/14
IN-p	Pecíolo	Indaial (SC)	2013/14
RQ-f	Folha	Rancho Queimado (SC)	2013/14
RQ-c	Caule	Rancho Queimado (SC)	2013/14
RQ-b	Baga	Rancho Queimado (SC)	2013/14
SJ-p-L2	Pecíolo	São Joaquim - Local 2 (SC)	2014/15
AP-p	Pecíolo	Antônio Prado (RS)	2013/14
AP-c	Caule	Antônio Prado (RS)	2013/14
BG-p-L3	Pecíolo	Bento Gonçalves - Local 3 (RS)	2014/15
BG-f-L4	Folha	Bento Gonçalves - Local 4 (RS)	2014/15
CS-f-L1	Folha	Campestre da Serra - Local 2 (RS)	2014/15
CS-p-L2	Pecíolo	Campestre da Serra - Local 2 (RS)	2014/15
FA-b	Baga	Farroupilha (RS)	2014/15
FA-c	Caule	Farroupilha (RS)	2014/15
GA(a)-b-L3	Baga	Garibaldi - Local 3 (RS)	2014/15
GA-c-L3	Caule	Garibaldi - Local 3 (RS)	2014/15
GA(b)-b-L3	Baga	Garibaldi - Local 3 (RS)	2014/15
NP-b-L2	Baga	Nova Patrópolis - Local 2 (RS)	2014/15
NP-c-L1	Caule	Nova Patrópolis - Local 1 (RS)	2014/15
NP-p-L1	Pecíolo	Nova Patrópolis - Local 1 (RS)	2014/15
SM-c-L2	Caule	São Marcos - Local 2 (RS)	2014/15
VA-f-L2	Folha	Vacaria – Local 2 (RS)	2013/14
VA-f-L1	Folha	Vacaria - Local 1 (RS)	2014/15
VA-f-L6	Folha	Vacaria - Local 6 (RS)	2014/15

A análise de variância para as características das colônias e morfologia dos conídios dos isolados associados ao gênero *Pestalotiopsis* demonstrou haver diferença

significativa entre os isolados, principalmente para as variáveis comprimento de esporos e tamanho de apêndices apicais (Tabela 9).

As espécies de *Pestalotiopsis* são diferenciadas principalmente por características dos conídios como tamanho, presença de septos, pigmentação e presença ou ausência de apêndices (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). O número de apêndices apicais dividiu os 41 isolados em cinco grupos, sendo que três grupos foram formados apenas por um indivíduo: o isolado RQ-f que não apresentou apêndice e o RQ-c que apresentou três apêndices. Os demais isolados apresentaram 0 a 2 apêndices (cinco isolados), 1 a 2 apêndices (12 isolados), embora tenha sido incluído nesse grupo o isolado AM-b apresentou apenas e um grupo maior com isolados que apresentaram um e 2 ou 3 apêndices (21 isolados).

O tamanho dos apêndices dividiu os isolados em 10 grupos, contudo os primeiros cinco grupos, que correspondem aos isolados que apresentaram os maiores apêndices, são formados por apenas 10 isolados.

O comprimento dos conídios variou de 18,24 a 27,92  $\mu\text{m}$  e a largura de 5,04 a 7,12  $\mu\text{m}$ . O IVCM variou de 0,81 a 3,12 mm/dia. O DFC variou pouco entre os isolados, sendo que a maioria deles apresentaram crescimento máximo ao final do sétimo dia de 80 mm.

**Tabela 9.** Número e tamanho de apêndices apicais, comprimento e largura dos conídios, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e diâmetro final das colônias sete dias após a repicagem (DFC) de isolados de *Pestalotiopsis* spp. obtidos de diferentes tecidos de videira com sintomas de antracnose, coletados em 21 municípios da região Sul do Brasil.

Códigos	Nº de apêndices	Tamanho de apêndice ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento de conídios ( $\mu\text{m}$ )	Largura de conídios ( $\mu\text{m}$ )	IVCM (mm/dia)	DFC (mm)
RQ-f	0 a	0,0 j	18,4 g	6,6 b	2,8 b	79,2 a
VA-f-L1	0-2 b	12,9 g	22,3 d	6,5 b	2,8 b	80,0 a
AL-f	0-2 b	20,2 c	27,5 e	6,4 b	2,7 b	80,0 a
SM-c-L2	0-2 b	22,1 b	21,2 e	6,9 a	2,8 b	78,8 a
NP-b-L2	0-2 b	13,9 f	24,3 c	7,1 a	2,7 b	80,0 a
VA-f-L6	0-2 b	25,5 a	27,9 a	6,1 c	2,7 b	80,0 a
NP-c-L1	1-2 c	16,2 e	21,5 e	6,9 a	2,8 b	80,0 a
CN-f-L3	1-2 c	13,7 f	22,9 d	6,5 b	2,7 b	80,0 a
CN-c-L2	1-2 c	19,3 c	21,2 e	7,2 a	2,7 b	80,0 a
GA(b)-b-L3	1-2 c	17,0 d	25,5 b	5,8 c	2,8 b	80,0 a

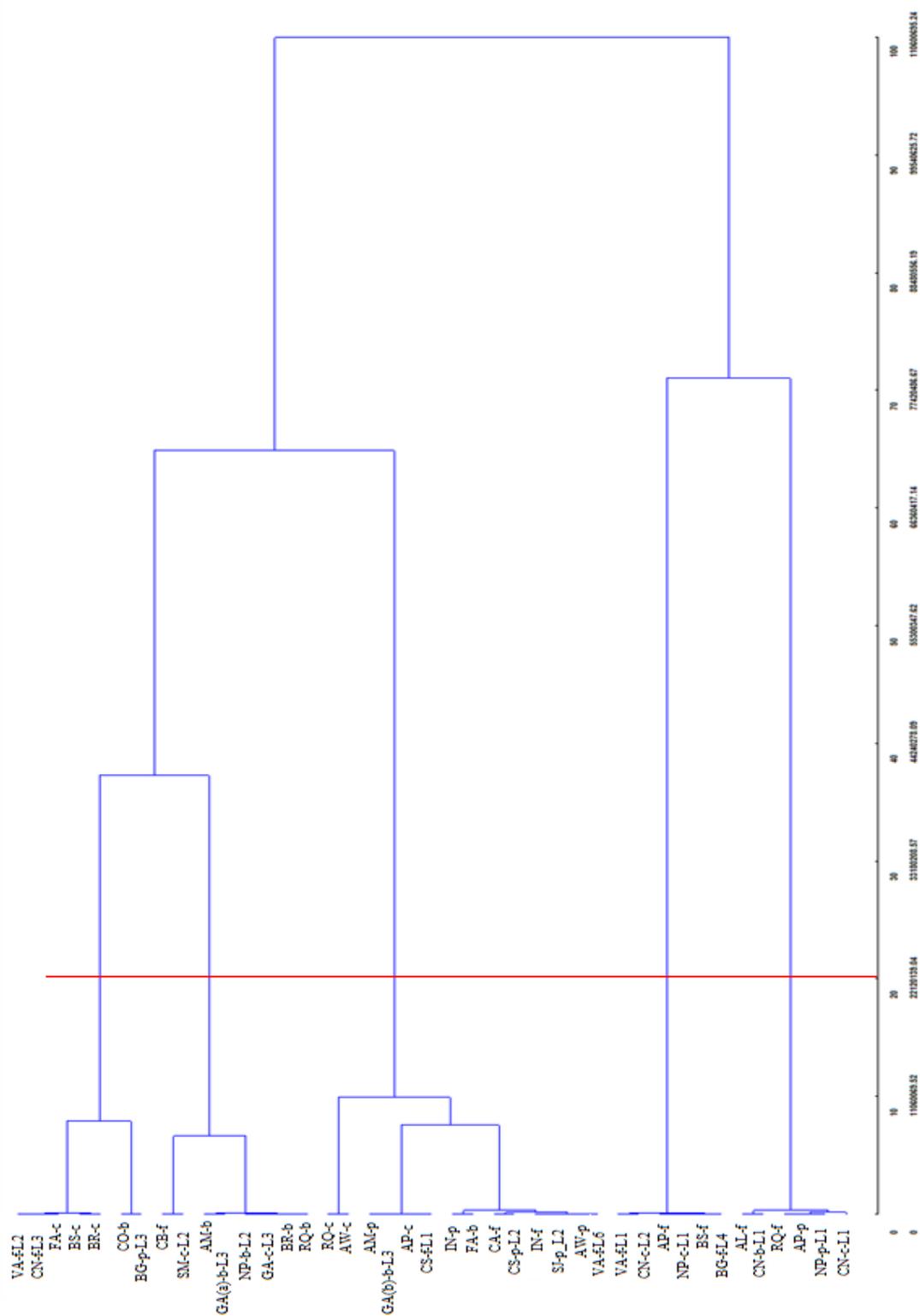
CN-c-L1	1-2 c	19,4 c	25,5 b	6,2 b	3,0 a	80,0 a
GA-c-L3	1-2 c	11,7 g	19,9 f	6,8 a	3,0 a	80,0 a
CS-p-L2	1-2 c	12,8 g	20,8 e	7,1 a	2,8 b	78,2 a
FA-c	1-2 c	17,8 d	27,3 a	6,2 b	2,9 a	80,0 a
AW-p	1-2 c	20,3 c	23,4 c	6,0 c	3,1 a	80,0 a
NP-p-L1	1-2 c	12,5 g	21,0 e	6,9 a	3,0 a	80,0 a
BG-f-L4	1-2 c	14,3 f	21,2 e	6,4 b	2,4 d	75,7 b
CO-b	1-2 c	12,6 g	20,2 f	6,3 b	2,8 b	79,4 a
AM-b	1-1 c	13,4 f	18,4 g	6,6 b	2,8 b	80,0 a
AP-f	2-3 d	7,1 i	22,7 d	5,9 c	2,7 b	80,0 a
GA(a)-b-L3	2-3 d	13,1 g	20,8 e	6,2 b	2,7 b	80,0 a
BS-c	2-3 d	6,7 i	22,3 d	5,4 d	2,5 c	77,8 a
VA-f-L2	2-3 d	7,9 i	22,7 d	5,0 d	2,7 b	80,0 a
AM-p	2-3 d	7,7 i	24,0 c	5,7 c	2,7 b	80,0 a
CS-f-L1	2-3 d	8,5 h	20,1 f	5,6 c	2,2 d	66,4 c
CB-f	2-3 d	12,0 g	24,7 c	6,5 b	3,0 a	80,0 a
BR-b	2-3 d	14,6 f	24,9 b	5,8 c	3,1 a	80,0 a
CN-b-L1	2-3 d	7,2 i	22,4 d	5,3 d	2,5 c	75,4 b
CA-f	2-3 d	17,3 d	19,8 f	6,3 b	2,5 c	74,8 b
SJ-p-L2	2-3 d	11,6 g	21,0 e	6,8 a	2,8 b	80,0 a
BG-p-L3	2-3 d	15,5 g	22,7 d	6,6 b	2,9 a	80,0 a
RQ-b	2-3 d	13,5 f	25,9 b	6,6 b	2,8 b	80,0 a
AP-c	2-3 d	10,2 h	18,2 g	6,4 b	2,6 c	80,0 a
FA-b	2-3 d	12,0 g	22,5 d	7,0 a	2,7 b	80,0 a
IN-f	2-3 d	12,9 g	25,7 b	6,5 b	2,7 b	80,0 a
AP-p	2-3 d	9,4 h	20,2 f	5,7 c	2,8 b	79,9 a
AW-c	2-3 d	9,1 h	22,4 d	6,9 a	2,8 b	80,0 a
IN-p	2-3 d	9,1 h	22,4 d	5,4 d	2,5 c	75,9 b
BR-c	2-3 d	14,2 f	19,1 g	6,4 b	2,6 c	78,3 a
BS-f	2-3 d	8,8 h	21,0 e	6,4 b	2,8 b	80,0 a
RQ-c	3 e	8,6 h	25,6 b	5,8 c	0,8 e	29,9 d
						77,7 ±
Média	2-3 ± 0,7	13 ± 4,8	22 ± 2,54	6,3 ± 0,5	2,7±0,3	8
CV %	3,8	7,51	4,03	3,37	3,66	2

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Devido a alta diversidade morfológica encontrada para os isolados em estudo, as variáveis foram analisadas conjuntamente, através do método de agrupamento UPGMA. Foi observado na análise multivariada que os 41 isolados foram agrupados em cinco

grupos com no mínimo 90% de similaridade (Figura 9). Os grupos I, II e III apresentaram 100% de dissimilaridade com os grupos IV e V.

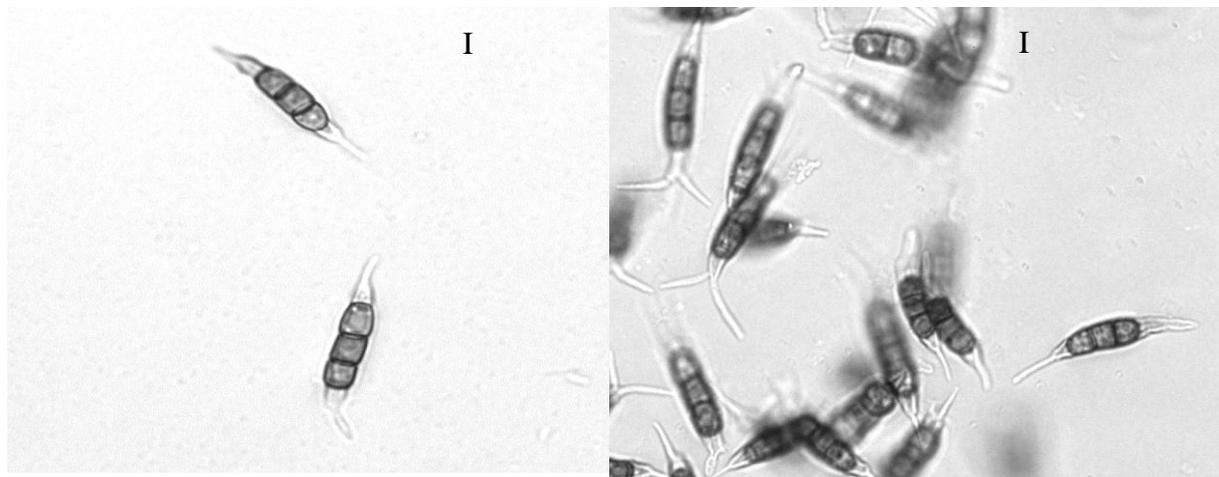
A data de coleta, parte da planta amostrada e a localização de coleta não apresentaram nenhuma relação com os grupos formados. Observa-se que isolados da mesma localidade, mas de órgãos distintos da planta, foram agrupados diferentemente. Por exemplo, os isolados BR-b e BR-c da mesma região foram agrupados diferentemente, sendo o isolado BR-c agrupado no grupo I e o isolado BR-b agrupado no grupo IV.

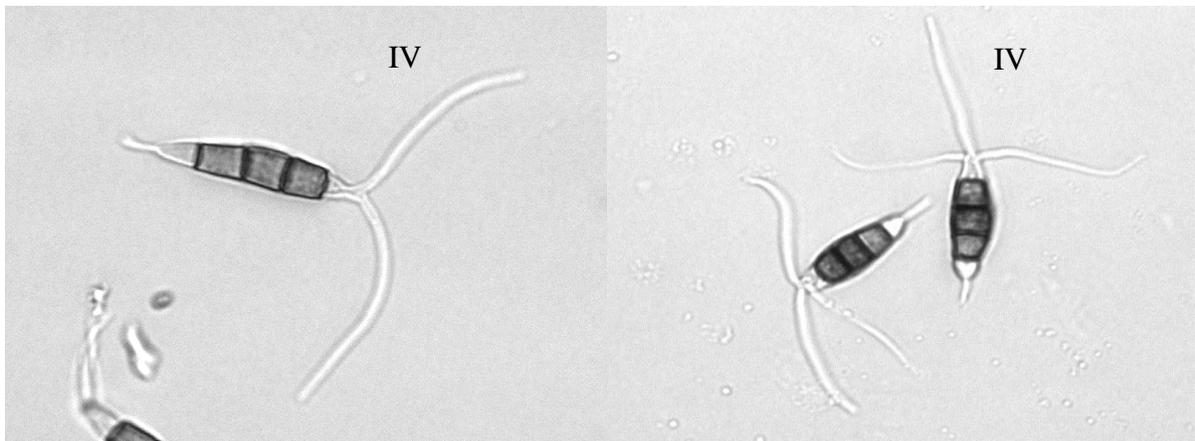
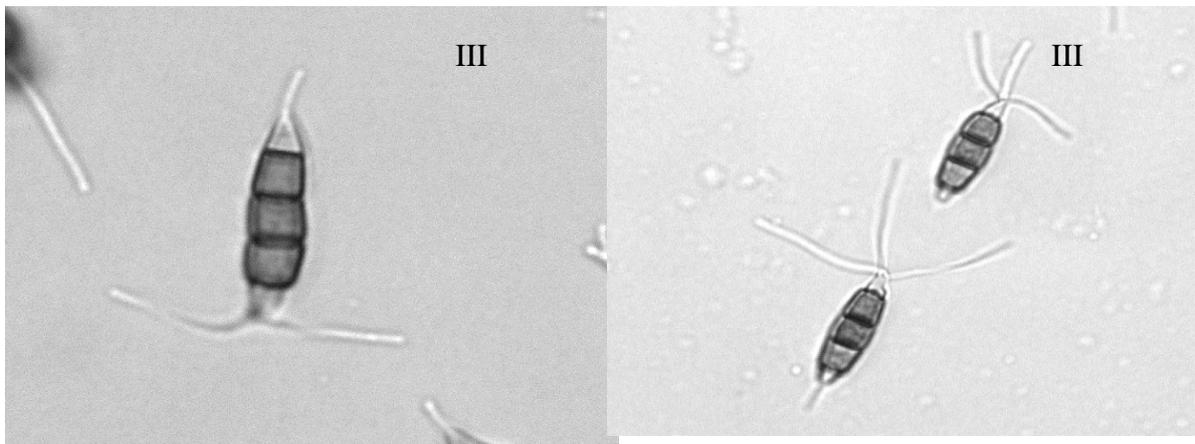
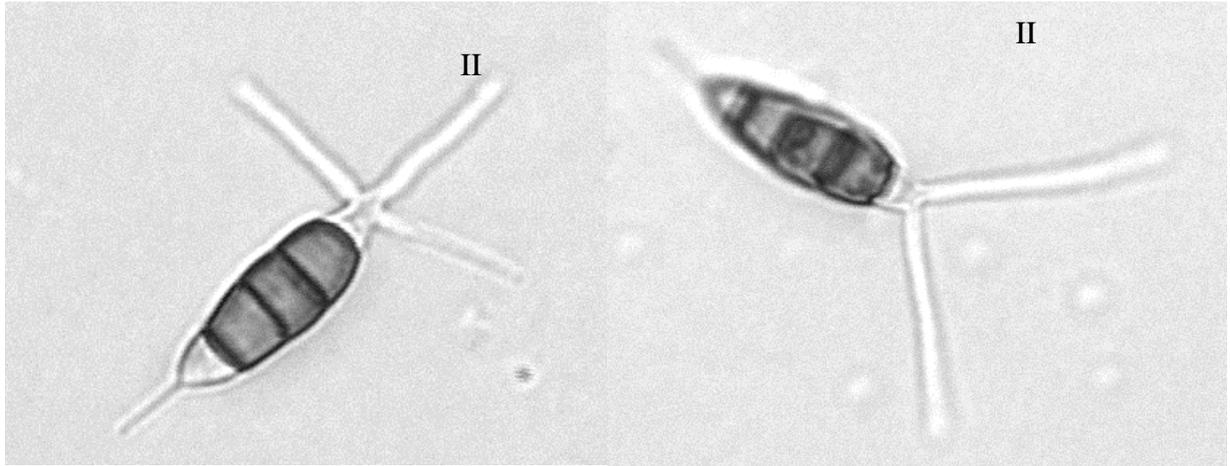


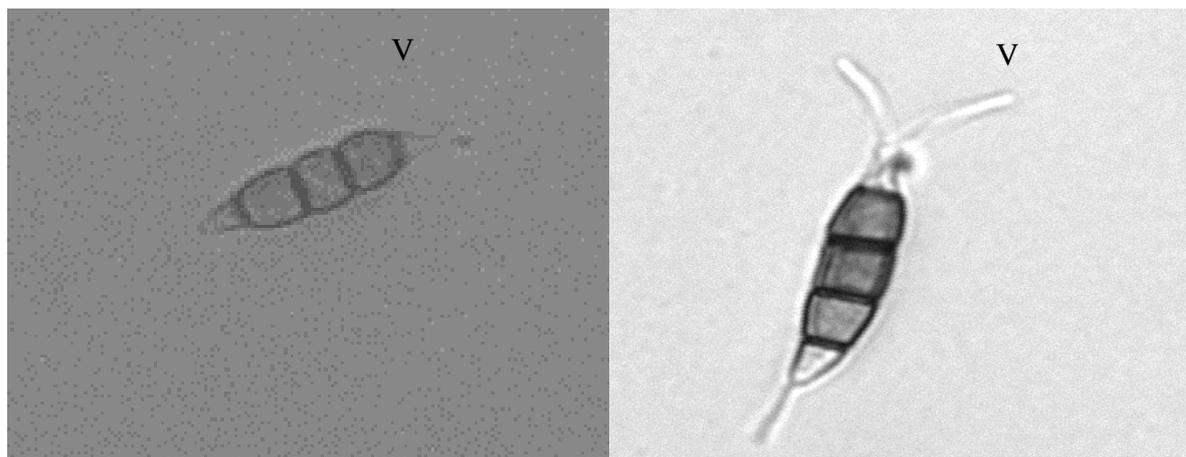
**Figura 9.** Dendrograma de dissimilaridade genética de 41 isolados de *Pestalotiopsis* spp. originários de diversas regiões produtoras de uva dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, baseado no diâmetro final das colônias (DFC), comprimento, largura de esporos, número e tamanho de apêndices apicais, utilizando o método de agrupamento UPGMA.

Considerando a metodologia de Singh (1981), para a contribuição relativa dos caracteres, o número de apêndices é a variável mais importante para separar os grupos morfológicamente, que neste estudo contribuiu com 99,98 % para o agrupamento dos isolados. Devido a sua elevada contribuição relativa na diferenciação dos isolados foi a variável morfológica mais indicada para este fim.

As diferenças morfológicas dos conídios dos isolados representativos dos cinco grupos podem ser observadas na Figura 10. Embora o número e tamanho de apêndices seja diferente entre os grupos, observa-se que todos os grupos apresentaram três células medianas escuras, uma célula basal e uma apical incolores. Os grupos I e V diferiram morfológicamente de todas as espécies de *Neopestalotiopsis* descritas por Maharachchikumbura et al. (2014), que compararam várias espécies desse gênero com *Pestaloioipsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Contudo os grupos II, III e IV assemelham-se as espécies *Neopestalotiopsis zimbabweana*, *Neopestalotiopsis surinamensis* (Tabela 9 e Figura 10).







**Figura 10.** Morfologia dos conídios, com aumento de 400 x, dos cinco grupos formados a partir da análise de agrupamento das características de colônia e morfologia dos conídios dos 41 isolados de *Pestalotiopsis* spp. obtidos de diferentes tecidos (folhas, pecíolos, ramos e bagas) de videira, coletados em 21 municípios da região Sul do Brasil.

Apesar de morfologicamente o grupo II e III terem se assemelhado as espécies de *Neopestalotiopsis* descritas por Maharachchikumbura et al. (2014), as pesquisas BLAST revelaram que apenas o isolado utilizado como representativo do grupo IV é idêntico a esse gênero (KX146639.1). Entretanto esse mesmo resultado foi observado para o gênero *Pestalotiopsis* sp. (KU737519.1), sendo que a sequência do gene ITS não diferiu em nenhum nucleotídeo (Tabela 10). Os demais grupos, I, II, III e V apresentaram no mínimo 99% de identidade com alguma espécie de *Pestalotiopsis*.

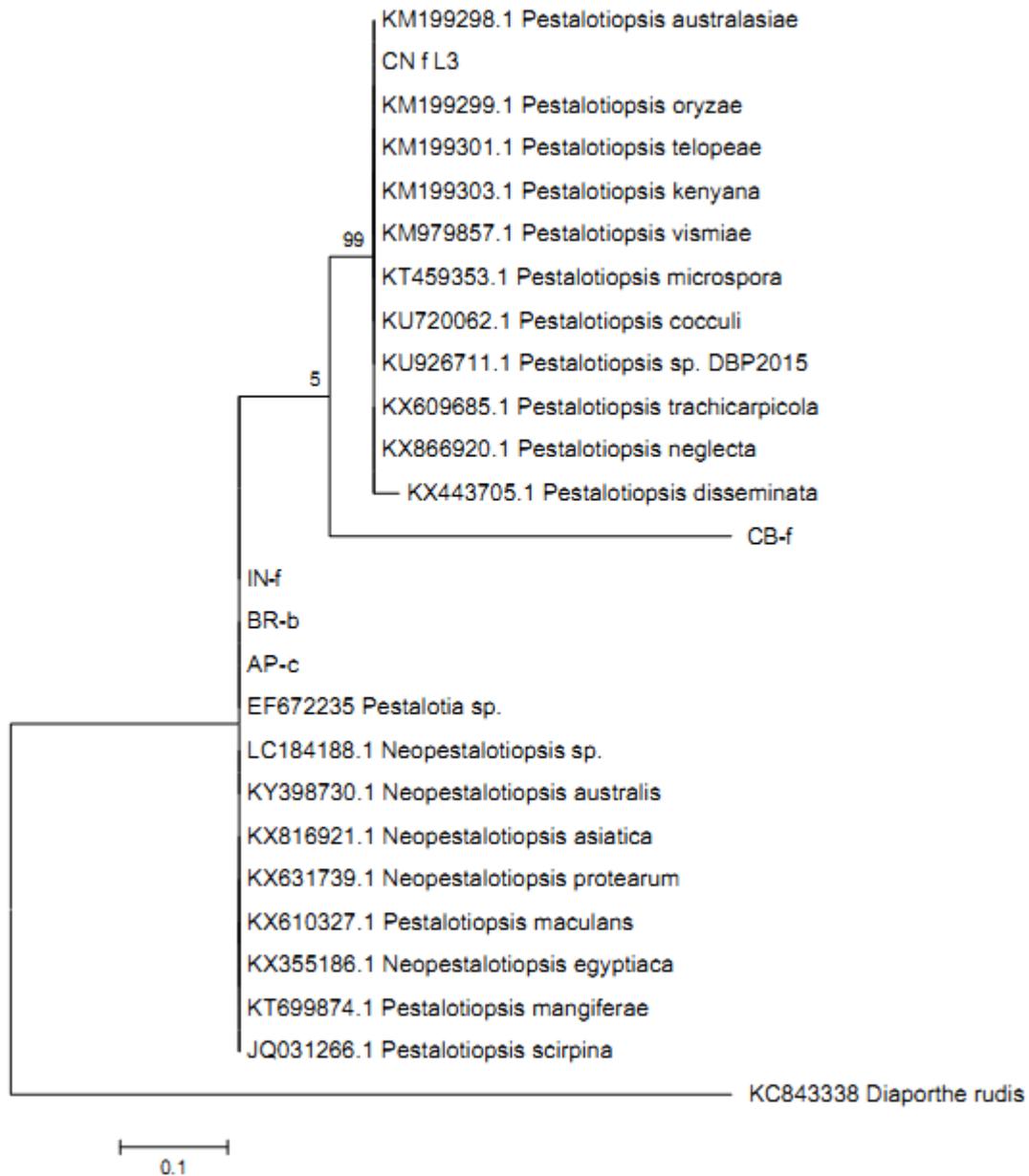
**Tabela 10.** Isolados de *Pestalotiopsis* spp. sequenciados e comparados com sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information website*).

Isolado	Descrição	Max Score	Total Score	Query cover	E-value	Identity	Número de acesso no GenBank
CB-f	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	987	987	97%	0,0	99%	EF451804.1
	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	968	968	97%	0,0	99%	GU722595.1
AP-c	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	987	987	97%	0,0	99%	EF451799.1
	<i>Pestalotiopsis protearum</i>	977	977	97%	0,0	99%	JX556231.1
IN-f	<i>Pestalotiopsis protearum</i>	970	970	99%	0,0	99%	JX556231.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	968	968	99%	0,0	99%	KT953379.1

CN-f-	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	881	881	100%	0,0	100%	KR093879.1
L3	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	881	881	100%	0,0	100%	KM979857.1
BR-b	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	848	848	100%	0,0	100%	KX146639.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	848	848	100%	0,0	100%	KU737519.1

Contrastando com o resultado obtido pelo BLAST, além do isolado BR-b, os isoaldos AP-c IN-f também foram agrupado com todos os isolados de *Neopestalotiopsis*, além de, *Pestalotia* sp. e as espécies de *Pestalotiopsis maculans*, *P. mangiferae* e *P. scirpina*. Recentemente Jayawardena et al. (2016) relataram pela primeira vez uma nova espécie, *Neopestalotiopsis vitis*, isolada de mancha foliar de videira, na província de Guangxi, China.

O isolado CN-f-L agrupou-se em um clado maior apenas com espécies de *Pestalotiopsis*, com forte ligação entre eles. O islado CB-f apresentou 99% de ligação com esse clado. De acordo com Zharkikh e Li, 1992; Hillis e Bull, 1993, valores de *bootstrap* acima de 70% são consideradas ligações fortes, embora a interpretação exata do limite aceitável da proporção seja abstrata, mas quanto maior a proporção maior a confiança na topologia daquele nó.

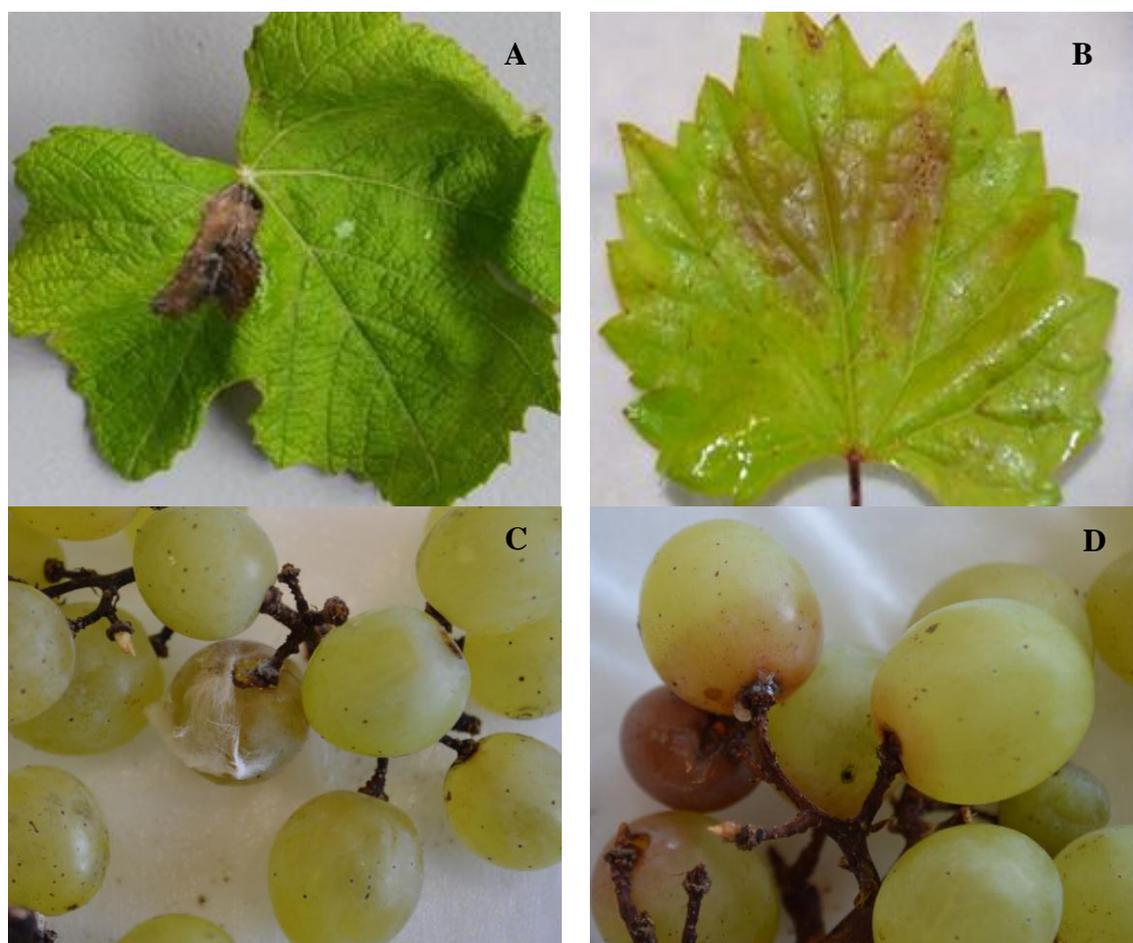


**Figura 11.** Dendograma gerado pelo método *Maximum Likelihood*, a partir do “software” MEGA 6.0. Os códigos à direita representam os isolados de tipo *Pestalotiopsis*, sequenciados a partir do gene ITS e, os números entre os ramos representam a porcentagem de “bootstrap”.

A identificação de espécies de *Pestalotiopsis* é difícil mesmo com sequenciamento de DNA, por causa da limitação de caracteres morfológicos usados pelos autores para diferenciar as espécies (HU et al., 2007) e em função de que muitas características se sobrepõem (SUTTON, 1992). Outro fator agravante é que ainda não foi estabelecido se *Pestalotia* e *Pestalotiopsis* são gêneros distintos ou não. Por esta razão, os nomes das espécies em função das sequências nucleotídicas são altamente subjetivas, assim as

sequências de *Pestalotiopsis* depositadas no GenBank são passíveis de ser nomeadas de forma errônea (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011). Ainda assim, ao contrário do gênero *Colletotrichum*, por exemplo, os autores têm se valido das características morfológicas aliadas ao sequenciamento para diferenciação das espécies.

O teste de patogenicidade confirmou que os isolados tipo *Pestalotiopsis* causaram lesão tanto em folhas como em frutos de videira e os sintomas observados foram semelhantes para todos os isolados testados (Figura 12 A e B).. Os sintomas obtidos após a inoculação de esporos do fungo foram semelhantes aos obtidos em folhas por Jayawardena et al. (2016) e em frutos por Deng et al. (2013) e Jayawardena et al. (2015), embora esses autores tenham realizado fermento anterior a inoculação, o que não ocorreu no presente estudo.



**Figura 12.** Sintomas em folhas por ocorrência natural (A) e inoculação em folha destacada (B), frutos com micélios do fungo 4 dias após a inoculação (C) e frutos com apresentando podridão 7 dias após a inoculação (D) de *Pestalotiopsis* sp.

As lesões foliares ocorreram principalmente na superfície adaxial e foram alongadas e irregulares. As lesões foram observadas principalmente entre as nervuras, com coloração inicialmente avermelhada e tornando-se marrom escura com a progressão dos sintomas. Após cinco dias foi possível observar os conidióforos pretos sobre o limbo foliar, correspondente as lesões (Figura 12 A e B). Fragmentos entre o tecido sadio e onde foram observadas as lesões foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 1% e isolados em meio de cultura BDA, sendo então observados colônias puras e idênticas ao fungo utilizado, fechando assim o postulado de Koch.

Os sintomas iniciais da doença da podridão nos frutos foram observados principalmente na ruptura da conexão entre o pedicelo e a baga, e em ferimentos no fruto, onde foi possível observar hifas brancas após quatro dias da inoculação (Figuras 12 C e D). Após a infecção, a pele do fruto ficou marrom avermelhada e após a infecção os frutos desprenderam-se totalmente do pedicelo e apresentaram podridão seca.

Inicialmente a doença pode estar ocorrendo em videira associada a outras doenças ou mesmo tendo sua infecção facilitada por podas, feridas, estresse causado por insetos, temperatura alta ou alta pluviosidade (TUSET et al., 1999; HOPKINS e MCQUILKEN, 2000). Mesmo sendo considerado um patógeno de importância secundária em diversas culturas, deve-se considerar que este patógeno está sendo relatado como importante causador de doenças em videira em outros países. Além disso, em outras culturas como é o caso, por exemplo, do morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) e coqueiro (*Cocos nucifera*), a mancha de *Pestalotiopsis* é uma doença de importância econômica. Na cultura do coqueiro no estado do Paraná *Pestalotiopsis* spp. causa requeima foliar que, em estágio mais avançado, as manchas coalescem resultando em uma seca de todo ou de grande parte do folíolo (VIDA et al., 2003). Na cultura do morangueiro *Pestalotiopsis longisetula* Guba, tem sido destrutiva, principalmente em áreas de cultivo no estado do Espírito Santo onde causa perdas na produção e a inviabilização de áreas de cultivo (CARRÉ-MISSIO et al., 2010).

A identificação correta dos fungos similares a *Pestalotiopsis* é importante para o controle de doenças em plantas. Contudo, muitas espécies são nomeadas de acordo com a sua associação com o hospedeiro (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011) e apenas um pequeno número de caracteres estão disponíveis para distinguí-los de forma confiável (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2013).

No Brasil são incipientes as pesquisas com fungos similares a *Pestalotiopsis*, mesmo em culturas que se apresenta como fitopatogênico, como coco e morango, e ainda assim, a maioria são baseadas apenas em caracteres morfológicos.

Este é o primeiro relato de fungos tipo *Pestalotiopsis* causando doença de mancha foliar e podridão em bagas em pós-colheita em videira no Brasil. Estes resultados podem ser úteis para estudos adicionais sobre programas de melhoramento e quarentena e medidas de manejo, além de programas de melhoramento genético.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Fungos tipo *Pestalotiopsis* causam mancha foliar e podridão de frutos em videira.

Existe diversidade morfológica e genética entre isolados de fungos tipo *Pestalotiopsis* associados a mancha foliar e podridão de frutos em videira.

Não há relação entre espécies de fungos tipo *Pestalotiopsis* e respectivos órgãos amostrados e procedências.

Este estudo representa a primeira evidência de caracterização morfológica e molecular do gênero tipo *Pestalotiopsis* causando doenças em folhas e bagas em videira no Sul do Brasil.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora haja muitos estudos identificando diferentes patógenos causando doenças em videira em várias partes do mundo, no Brasil, esse é o primeiro relato comprovando a ocorrência e determinação de espécies do gênero *Colletotrichum* causando antracnose e de fungos semelhantes a *Pestalotiopsis* causadores de doenças em videira no Sul do Brasil. Esse estudo é de fundamental importância, pois comprova a ocorrência desses gêneros como causadores de doenças em videira e sugere ainda a existência de mais de uma espécie envolvida. No entanto, para a definição ao nível de espécies mais genes precisam ser sequenciados.

A determinação das espécies de fungos associadas aos diversos tipos de sintomas é essencial para os programas de quarentena, para o melhoramento genético das plantas, para o entendimento da epidemiologia do patógeno, e também para o controle eficiente do respectivo patógeno, contudo, é necessário para confirmação da diversidade de espécies, obtidas no presente estudo, o sequenciamento de outras regiões genômicas, como a  $\beta$ -tubulina.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, J. E.; FORSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed). *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions*. St. Paul: American Phytopathological Society, 317-336, 2000.

ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87:979-987, 1997.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, 76:1176-1178, 1992.

ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M. A.; ANTUNES, L. E. C.; PEREIRA, A. F. Origem e classificação botânica da videira. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 19, n. 194, p. 5-8, 1998.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Eds. *Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas*. 4A ed. Vol.2. Editora Agronômica CERES, cap.70, p.637-651, 2005.

ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 32:21-31, 2007.

ARAYA, C. M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 221-228, 2003.

ARX, J. A. Von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. *Phytopathologische Zeitschrift*, 29:413-468, 1957.

BARR, M. E. *Pestalotia*, a new genus in the *Amphisphaeriaceae*. *Mycologia*, 67:187-194, 1975.

BATE-SMITH, E. C.; METCALFE, C. R. Leucanthocyanins .3. The nature and systematic distribution of tannin in dicotyledonous plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 55:669-705, 1957.

BAXTER, A. P.; WESTHUIZEN, G. C. A.; EICKER, A. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. South African Journal of Botany, 2:260-289, 1983.

BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. Plant Disease, 79:478-482, 1995.

BOTELHO, R. V.; MAIA, A. J.; PIRES, E. J. P.; TERRA, M. M. Efeito do extrato de alho na quebra de dormência de gemas de videiras e no controle *in vitro* do agente causal da antracnose (*Elsinoe ampelina* Shear). Revista Brasileira de Fruticultura, 31:96-102, 2009.

BROOK, P. J. Epidemiology of grapevine anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 16:333-342, 1973.

BROWN, J. G. 32<sup>nd</sup> Annual Report. Arizona Agricultural Experimental Statistics, pp. 606-615. 1922.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B. S.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H.C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Divers, 39:183–204, 2009.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. Revista Brasileira de Fruticultura, 33:144-149, 2011.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R. e WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. StudieS in Mycology, 73:181-213, 2012.

CASTILLO-PANDO, M.; SOMERS, A.; GREEN, C. D.; PRIEST, M.; SRISKANTHADES, M. Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. Australasian Plant Pathology, 30:59-63, 2001.

CARISSE, O.; LEFEBVRE, A. A model to estimate the amount of primary inoculum of *Elsinoë ampelina*. Plant Disease, 95:1167-1171, 2011.

CARRÉ-MISSIO, V.; RODRIGUES, F. Á.; SCHURT, D. A.; REZENDE, D. C.; RIBEIRO, N. B.; ZAMBOLIM, L. Aplicação foliar de silicato de potássio, acibenzolar-S-

metil e fungicidas na redução da mancha de *Pestalotiopsis* em morango. *Tropical Plant Pathology*, 35:182-185, 2010.

CHEN, C. Q.; ZHANG, B.; YANG, L. N. Identification and biological characteristics of round leaf spot on blueberry caused by *Pestalotiopsis photiniae* (in Chinese). *Journal of Northeast Forestry University*, 39:95-98, 2011.

CHOWDAPPA, P.; REDDY, G. S.; KUMAR, A.; RAO, B. M.; RAWAL, R. D. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species causing anthracnose of grape in India. *The Asian and Australas J Plant Sci Biotechnol*, 3:71-77, 2009.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO P. C .S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v.2. 585p. 2003.

CRUZ, C. D. Programa genes: análise multivariada e simulação. Viçosa: UFV, 2008. 175 p. FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 220, 1998.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73:37-113, 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, 73:1-36, 2012b.

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

DAS, R.; CHUTIA, M.; DAS, K.; JHA, D. K. Factors affecting sporulation of *Pestalotiopsis disseminata* causing grey blight disease of *Persea bombycina* Kost., the primary food plant of muga silkworm. *Crop Protection*, 29:963–968, 2010.

DE NOTARIS, G. *Micromycetes italiei* Dec II. *Mere R Academia Science*, 3:80–81, 1839.

DENG, J. X.; SANG, H. K.; HWANG, Y. S.; LIM, B. S.; YU, S. H.. Postharvest fruit rot caused by *Pestalotiopsis* sp. on grape in Korea. *Australasian Plant Disease*, 8:111–114, 2013.

DE BARY, A. Ueber den sogenannten Brenner (pech) der Reben. *Oenologie*, 4: 165-167, 1874.

DEAN, R.; VAN, KAN, JAL.; PRETORIUS, Z.; A.; HAMMOND-KOSACK, KE.; DI PIETRO, A.; PIETRO, D. S.; RUDD, J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, E.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13:414–430, 2012.

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

ELLIS, M. A.; ERINCIK, O. Anthracnose of Grape. The Ohio State University Extension, 2008.

ERIKSSON, O. E.; BARAL, H. O.; CURRAH, R. S.; HANSEN, K.; KURTZMAN, C. P.; RAMBOLD, G.; LAESSOE, T. Outline of Ascomycota – Myconet, 9:1- 89, 2003.

EVIDENTE, A.; ZONNO, M. C.; ANDOLFI, A.; TROISE, C.; CIMMINO, A.; VURRO, M. Phytotoxic a-pyrones produced by *Pestalotiopsis guepinii*, the causal agent of hazelnut twig blight. *The Journal of Antibiotics* 65: 203-206, 2012.

FEITOSA, M. I.; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V.; LEITE, L. R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico*, 44:33-54, 1977.

FAO/Food Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture trade domain, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: outubro de 2014.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 4., 2000, São Carlos, SP. Anais... São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39:783-791, 1985.

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

GREER, L. A.; HARPER, J. D. I.; SAVOCCHIA, S.; SAMUELIAN, S. K.; STEEL, C. C. Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of *Colletotrichum*: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17:123–128, 2011.

GUBA, E. F. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*. Harvard University Press, Cambridge, 1961.

GUERBER, J. C.; LIU, B.; CORRELL, J. C.; JOHNSTON, P. R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95:872–895, 2003.

GUNNELL, P. S.; GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, 84:157–165, 1992.

GUNJAN, S.; NAVINDER, K.; WEIR, B. S.; HYDE, K. D.; SHENOY, B. D.; Apmat gene can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Divers*, 61:117–138, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41:95-98. 1999.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H. T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y. C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSDALE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J. M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASIO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜSSLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y. J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* III, 509-547, 2007.

HYDE, K. D.; FRÖHLICH, J. *Mycosphaerella palmicola* associated with leaf spots of *Cocos nucifera* in Australia, Iran, Java and Papua New Guinea. *Mycological Research*, 99:704–706, 1995.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity*, 39, 147–182, 2009.

HYDE, K. D.; NILSSON, R. H.; ALIAS, S. A.; ARIYAWANSA, H. A.; BLAIR, J. E.; CAI, L.; DE COOK AWAM, DISSANAYAKE, A. J.; GLOCKLING, S. L.; GOONASEKARA, I. D.; GORCZAK, M.; HAHN, M.; JAYAWARDENA, R. S.; VAN KAN JAL, LAURENCE, M. H.; LÉVESQUE, C. A.; LI, X.; LIU, J. K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; MANAMGODA, D. S.; MARTIN, F. N.; MCKENZIE, E. H. C.; MCTAGGART, A. R.; MORTIMER, P. E.; NAIR, P. V. R.; PAWLOWSKA, J.; RINTOUL, T. L.; SHIVAS, R. G.; SPIES, C. F. J.; SUMMERELL, B. A.; TAYLOR, P. W. J.; TERHEM, R. B.; UDAYANGA, D.; VAGHEFI, N.; WALTHER, G.; WILK, M.; WRZOSEK, M.; XU, J. C.; YAN, J.; ZHOU, N. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera I. *Fungal Diversity*, 67, 21–125. 2014.

HILLIS, D. M.; BULL J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42:182-192, 1993.

HO, W. C.; KO, W. H. (1997). A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38, 41–44. Disponível em: <http://www.mycobank.org>. Acessado em: 13/11/2014.

HOPKINS, K. E.; MCQUILKEN, M. P. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, 106:77-85, 2000.

HU, H. L.; JEEWON, R.; ZHOU, D. Q.; ZHOU, T. X.; HYDE, K. D. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and  $\beta$ - tubulin gene phylogenies. *Fungal Diversity*, 24:1–22, 2007.

IBGE/CEPAGRO. Levantamento sistemático da produção agrícola, setembro/2016. Disponível em: [ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201601.pdf](ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201601.pdf)>. Acessado em novembro de 2016.

ISMAIL, A. M.; CIRVILLERI, G.; POLIZZI, G. Characterisation and pathogenicity of *Pestalotiopsis uvicola* and *Pestalotiopsis clavispora* causing grey leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.) in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 135:619–625, 2013.

JANG, M. H.; AHN, S. Y.; Kim, S. H.; Nohh, J. H.; Yun, H. K. Evaluation of Grapevine Varietal Resistance to Anthracnose through Treating Culture Filtrates from *Elsinoe ampelina*. Hort. Environment Biotechnology. Korea, 2011.

JAYAWARDENA, R. S.; ZHANG, W.; LIU, M.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; ZHOU, Y.; HUANG, J. B.; NILTHONG, S.; WANG, Z. Y.; LI, X. H.; YAN, J. Y.; HYDE, K. D. Identification and characterization of Pestalotiopsis-like fungi related to grapevine diseases in China. Fungal Biology, 119:348–361, 2015.

JAYAWARDENA, R. S.; LIU, M.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; ZHANG, W.; XING, Q.; HYDE, K. D.; NILTHONG, S.; LI, X.; YAN, J. Neopestalotiopsis vitis sp. nov. causing grapevine leaf spot in China. Phytotaxa, 258:063–074, 2016.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of Pestalotiopsis and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. Molecular Phylogenetics and Evolution, 25:378–392, 2002.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; SIMPSON, J. A.; HODGKISS, I. J.; HYDE, K. D. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of Pestalotiopsis species. Molecular Phylogenetics and Evolution, 27:372–383, 2003.

JOSHI, S. D.; SANJAY, R.; BABY U. I.; MANDAL, A. K. Molecular characterization of Pestalotiopsis spp. associated with tea (Camellia sinensis) in southern India using RAPD and ISSR markers. Indian Journal of Biotechnology, 8:377–383, 2009.

KANG, J. C.; KONG, R. Y. C.; HYDE, K. D. Studies on the Amphisphaeriales I. Amphisphaeriaceae (sensu stricto) and its phylogenetic relationships inferred from 5.8S rDNA and ITS2 sequences Fungal Divers, 1:147–157, 1998.

KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M. E.; ZEE, F. T. Identification and characterization of Pestalotiopsis spp. causing scab disease of guava, Psidium guajava in Hawaii. Plant Disease, 90:16–23, 2006.

KEITH, L. M.; ZEE, F. T. Guava disease in Hawaii and the characterization of Pestalotiopsis spp. affecting guava. Acta Horticulturae, 849: 269–276, 2010.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. Dictionary of the Fungi. 9 ed. CAB International, Wallingford, 2001.

KORSTEN, L.; DE JAGER, E. S.; DE VILLERS, E. E.; LOURENS, A.; KOTZE, J. M.; WEHNE, F. C. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *Plant Disease*, 79:1149, 1995.

KUMMUANG, N.; DIEHL, S. V.; SMITH, B. J. e GRAVES, C. H. Jr. Muscadine grape berry rot diseases in mississippi: disease identification and incidence. *Plant Disease*, 80:238–243, 1996.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870-1874. 2016.

KUMAR, S.; THIND, T. S.; CHANDER, M. Occurrence of *Gloeosporium ampelophagum* and *Colletotrichum gloeosporioides* incitants of grape anthracnose during different months of Punjab. *Plant Disease Research*, 9:222-224, 1994.

LEANDRO, L. F. S.; GLEASON, M. L.; NUTTER, F. W.; WEGULO, S. N.; DIXON, P. M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*, 91:659-664, 2001.

LENNÉ, J. M. Some major plant diseases. In: *Plant Pathologist's Pocketbook* (WALLER, J. M., LENNÉ, J. M., WALLER, S. J., eds). 3<sup>rd</sup> edn. CABI, Wallingford, UK: 4–18. 2002.

LIU, A. R.; WU, X. P.; XU, T.; GUO, L.D.; WEI, J. G. Endophytic *Pestalotiopsis* from Hainan, China. *Mycosystema*, 25:389–397, 2006.

LIU, L.; LIU, S.; JIANG, L.; CHEN, X.; GUO, L.; CHE, Y. Chloropupe-keananin, the first chlorinated pupukeanane derivative, and its precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Org Lett* 10:1397–1400, 2008.

LIU, A. R.; CHEN, S. C.; WU, S. Y.; XU, T.; GUO, L. D.; JEEWON, R.; WEI, J. G. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57:528–535, 2010.

LIU, M.; ZHANG, W.; ZHOU, Y.; LIU, Y.; YAN, J. Y.; LI, X. H. First Report of Twig Anthracnose on Grapevine Caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. *Plant Disease*, 2016.

LOUIME, C.; LU, J.; ONOKPISE, O.; VASANTHAIAH, H. K. N.; KAMBIRANDA, D.; BASHA S. M.; YUN H. K. Resistance to *Elsinoë Ampelina* and Expression of

Related Resistant Genes in *Vitis Rotundifolia* Michx. Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 12:3473-3488; 2011.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 9:291-337. 2001.

LOPEZ, A. M. Q.; PEREIRA, D S. T. Interação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e ecótipos de pinha. *Bragantia*, 69:105-14, 2010.

MACIEL, D. B.; MEDEIROS, L. V.; MEDEIROS, V. V.; LEÃO, M. P. C.; CAMARGO, L. E. A.; OLIVEIRA, N. T. Amplification of the *cap20* Pathogenicity Gene and Genetic Characterization Using Different Markers Molecular in *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53:1255-1265, 2010.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; GUO, L. D.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50:167–187, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; GUO, L. D.; CHUKEATIROTE, E.; MACKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. A destructive new disease of *Syzygium samarangense* in Thailand caused by the new species *Pestalotiopsis samarangensis*. *Tropical Plant Pathology*, 38: 227–235, 2014.

MAPA. UVA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>. Acessado em 06/11/2014.

MATIOLI S. R. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 202p, 2001.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. de Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*, 41:1088-1093, 2011.

MELLO, L. M. R. *Vitivinicultura brasileira: Panorama 2014*, Comunicado técnico 175, Embrapa uva e vinho. Bento Gonçalves-RS. Setembro, 2015.

MILHOLLAND, R. D. Ripe rot. In: Pearson RC, Goheen AC (eds) *Compendium of grape diseases*. APS Press, St Paul, pp 18–19, 1988.

MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruit. In: Bailey, J.A.; Jeger, M. J. (Eds.) *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Wallingford. CAB International. 269-288, 1992.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Fitopatologia brasileira*, 27 (suplemento): S23, 2002.

MORTENSEN, J. A. Sources and inheritance of resistance to anthracnose in *Vitis*. *J. Hered.* 72:423-426, 1981.

NAG RAJ, T. R. Redisposals and redescriptions in the *Monochaetia*-*Seiridium*, *Pestalotia*-*Pestalotiopsis* complexes. II. *Pestalotiopsis besseyii* (Guba) comb. nov. and *Pestalosphaeria varia* sp. nov. *Mycotaxon*, 22:52-63, 1985.

NAG RAJ, T. R. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. *Mycologue Publications*, Waterloo, Ontario, Canada. 1993.

NAVES, R. L.; GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; FORCHESATO, M. Antracnose da videira: sintomatologia, epidemiologia e controle. Circular técnica 99. Bento Gonçalves, RS. Dezembro, 2006.

NEI, M.; S. KUMAR, *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. 2000

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I., AOKI, T.; CIGELNIK, E. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41:61-78, 2000.

OIV-Organização Internacional da Vinha e do Vinho. OIV 2015: Panorama Mundial. Disponível em: <<https://vinhosemsecredo.wordpress.com/2015/07/27/oiv-2015-panorama-mundial/>> Acessado em outubro de 2016.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 1991. 111 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1991.

OLIVEIRA, P. R. D.; SCOTTON, D. C.; NISHIMURA, D. S.; FIGUEIRA, A. Análise da diversidade genética por afluência e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27:454-457, 2005.

OLMOS, R. F. Enfermidades criptogâmicas de la vid. In: OLMOS, R. F. Viticultura moderna.

Montevideo: Editorial Agropécuária Hemisfério, 571-644, 1983.

PENG, L.; YANG, Y.; HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; LIU, Z. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Cryptogamie Mycology*, 33:267–283, 2012.

PEREIRA, W. V. Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo. 2009. 80 p. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2009.

PORWAL, S.; SHARMA, M. P. Chemical control of grape anthracnose in Rajsthan. *Pesticides*, 8:57-58, 1974.

PERES, N. A. R.; DE SOUZA, N. L.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, 88:125–130, 2004

POOLSAWAT, O.; THARAPREUKSAPONG, A.; WONGKAEW, S.; TANTASAWAT, P. Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 16:149–157, 2009.

REN, H. Y.; LI, G.; QI, X. J.; LI, F.; WANG, H. R.; WEI, J. G.; ZHONG, S. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing twig blight disease of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc) in China. *European Journal of Plant Pathology*, 137:451–461, 2013.

ROSA, A. J. M.; PAIVA, S. R. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Embrapa Cerrados. Documentos 254. Planaltina, DF. Maio, 2009.

RYU, H. W.; LEE, Y. H.; CHO, W. D.; KIM, W. G.; MYUNG, I. S.; JIN, K. S. Compendium of Fruit Tree Disease with Colour Plates. Agricultural Science Institute, Suwon 286, 1999.

RYU, H. W.; LEE, Y. H.; CHO, W. D.; KIM, W. G.; MYUNG, I. S.; JIN, K. S. Compendium of fruit tree disease with colour plates. Agricultural Science Institute, Suwon, p. 286, 1993.

- SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; BROWN, N. L.; COULSON, A. R.; FIDDES, J. C.; HUTCHISON, C. A.; SLOCOMBE, P. M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature*, 265:687-695, 1977.
- SAWANT, I. S.; NARKAR, S. P.; SHETTY, D. S.; UPADHYAY, A.; SAWANT, S. D. Emergence of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato as the dominant pathogen of anthracnose disease of grapes in India as evidenced by cultural, morphological and molecular data. *Australasian Plant Pathology*. 41, 493-504, 2012(a).
- SAWANT, I. S.; NARKAR, S. P.; SHETTY, D. S.; UPADHYAY, A.; SAWANT, S. D. First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose on grapes in Maharashtra, India. *New Disease Rep* 25: 2, 2012(b).
- SCHILLER, M.; LÜBECK, M.; SUNDELIN, T.; MELÉNDEZ, L. F. C.; DANIELSEN, S.; JENSEN, D. F.; ORDEÑANA, K. M. Two subpopulations of *Colletotrichum acutatum* are responsible for anthracnose in strawberry and leatherleaf fern in Costa Rica. *European Journal of Plant Pathology*, 116:107–118, 2006.
- SERGEEVA, V.; PRIEST, M.; NAIR, N. G. Species of *Pestalotiopsis* and related genera occurring on grapevines in Australia. *Aust Plant Pathol*, 34:255–258, 2005.
- SERGEEVA, V.; NAIR, N. G.; SPOONER-HART, R. Fungi recorded on grapevines during the course of an industry service on *Botrytis* monitoring and fungicide resistance. *Australian Grape Grower and Winemaker Annual Technical Issue*, 449:7-11, 2001.
- SHEU, Z.; WANG, T. Evaluation of phenotypic and molecular criteria for the identification of *Colletotrichum* species causing pepper anthracnose in Taiwan. *Proc Second Asian Conf Plant Pathology*, 14:26–27, 2005.
- SIMMONDS, J. H. A. study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 22:437-459, 1965.
- SINGH, N. I. Some new host records for India. *Indian Phytopathology*, 34:233–234, 1981.
- SHIRAISHI, M.; KOIDE, M.; ITAMURA, H.; YAMADA, M.; MITANI, N.; UENO, T.; NAKAUNE, R.; NAKANO, M. Screening for resistance to ripe rot caused by *Colletotrichum acutatum* in grape germplasm. *Vitis*, 46:196-200, 2007.

SILVA, F. de A. S. ASSISTAT versão 7.6 beta. Grande-PB: Assistência Estatística, Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN - Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Campina. Disponível em: <<http://www.assistat.com>>. Acessado em outubro de 2014.

SIVANESAN, A.; CRITCHETT, C. *Elsinoë australis*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 440:1-2, 1974.

SKIPP, R. A.; BEEVER, R. E.; SHARROCK, K. R.; RIKKERINK, E. H. A.; TEMPLETON, M.D. Colletotrichum. In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Pergamon/Elsevier Sci. Ltd. Public.: Oxford, vol.II: 119-142, 1995.

SMITH, G. J. D.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. The Xylariales: a monophyletic order containing 7 families. Fungal Diversity, 13:185-218, 2003.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among Colletotrichum species isolated from strawberry. Plant Disease, 74:69-76. 1990.

SÔNEGO, O. R. Principais doenças fúngicas da videira no Brasil e medidas de controle. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Instrução Técnica, 3). 5p. 2000.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. Doenças Fúngicas. In: Fajardo, T. V. M. (Ed.). Uvas para processamento: fitossanidade. Brasília: EMBRAPA informação tecnológica, 131p. 2003.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R. Avaliação da eficácia de algumas marcas comerciais de fosfíto de potássio e de fosfonato de potássio no controle do míldio da videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 13p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular técnica, 60), 2005.

SOUZA, J. S. I. de; PINHEIRO, E. de D. Pragas e moléstias. In: SOUSA, J. S. I. de. Uvas para o Brasil. 2. ed. rev. e atual. Piracicaba: FEALQ, p. 609-727, 1996.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. PCR-based detection of Colletotrichum acutatum on strawberry. Plant Pathology, 45:650-655, 1996.

STEYAERT, R. L. Contributions à l'étude monographique de Pestalotiopsis de Not. et Monochaetia Sacc. (Truncatella gen. nov. et Pestalotiopsis gen. nov.). Bulletin Jardin Botanique, 19:285-354. 1949.

- SUN, H. T., CAO, R. B. Identification of *Pestalotiopsis* parasitized on fruit crops (in Chinese). *Acta Agriculturae University Zhejiangensis*, 16:179–185. 1990.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum- biology, epidemiology and control* (Ed. by Bailey, J.; Jeger, M.), pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK. 1992.
- SUTTON, B. C. The Coelomycetes. *Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 1980.
- SUTTON, B. C. The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. *Canadian Journal of Botany*, 46:873–876, 1968.
- SUTTON, B. C. Development of fructifications in *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. and related species. *Canadian Journal of Botany*, 44:887–897, 1966.
- TEJESVI, M. V.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity*, 24:37-54, 2007.
- TIMMER L. W.; AGOSTINI, J. P.; ZITKO, S. E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease*, 78:329-334, 1994.
- THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R.. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*. Vol.22 No.9. 2006.
- TOZZE JUNIOR, H. J., MELLO, M. B. A., MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathol*, 32:77-79, 2006.
- TUSET, J. J.; HINAREJOS, C.; MIRA, J. L. First report of leaf blight on sweet persimmon tree by *Pestalotiopsis theae* in Spain. *Plant Disease*, 83:1070, 1999.
- URBEZ-TORRES, J. R.; ADAMS, P.; KAMA, J.; GUBLER, W. D. Identification, incidence and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60:497–507, 2009.

URBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLER, R. K.; URREA-ROMERO, K. E.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Divers*, 52:169–189, 2012.

UREÑA-PADILLA, A. R.; MACKENZIE, S. J.; BOWEN, B. W.; LEGARD, D. E. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology*, 92:1245-1252, 2002.

VIDA, J. B.; VERZIGNASSI, J. R.; TESSMANN, D. J.; OLIVEIRA, R. R.; AGUIAR, B. M.; CAIXETA, M. P.; NUNES, W. M. C. Mancha da Pestalotiopsis na cultura do coqueiro na região norte do estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 234, 2003.

XU, L.; KUSAKARI, S.; HOSOMI, A.; TOYODA, H.; OUCHI, A. Postharvest disease of grape caused by *Pestalotiopsis* species. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 65:305–311, 1999.

ZHARKIKH A.; Li W.H. Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences. I. Four taxa with a molecular clock. *Journal of Molecular Evolution*, 9:1119-1147, 1992.

ZOLAN, M.; PUKKILA, P. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cell Biology*, 6:195-200, 1986.

WU, C. G.; TSENG, H. Y.; CHEN, Z. C. Fungi inhabiting on *Schoeno-plectus triqueter* (L.) Palla (I). *Taiwania*, 27:35–38, 1982.

YANNA, W. H. H.; HYDE K. D. Fungal succession on fronds of *Phoenix hanceana* in Hong Kong. *Fungal Diversity*, 10:185–21. 2002.

YAN J. Y.; JAYAWARDENA, M. M. R. S.; GOONASEKARA, I. D.; WANG, Y.; ZHANG, W. LIU, M.; HUANG, J. B.; WANG, Z. Y.; SHANG, J. J.; PENG, Y. L.; BAHKALI, A.; HYDE, K. D. E LI, X. H. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. *Fungal Diversity*. 2014.

WATANABE, K.; MOTOHASHI, K.; ONO, Y. Description of *Pestalotiopsis pallidotheae*: a new species from Japan. *Mycoscience*, 51:182–188, 2010.

WEI, J. G.; XU, T.; GUO, L. D.; LIU, A. R.; ZHANG, Y.; PAN, X. H. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. *Fungal Diversity*, 24:55–74, 2007.

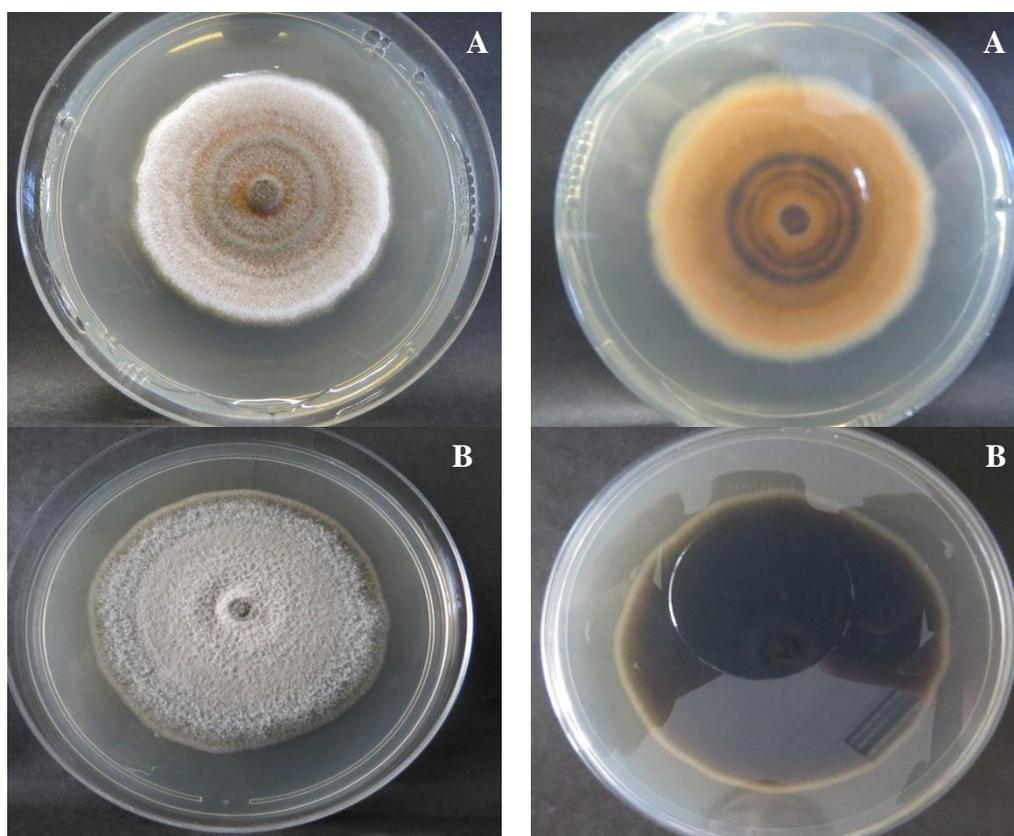
WEIR, B.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73:115–180, 2012.

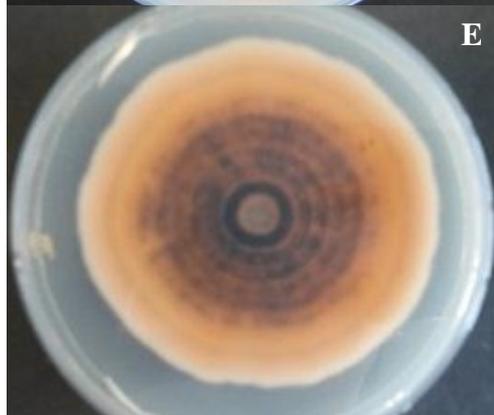
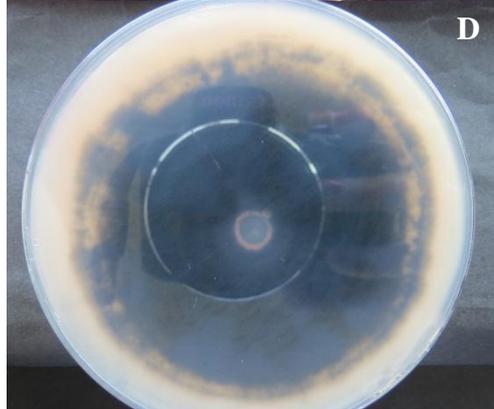
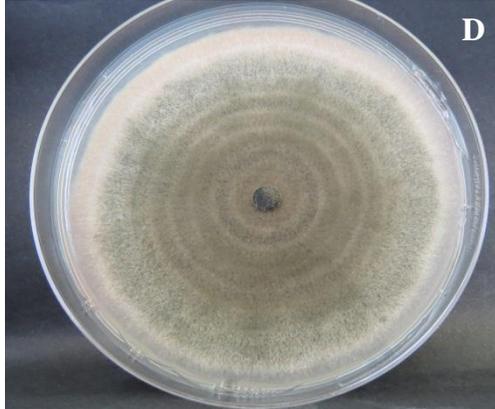
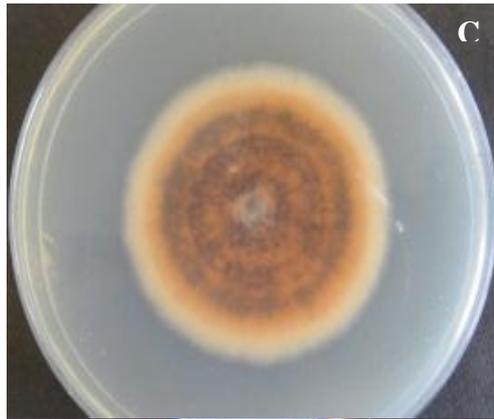
WHARTON, P. S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1) 2004.

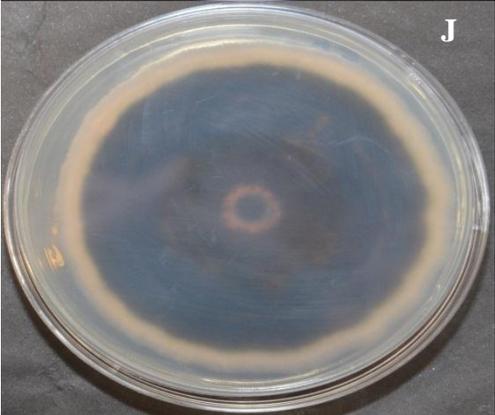
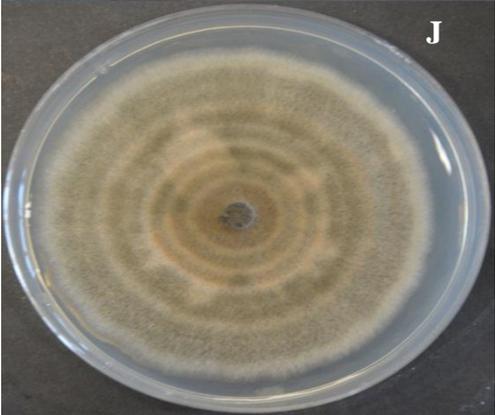
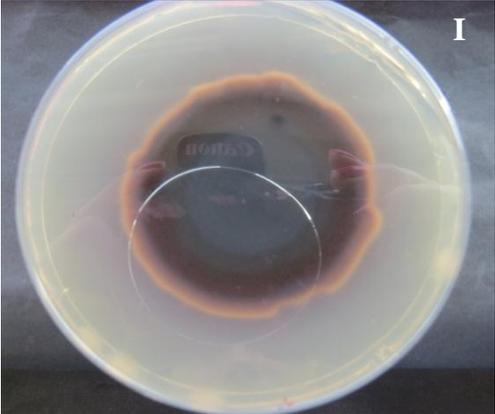
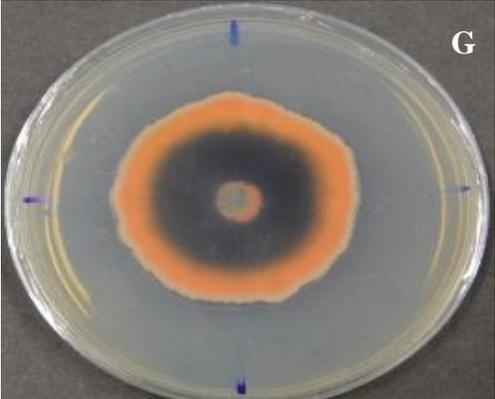
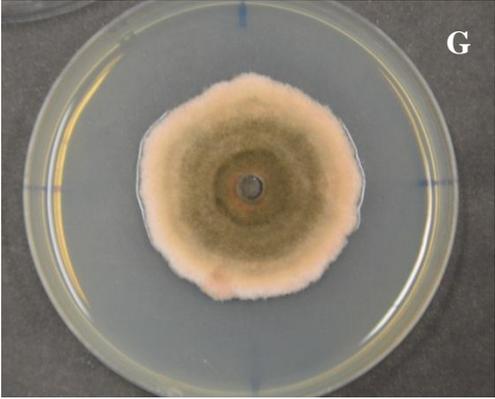
WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic, San Diego, pp 315–322, 1990.

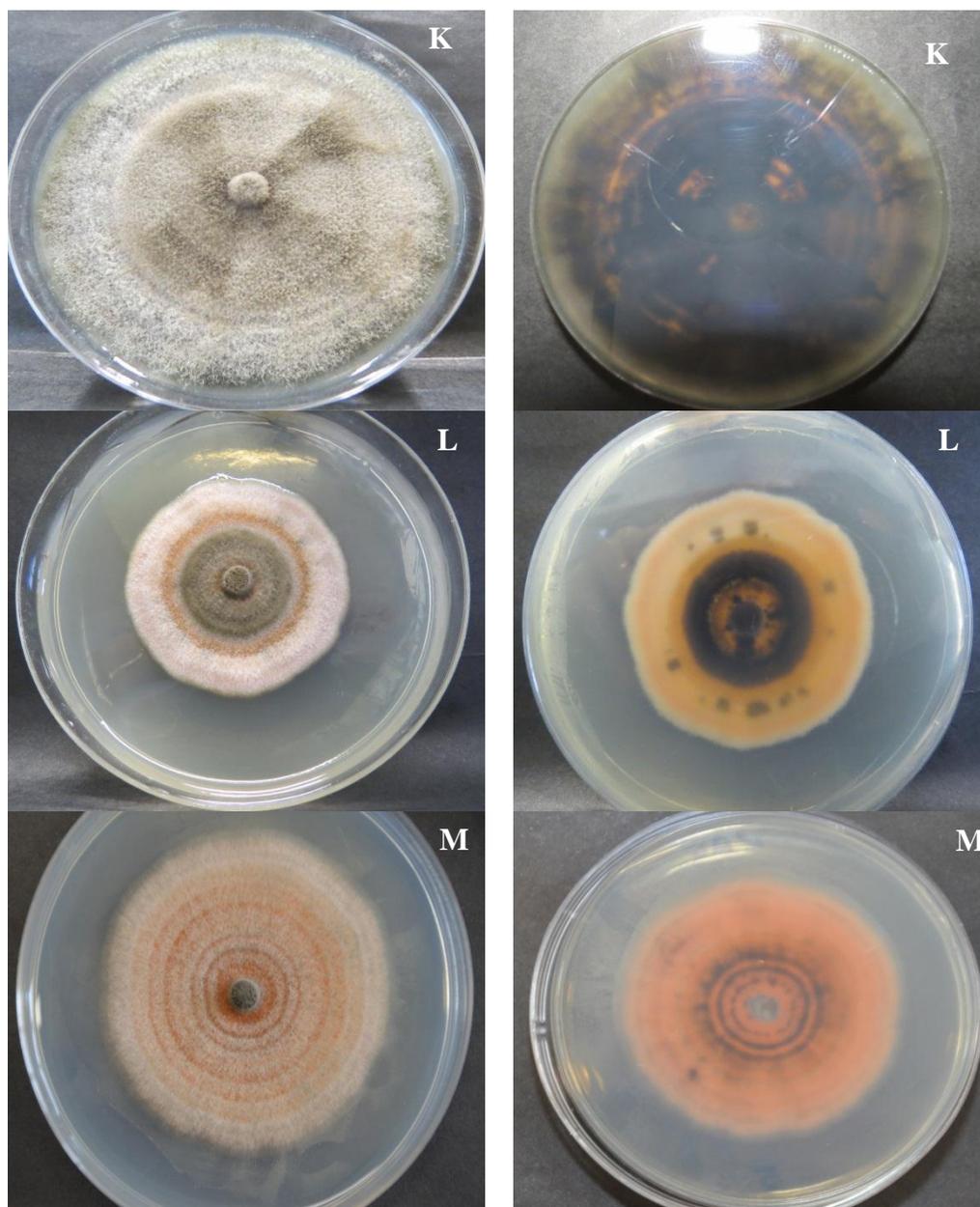
WHITELAW-WECKERT, M. A.; CURTIN, S. J.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; BLANCHARD, C. L.; ROFFEY, P. E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathology*, 56: 448–463, 2007.

## APÊNDICES

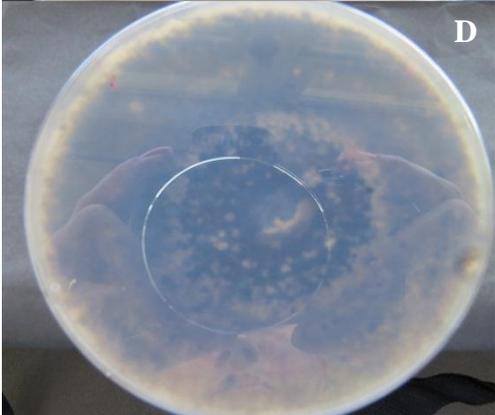
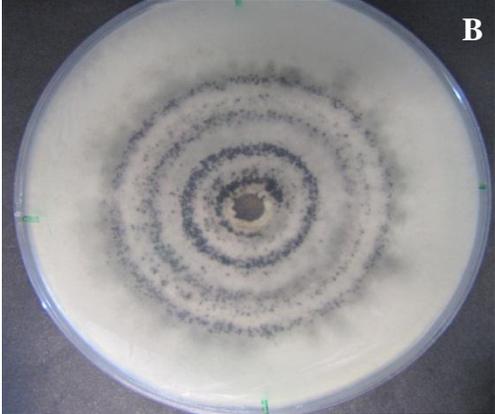
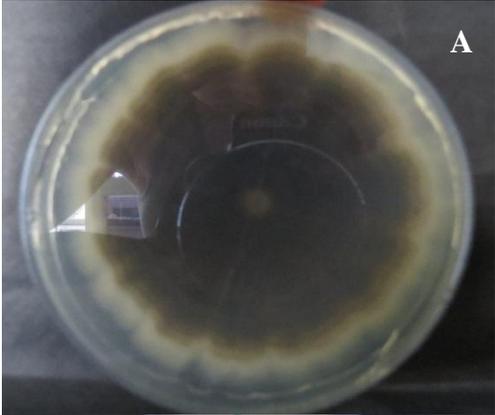
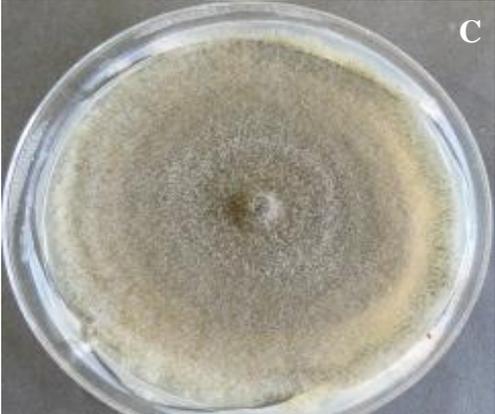


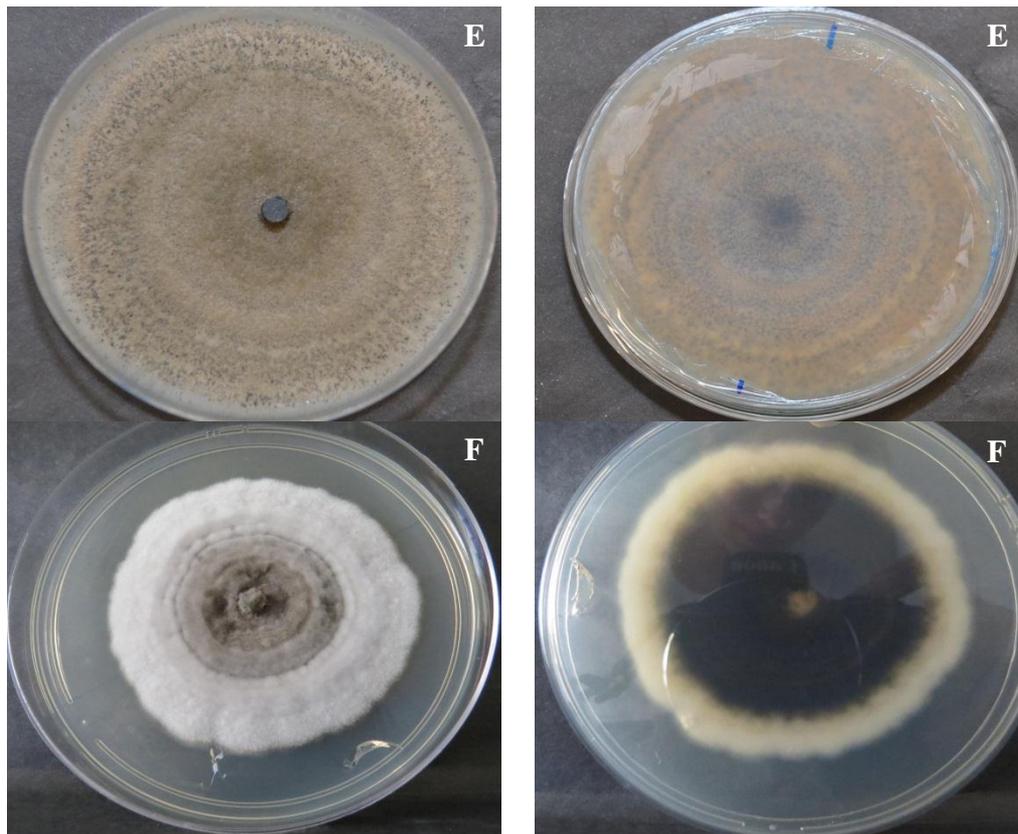






**Apêndice 1.** Frente e verso das placas de Petri com colônias dos diferentes isolados de *C. acutatum* em meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) obtidos de folhas, pecíolos, caules e bagas de videira com sintomas de antracnose. Grupo I: figuras A ao D; Grupo II: figuras E ao H; Grupo III: figuras I; Grupo IV: figuras J e K; Grupo V: figuras L e Grupo VI figuras M.





**Apêndice 2.** Frente e verso das placas de Petri com colônias dos diferentes isolados de *C. gloeosporioides* em meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) obtidos de folhas, pecíolos, caules e bagas de videira com sintomas de antracnose. Grupo I: figuras A; Grupo II: figuras B; Grupo III: figuras C; Grupo IV: figuras D; Grupo V: figuras E e Grupo VI figuras F.