

INFECÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FOLHAS DE  
MARACUJAZEIRO-AMARELO (*Passiflora edulis* Sims)

**BEATRIZ MURIZINI CARVALHO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2016

INFECÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FOLHAS DE  
MARACUJAZEIRO-AMARELO (*Passiflora edulis* Sims)

**BEATRIZ MURIZINI CARVALHO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF

80/2016

Carvalho, Beatriz Murizini

Infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) / Beatriz Murizini Carvalho. – Campos dos Goytacazes, 2016.

59 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira.

Área de concentração: Fitossanidade.

Bibliografia: f. 35-47.

1. HISTOPATOLOGIA 2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO 3. INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO 4. ULTRAESTRUTURA 5. DOENÇA FÚNGICA. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia.

CDD 575.5739

INFECÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FOLHAS DE  
MARACUJAZEIRO-AMARELO (*Passiflora edulis* Sims)

**BEATRIZ MURIZINI CARVALHO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como  
parte das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 25 de FEVEREIRO de 2016

Comissão examinadora:

---

Prof. Fábio Lopes Olivares (D. Sc., Agronomia) - UENF

---

Vicente Mussi-Dias (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Prof. Vicente Martins Gomes (D. Sc., Produção Vegetal) - IFF

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D. Sc., Fitopatologia) – UENF  
(Orientador)

À minha preciosa família, Ana, Jacinto e Rachel e ao meu amado namorado,  
Pedro Henrique, por sempre estarem em todos os momentos comigo, me  
apoiando e torcendo por mim

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, professor Silvaldo Felipe da Silveira, por toda orientação, confiança e dedicação que sempre demonstrou, contribuindo de forma fundamental para a minha formação.

Ao conselheiro e amigo, Vicente Mussi Dias, pelos conselhos, pelas inúmeras ajudas e pelos momentos de conversa e descontração, sem os quais essa caminhada teria sido mais pesada.

Ao professor Fábio Olivares, por toda disponibilidade e interesse que demonstrou pelo trabalho, sem sua ajuda esse trabalho não seria possível de realizar.

Ao professor Vicente Gomes, pelas contribuições que fez ao trabalho.

À Beatriz Ferreira, por sempre me receber com um sorriso e estar sempre disposta a me ajudar, me passando seus ensinamentos durante esse tempo de mestrado.

Ao Alexandre Almeida, por ter me cedido seu material para análise, sem o qual esse trabalho não se realizaria.

À minha querida Mãe, Ana Margarida, por toda a força depositada em mim ao longo dessa jornada e por sempre ter confiado em mim.

Ao meu querido pai, Jacintho, por toda ajuda e pelas inúmeras cobranças, que me fazem a cada dia querer enfrentar os obstáculos que vem pela frente.

À minha querida irmã, Rachel, por estar sempre presente, mesmo que longe, nessa caminhada e por sempre me dar força para seguir em frente, confiando em mim.

Ao meu querido namorado Pedro Henrique, que vem se demonstrando a cada ano como um verdadeiro companheiro, tanto para as horas sérias, como para as horas de descontração, primeiramente pela ajuda indispensável para a realização deste trabalho sempre com muito boa vontade, e por sempre me contagiar com seu bom humor e seu modo de ver a vida. Além dos conselhos e puxões de orelha, que foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

À grande amiga Jaqueline Souza, que mesmo com toda distância nossa amizade continua crescendo, pelos momentos de descontração e risadas nas conversas pela internet.

À minha companheira de república, Tamara Locatelli, pelos momentos de risos e alguns de estudos e por se fazer de meu “despertador” durante nosso primeiro ano de mestrado.

Aos amigos do laboratório, Camila, Tathianne, Janieli, Claudia, Gustavo, Tiago, Samila e Vivane, pela convivência e amizade. E ao professor e amigo Marcelo Vivas, por sempre estar disposto a me ajudar e a passar seus conhecimentos, o que me fez melhorar muito academicamente.

E finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 GERAL.....	4
2.2 ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1 Aspectos botânicos de <i>Passiflora</i> e sua importância .....	5
3.2 A Antracnose do maracujazeiro: importância, danos, etiologia e patogênese .....	6
3.3 A espécie <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	8
3.4 Patogênese da Antracnose - Infecção Quiescente .....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Preparo das mudas e condução das plantas.....	12
4.2 Obtenção e isolamento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	13
4.3 Obtenção das amostras para os estudos histopatológicos.....	13
4.3.1 Inoculação em folhas destacadas .....	13



4.3.2 Inoculação em folhas não destacadas.....	14
4.4 Preparações para Microscopia .....	14
4.5 Sobrevivência de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em folhas de maracujazeiro amarelo.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
5.1 Folhas destacadas.....	17
5.2 Folhas não destacadas.....	21
5.2.1 Microscopia Óptica de folhas diafanizadas.....	21
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	27
5.3 Sobrevivência de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em folhas de maracujazeiro assintomáticas .....	29
6 CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## RESUMO

CARVALHO, Beatriz Murizini; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Fevereiro, 2016 Infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira.

A cultura do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) apresenta grande importância no setor agrícola, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Diversos fatores podem influenciar sua produtividade, principalmente as doenças. A antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), principal doença em pós-colheita, tem sido responsável por grandes perdas no campo. Estudos sobre a fase inicial da infecção e colonização de *C. gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro podem elucidar aspectos relacionados com a patogênese e com o ciclo de vida deste patógeno em associação com o hospedeiro. Com o objetivo de realizar estudos histopatológicos dos eventos de pré-penetração, penetração e colonização de isolados de *C. gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro, inocularam-se dois isolados (Isolado I – Obtido de mudas; Isolado II – Obtido de frutos de maracujá; ambos com sintomas de antracnose) em folhas, da cultivar seleção Flora Brasil ‘FB 100’, aplicando-se suspensão de  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Em diferentes tempos de incubação em câmara úmida (3, 6, 18, 24, 48 e 72 horas e aos 15 e 21 dias após inoculação), realizaram-se análises por Microscopia Óptica e Eletrônica de Transmissão. Analisou-se a patogênese do fungo em folhas de plantas mantidas em casa-de-vegetação nos tempos de 3, 6, 18, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai), e de folhas destacadas em 15 e 21 dias após a inoculação (dai). Nas amostras

de folhas de plantas inoculadas na casa-de-vegetação, a germinação conidial foi observada às 3 hai, para ambos isolados. A formação dos apressórios foi às 6 hai para o isolado II, e mais tardiamente (12 hai) para o isolado I. Com 18 hai os apressórios do isolado I já haviam emitido peg de penetração, o que ocorreu 24 hai para o isolado II. Os apressórios apresentaram tendência de se formarem nas junções celulares da epiderme e do complexo estomático, mostrando que o fungo não utiliza aberturas naturais para a penetração, a qual se dá de maneira direta, como é amplamente descrito para esse patógeno. Às 48 e 72 hai evidenciou-se a presença de hifas intramurais nas células da epiderme. A presença de vesícula de infecção abaixo da parede celular da epiderme foi observada 72 hai. A partir das folhas destacadas e sem sintomas foram encontrados apressórios nos cortes foliares analisados, mas não foi observada estrutura infectiva abaixo da epiderme aos 15 e 21 dai. Em folhas destacadas, que manifestaram sintomas 15 dai, foi possível observar grande quantidade de hifas nos espaços intercelulares dos tecidos subepidérmicos e adensamento de organelas celulares nas células hospedeiras, em resposta a presença das hifas do patógeno. O fungo permaneceu vivo e na forma de hifas e de vesículas de infecção, em folhas de maracujazeiros inoculadas e sem causar sintomas aos 30 dias após a inoculação, o que mostra que o fungo apresenta uma fase latente nesse patossistema, que pode ser na forma de vesículas intramurais, apressórios ou colonização endofítica. Aventa-se que esta relação endofítica seja uma estratégia de sobrevivência em folhas de maracujá, e não somente uma fase de quiescência, como descrito nas infecções de *C. gloeosporioides* em frutos verdes e assintomáticos.

## ABSTRACT

CARVALHO, Beatriz Murizini; M.Sc.; Northern Rio de Janeiro State University Darcy Ribeiro. February, 2016. Infection of *Colletotrichum gloeosporioides* on passion fruit leaves (*Passiflora edulis* Sims). Advisor: Silvaldo Felipe da Silveira.

Yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) crop has huge importance for agricultural sector and Brazil is the world's largest producer. Several factors can influence its productivity, especially diseases. Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), the main post-harvest disease, has also been responsible for severe damage to plantations, causing defoliation and dieback. Early stage and colonization studies of *C. gloeosporioides* in passion fruit leaves can elucidate aspects of pathogenesis and pathogen life cycle in association with the host. Aimed histopathological studies of pre-penetration, penetration and colonization events of *C. gloeosporioides* isolates on passion fruit leaves, we inoculated two *C. gloeosporioides* isolates (Isolate I - Obtained from seedlings with anthracnose symptoms. Isolate II. - Obtained from passion fruit with anthracnose symptoms.) on passion fruit leaves, 'FB 100' cultivar, pipetting suspension of  $10^5$  conidia.mL<sup>-1</sup> and testing different incubation times in moist chamber (3, 6, 18, 24, 48 and 72 hours after inoculation - hai, 15 and 21 days after inoculation - dai). Sample tissues were analyzed by Light Microscopy and Electronic Transmission. It was possible to analyze the fungus pathogenesis in leaves of plants maintained in greenhouse (3, 6, 18, 24, 48 and 72 hai) and on detached leaves, maintained in moist chambers, (15 and 21 dai.) under laboratory conditions. The conidial germination was observed in the first count, 3 hours after inoculation (hai), for both

isolates. Young appressoria were observed at 6 hai to isolate II and later, at 12 hai, for isolated I. At 18 hai appressoria had already emitted penetration peg for isolate I and at 24 hai for isolated II. The appressoria tended to form in the epidermal and guard cells junctions, showing that the fungus does not use stomata openings for penetration, which occurs directly, as widely described for this pathogen. At 48 and 72 hai were evident the intracellular hyphae in epidermis cell. The presence of infection bladder down the epidermis cell wall was observed at 72 hai, but we didn't observe appressoria in cuts at 24, 48 and 72 hai. At 15 and 21 dai many appressoria were found in leaf fragments of detached leaves, but any infective structure were seen under epidermis. At 15 dai, for symptomatic detached leaves large amount of hyphae was observed in the intercellular spaces of subepidermal tissues and, in response to infection, lots of cell organelles and electrondense materials inside the host cells. The fungus remained alive in inoculated passion fruit leaves without causing symptoms up to 30 dai, probably in the intramural vesicles form, appressoria or endophytic colonization. It suggest that this endophytic relationship is a survival strategy in passion fruit leaves, and not only a quiescent phase, as described in *C. gloeosporioides* infections in immature and asymptomatic fruit.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro-amarelo ou maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) apresenta grande importância no setor agrícola, principalmente pela ampla utilização e aceitação da fruta no mercado mundial (Meletti, 2011). O fruto é comercializado principalmente *in natura* e utilizado no preparo de sucos, doces, geleias, sorvetes, licores e farinhas (Ruggiero, 1998; Cavichioli et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, com uma produção em expansão estimada de 14.488 Kg/ha/ano, sendo a região sudeste a maior produtora com uma produção de 21.069 Kg/ha/ano (IBGE, 2014). Os fatores que mais influenciam e prejudicam a produtividade desta fruteira no campo são a polinização deficiente, tipos e quantidade de fertilizantes inadequados, fatores climáticos adversos e ataque de doenças e pragas. As doenças, por sua vez, apresentam um papel relevante na redução da produtividade dos pomares e na qualidade dos frutos, sendo, inclusive, responsáveis pelo declínio da cultura em várias regiões do Brasil (Fischer, Kimati e Rezende, 2005).

Dentre as doenças que incidem na cultura do maracujazeiro, destacam-se as que não possuem estratégias eficientes de controle, tais como: a antracnose, a morte prematura e o endurecimento dos frutos, ocasionados respectivamente pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae* (Pereira, 1969) Dye (associado por vezes

a outros patógenos) e pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Nascimento et al., 2004; Fischer et al., 2007).

A antracnose é considerada a principal e mais comum doença em maracujá-amarelo na pós-colheita e tem sido responsável também por grandes perdas no campo (Junqueira et al., 1999). A antracnose nos frutos inicialmente não acomete a polpa, mas a lesão na casca desqualifica o produto para comercialização. Na pós-colheita, as lesões nos frutos evoluem para podridões profundas e secas, seguindo-se a contaminação e fermentação do suco e a descoloração das sementes (Junqueira et al., 2003b, Fischer et al., 2007).

No campo, o ataque de *C. gloeosporioides* induz a desfolha, que comumente se agrava após a primeira colheita e ao longo do segundo ano de cultivo, culminando com declínio da produção. Em plantios sem controle químico, Torres Filho (1983) cita uma mortalidade de até 80% das plantas devido a antracnose no segundo ano de cultivo, em lavouras irrigadas no Ceará. As recomendações para manejo da doença no campo não têm proporcionado controle eficaz e cultivares comerciais do maracujá-amarelo não têm demonstrado níveis de resistência satisfatórios para o controle da antracnose (Junqueira et al., 2003a, Fischer et al., 2007).

A disseminação do *C. gloeosporioides* dentro da lavoura ocorre principalmente através de respingos de chuvas, eventualmente por insetos, sementes e implementos agrícolas (Ntahimpera et al., 1999; Madden et al., 1996; Boudreau & Madden, 1995). Esse fungo pode sobreviver em sementes, restos de cultura no solo e em tecidos afetados da própria planta (Ureña-Padilla et al., 2001), o que torna seu controle difícil.

A maioria dos casos de antracnose na pós-colheita originam-se no campo. Na pré-colheita, as condições fisiológicas e climáticas não favorecem o aparecimento dos sintomas nos frutos. Devido às infecções quiescentes, os frutos infectados sem sintomas não são descartados no momento da seleção, embalagem e transporte. A inibição do desenvolvimento dos fitopatógenos nessas infecções ocorre devido às condições fisiológicas impostas pelo próprio hospedeiro, as quais permanecem até o início do seu amadurecimento (Choudhury, 2004).

Existem inúmeros estudos relatando a importância da antracnose em frutos de maracujá (Moura *et al.*, 2012, Fischer *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2006). Entretanto, são poucos trabalhos que visam elucidar os processos de sobrevivência e infecção de *C. gloeosporioides* em plantas de maracujazeiro. Estes estudos além de descrever detalhes do processo infeccioso, explicam a forma de sobrevivência, as fontes de inóculo possíveis, bem como determinam fatores que condicionam a ocorrência da doença e a predisposição do hospedeiro à desfolha verificada no campo.

Propôs-se, nesse trabalho, descrever o processo infeccioso de *C. gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro-amarelo mediante estudos histopatológicos por meio de Microscopia Óptica e da Microscopia Eletrônica de Transmissão; bem como avaliar a sobrevivência do patógeno em folhas de plantas inoculadas em casa de vegetação.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Caracterizar atributos etiológicos de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) nos estágios iniciais da patogênese.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Verificar a forma de penetração e colonização de *C. gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro por microscopia óptica (MO) e eletrônica de transmissão (MET) e descrever a fase inicial da patogênese.

Avaliar a sobrevivência de *C. gloeosporioides* em folhas inoculadas de maracujazeiro.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aspectos botânicos de *Passiflora* e sua importância

Maracujá é o nome popular dado a várias espécies de plantas pertencentes ao gênero *Passiflora*. O termo deriva de maraú-ya, que para os indígenas significa "fruto de sorver" ou "polpa que se toma de sorvo" (Zeirak *et al.*, 2010).

A primeira espécie de maracujá descrita no Brasil foi a *Passiflora incarnata* L., por Nicolás Monardes em 1569, sob o nome de Granadilla, porém a primeira referência ao maracujá data de 1587 na obra "Tratado Descritivo do Brasil" como "erva que dá fruto" (Rocha, 2004). No país atualmente, são registrados cinco gêneros com cerca de 120 espécies, sendo 12 delas raras. A maioria produz frutos comestíveis, porém com poucas cultivares (Souza & Lorenzi, 2008).

As espécies de maior interesse comercial no Brasil são *P. edulis* Sims (maracujá-azedo, amarelo ou roxo) e *P. alata* Curtis (Maracujá-doce) (Ruggiero, 1987; Malerbo-Souza *et al.*, 2002; Bernacci *et al.*, 2003; Meletti, 2011). Dentre essas espécies, o maracujá-amarelo (*P. edulis*) está presente em 97% da área total plantada no país e do volume comercializado. Cerca de 60% da produção é destinada ao consumo *in natura* e o restante às indústrias de processamento, sendo o suco o principal produto (Cavichioli *et al.*, 2008).

O maracujazeiro apresenta importância econômica devido às inúmeras características físico-químicas e fármaco-terapêuticas de seus produtos e

subprodutos do processamento dos frutos, sementes, folhas e raízes. Da parte aérea da planta extraem-se fármacos e são popularmente consumidos na América e Europa para o tratamento de ansiedade, insônia e irritabilidade (Dhawan *et al.*, 2001; Akhondzadeh *et al.*, 2001; Cavichioli *et al.*, 2008; Zeraik *et al.*, 2010). O suco da fruta também possui valor medicinal, sendo fonte de compostos antioxidantes, devido à presença de polifenóis, principalmente flavonoides (Zeraik *et al.*, 2010).

O maracujá também tem sido estudado para o tratamento contra a dependência a canabinoides (termo genérico usado para descrever substâncias naturais ou artificiais, que ativam os receptores canabinoides) (Dhawan & Sharma, 2003), diminuição da resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (Queiroz *et al.*, 2012) e alcoolismo crônico (Carlini *et al.*, 2006).

Dentre os subprodutos do processamento do fruto, cascas e sementes podem ser utilizadas na alimentação, tanto humana, como animal. As cascas possuem fibras solúveis (pectina), que são benéficas aos seres humanos, além de serem ricas em niacina, ferro, cálcio e fósforo. Das sementes obtém-se óleo, altamente atraente para indústrias cosméticas, devido ao seu alto teor de ácidos graxos raros (Zeraik *et al.*, 2010; Espirito-Santo *et al.*, 2013; Spoladore *et al.*, 2014).

A planta do maracujá possui ainda potencial para uso ornamental, devido as suas belas flores, atrativas pelo seu tamanho, exuberância de cores e originalidade de formas (Peixoto, 2005).

### **3.2 A Antracnose do maracujazeiro: importância, danos, etiologia e patogênese**

A antracnose é uma importante doença em fruteiras tropicais, causando sérios danos, especialmente na fase de pós-colheita (Arauz, 2000). A sua-etilogia é atribuída a fungos coelomicetos que produzem estruturas acervulares em plantas, destacando-se aqueles do gênero *Colletotrichum*. A doença caracteriza-se por apresentar lesões necróticas escuras e profundas em órgãos suculentos e nas nervuras foliares (Ainsworth, 1971, citado por Pereira, 2009). É particularmente comum e importante em fruteiras tropicais e olerícolas, plantas medicinais, arbustivas e árvores silvestres, causando podridões de colmos, caules e frutos,

seca-de-ponteiros, manchas foliares, infecções latentes ou quiescentes e antracnoses em folhas e frutos (Photita *et al.*, 2004; Waculicz-Andrade, 2009). A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc [teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk] é a espécie comumente associada a antracnose em frutos de plantas cultivadas, como no caso da antracnose do maracujazeiro (Fischer, Kimati e Rezende, 2005).

Na cultura do maracujazeiro, no Brasil, a doença incide principalmente na pós-colheita, constituindo-se na mais importante doença pós-colheita da cultura do maracujazeiro, reduzindo o período de conservação dos frutos. No campo, assume grande importância, principalmente quando associada à mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*), estado fisiológico da planta e condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do fungo. Nessas condições a doença induz comumente à desfolha acentuada quanto mais desenvolvida estiver a lavoura, especialmente após a primeira colheita, comprometendo a produção no segundo ano de cultivo (Torres Filho, 1983; Fischer, 2007).

A doença provoca sintomas em toda a parte aérea da planta, causando lesões necróticas em folhas, frutos, ramos e apodrecimento em pós-colheita nos frutos. Os sintomas nas folhas são manchas irregulares, de coloração marrom claro a escuro e bordos indefinidos. Nos frutos, durante o amadurecimento, formam-se manchas superficiais circulares ou irregulares, de coloração creme a marrom claro, com bordos úmidos e indefinidos, que evoluem para podridões deprimidas e com bordos encharcados. Nos ramos, a doença forma cancrios irregulares, de coloração esbranquiçada a creme, que com o aumento da lesão pode provocar anelamento e seca dos ponteiros (Medeiros & Peruch, 2012).

Frequentemente as áreas lesionadas de folhas, ramos e frutos apresentam sinais na forma de pequenos pontos pretos, que são acérvulos do fungo, os quais, nos frutos e em condições de alta umidade, são cobertos por uma massa rosada constituída de conídios do fungo embebidos em matriz mucilagínosa (Bailey *et al.*, 1992). Nos frutos, infecções secundárias por patógenos apodrecedores ocorrem a partir das lesões da antracnose, agravando as perdas e a depreciação do produto na pós-colheita (Lima Filho *et al.*, 2003).

### 3.3 A espécie *Colletotrichum gloeosporioides*

O gênero *Colletotrichum* engloba fungos mitospóricos, que produzem conídios em acérvulos (coelomicetos) com teleomorfos em *Glomerella* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (Skipp *et al.*, 1995, Dutra, 2008).

As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica, particularmente em regiões quentes e úmidas, como nos trópicos (Jeffries *et al.*, 1990; Pereira, 2009) e são extremamente diversas, podendo ser saprófitas e fitopatogênicas. As espécies fitopatogênicas causam doenças importantes na maioria das culturas, principalmente nas fruteiras tropicais e em diversas olerícolas (Photita *et al.*, 2004; Waculicz-Andrade, 2009).

Taxonomicamente, espécies de *Colletotrichum* se dividem em dois grupos ou “espécies complexas”: O complexo “*gloeosporioides*”, que inclui espécies com conídios cilíndricos, e o complexo “*acutatum*” (*Colletotrichum acutatum* H. Simmonds), que apresentam conídios fusiformes (Phoulivong *et al.*, 2010). *C. gloeosporioides (lato sensu)* é reconhecido como um dos táxons mais importantes, sendo este registrado em 1967 publicações de ocorrência no mundo, causando infecções em 904 espécies de plantas hospedeiras diferentes (Farr & Rossman, 2011; Phoulivong *et al.*, 2010), principalmente nos trópicos. Seus conídios são hialinos e unicelulares, geralmente formados em conjuntos em uma mucilagem de coloração salmão. As células conidiogênicas geralmente são agregadas em acérvulos, mas também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio (Menezes, 2002; Fischer, Kimati e Rezende, 2005).

O processo infeccioso de *C. gloeosporioides* em plantas é amplamente conhecido e caracterizado. Na presença de água sobre as folhas e frutos os conídios germinam produzindo tubo germinativo, em cujo ápice diferencia-se uma célula globosa e melanizada, que se fixa na superfície promovendo adesão, denominada apressório. Apressórios podem ser formados no promicélio ou diretamente dos conídios ou ascósporos. No início são hialinos e com o passar do tempo tornam-se castanhos ou cinza escuros. Apressórios de *Colletotrichum* spp. apresentam formatos arredondados ou levemente clavados a irregulares, sendo esta variabilidade, juntamente com a morfologia dos conídios, uma importante característica para delimitação morfológica de espécies do gênero (Sutton, 1992).

Epidemias de antracnose são favorecidas por temperaturas elevadas, associadas a molhamento foliar (Buffon, 2010). A água na sua forma líquida apresenta papel primordial na disseminação do fungo e no seu processo infeccioso. Os conídios são soltos e dispersos dos acérvulos pela água na forma de respingos de chuva ou irrigação, ou podem também ser dispersos por insetos, ou serem disseminados mecanicamente por ferramentas e pelo contato manual. A água promove a dissociação dos conídios produzidos em mucilagem e dilui a biotina presente na mesma, que apresenta efeito auto inibitório, impedindo a germinação dos conídios antes da sua dispersão e disseminação. Após a deposição dos conídios na superfície da planta hospedeira ocorre a germinação com emissão do tubo germinativo que, no ápice, após septação, diferencia-se em uma célula entumescida, de parede grossa e melanizada, que é o apressório. A função do apressório é promover a adesão e a penetração do patógeno no hospedeiro. Os apressórios se formam em resposta a estímulos físicos e químicos da superfície da planta hospedeira (Jeffries *et al.*, 1990). A penetração normalmente ocorre diretamente, pela digestão e compressão pontual (punção) da cutícula da planta pelo peg de penetração, que se desenvolve abaixo do apressório (Figura 1) (Bailey *et al.*, 1992; Mendgen & Deising, 1993). O patógeno pode permanecer quiescente ou dormente (inativo), até o início do amadurecimento dos frutos ou da senescência dos órgãos parasitados (Prusky, 1996).

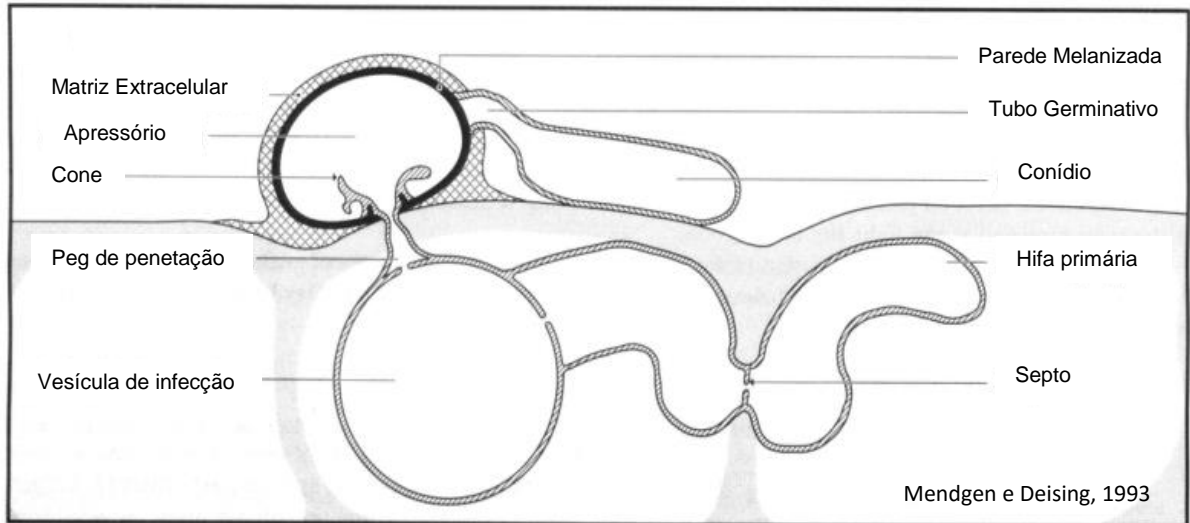


Figura 1 (Mendgen & Deising, 1993). Esquema simplificado das estruturas de infecção de *Colletotrichum lindemuthianum*. Mostrando conídio, tubo germinativo, apressório, peg de penetração, vesícula de infecção e hifas de colonização em células de planta hospedeira.

### 3.4 Patogênese da Antracnose - Infecção Quiescente

O termo infecção quiescente descreve uma relação parasítica dormente ou quiescente, durante a qual, o patógeno infectivo permanece inativo (paralisado ou dormente), sem induzir sintomas. Embora o início do processo infeccioso já tenha ocorrido, durante a quiescência não há patogênese, ou seja, não há alterações fisiológicas perceptíveis ou que resultem na expressão de sintomas da doença no órgão infectado. Após o período quiescente, o patógeno retoma sua atividade e prossegue à patogênese, colonizando os tecidos do hospedeiro, causando a morte de células e induzindo à expressão dos sintomas característicos da doença (Prusky & Plumbley, 1992).

*Colletotrichum gloeosporioides* e outras espécies do mesmo grupo, patogênicas em plantas, comumente desenvolvem infecções quiescentes em frutos. A quiescência é considerada uma forma de parasitismo evoluído, onde o patógeno adaptou-se ao hospedeiro, infectando seus tecidos numa fase em que estes são resistentes à colonização necrotrófica, dentre outros motivos, devido a presença de compostos antifúngicos pré-formados ou pela ausência de nutrientes essenciais ao crescimento fúngico. Quando os frutos amadurecem ou os tecidos

do hospedeiro iniciam senescência, os compostos antifúngicos são extintos e os nutrientes, principalmente açúcares, agora disponíveis, possibilitam o crescimento do patógeno, que prossegue com a colonização necrotrófica dos tecidos (Prusky, 1996).

Essa quiescência nos tecidos do hospedeiro pode ocorrer em diferentes fases ou formas (estruturas), dentre as quais, destacam-se: apressórios; hifas subcuticulares, subepidérmicas ou intercelulares; vesículas infectivas em células epidérmicas e subjacentes; sendo esses fatores variáveis conforme as espécies de *Colletotrichum* e hospedeiro. Em frutos verdes de mamão, citrus, banana e abacate, a quiescência é principalmente atribuída ou garantida pelos apressórios. Já, em manga e amora, a quiescência foi demonstrada na forma de hifas subcuticulares (Peruch, 1998).

Todavia, em maracujazeiro, não existem estudos precedentes sobre a infecção em folhas. O entendimento do processo infeccioso e da possível quiescência de *C. gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro é importante para se elucidar não só o processo infeccioso, mas, também, poderá embasar outros estudos histopatológicos das reações eventuais de resistência de genótipos do hospedeiro, e, também, para se melhor compreender a epidemia no campo, o que possibilitará estabelecer estratégias mais eficientes para o controle da antracnose do maracujazeiro.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparo das mudas e condução das plantas

Foram realizados dois experimentos em folhas de maracujazeiro. No primeiro, utilizaram-se folhas destacadas e incubadas em laboratório. No segundo, inocularam-se folhas, não-destacadas, de plantas mantidas em casa de vegetação. No primeiro experimento as mudas foram produzidas de sementes de frutos de maracujá-amarelo obtidos do mercado local. No segundo experimento, as mudas foram fornecidas pelo viveiro da prefeitura de São Francisco do Itabapoana - RJ.

Para produção de mudas por sementes, procedeu-se o despoldamento em liquidificador doméstico com as pás cobertas por fita adesiva para não afetar a viabilidade da semente (Lima, 1973). As sementes foram secas a sombra em papel absorvente e armazenadas a temperatura ambiente até o plantio. O substrato utilizado para a produção das mudas foi o Plantmax<sup>®</sup> (Eucatex<sup>®</sup>), tratado para a desinfestação por 24 horas em solarizador (Martins et al., 2003). Utilizou-se tubetes de 15 x 5 cm semeando-se 3 sementes em cada um. Após a germinação, foi feito o desbaste deixando apenas uma planta por tubete. Ao atingirem 10 cm de altura as mudas foram transferidas para vasos plásticos, com capacidade de 3 L, contendo terra e areia na proporção de 2:1 e 30 gramas de adubo químico formulado (4-14-8). As mudas foram mantidas em casa de vegetação, onde foram tutoradas e conduzidas em arame para posterior coleta das folhas.

As mudas do segundo experimento foram de maracujá-amarelo, cultivar Flora Brasil 'FB 100', produzidas originalmente pela empresa Viveiros Flora Brasil®. As mudas foram fornecidas pelo horto municipal de São Francisco de Itabapoana – RJ, as quais foram transplantadas para vasos de 10 L, contendo substrato de terra e esterco curtido (1:1) e mantidas em casa-de-vegetação. Os tratos culturais, podas e molhamento foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura.

#### **4.2 Obtenção e isolamento de *Colletotrichum gloeosporioides***

Para o experimento em folhas destacadas foi utilizado apenas um isolado de *Colletotrichum*, oriundo de frutos apresentando sintomas de antracnose. No segundo experimento em folhas não-destacadas foram utilizados dois isolados, o Isolado I, proveniente de ramos de mudas doentes, e o Isolado II, citado acima.

Fragmentos de frutos de maracujazeiro apresentando sintomas de antracnose, Isolado II, foram submetidos ao isolamento indireto segundo Alfenas et al. (2007) e adicionados em meio BDA (batata-dextrose-ágar), em placas de Petri. O Isolado I, proveniente de mudas de maracujazeiro apresentando sintomas de antracnose, foi isolado de forma direta, onde acérvulos do fungo foram transferidos da haste da muda para o meio BDA em placa de Petri. Após isolamento e identificação morfológica das colônias dos dois isolados, as culturas foram repicadas e mantidas em meio BDA em temperatura controlada de 25°C.

#### **4.3 Obtenção das amostras para os estudos histopatológicos**

##### **4.3.1 Inoculação em folhas destacadas**

Folhas destacadas de maracujazeiro amarelo, obtidas de plantas mantidas em casa-de-vegetação, como descrito anteriormente, foram utilizadas para avaliar a penetração e a colonização de *C. gloeosporioides*. As folhas foram destacadas e inoculadas com uma suspensão contendo  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, depositando-se uma gota de 20µL por ponto de inoculação, sendo estes sobre a superfície abaxial das folhas, em todas as bifurcações primárias da nervura central.

Após inoculação, as folhas foram colocadas em bandejas plásticas, previamente desinfestadas com álcool 70% e dispostas com a parte abaxial para

cima. Em cada bandeja depositou-se um chumaço de algodão embebido em água para criar condição de câmara úmida e na base de cada pecíolo foi inserido um chumaço de algodão embebido em solução nutritiva de *Hoagland* (Hoagland & Arnon, 1950). As bandejas foram ensacadas com plástico transparente, para manter umidade interna e incubadas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz, por até 21 dias. Folhas sem sintomas, com 15 e 21 dai, e folhas com sintomas, 15 dai, foram incluídas em resina e submetidas aos cortes em ultramicrótomo.

#### **4.3.2 Inoculação em folhas não destacadas**

Plantas de maracujazeiro-amarelo 'FB 100' com aproximadamente 5 meses de transplântio, foram inoculadas com os dois isolados de *C. gloeosporioides* supracitados. Para isso, conídios foram obtidos por lavagem de culturas em placas, com 15 dias de incubação e uma gota, aproximadamente 20 µL de suspensão de  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, foi depositada em três locais marcados na superfície abaxial das folhas, junto a nervura central. Escolheu-se as folhas do terço médio do ramo principal da planta. Utilizou-se caneta de marca permanente para demarcação da área inoculada.

Após inoculação, as folhas foram mantidas sob câmara úmida, por 48 h, envolvida com saco de filme plástico transparente, em cujo interior foi adicionado um chumaço de algodão umedecido com água esterilizada. As coletas das folhas inoculadas para avaliações sob microscopia óptica foram realizadas em 4 tempos: às 3, 6, 18 e 24 h após a inoculação (hai) para cada isolado selecionado, totalizando 8 folhas. Para a MET as coletas foram em 3 tempos, às 24, 48 e 72 hai, sendo uma folha por tempo para cada isolado, totalizando 6 folhas.

#### **4.4 Preparações para Microscopia**

Todas as folhas coletadas, tanto inoculadas destacadas, como não-destacadas, foram cortadas em fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup>.

As amostras de folhas inoculadas destinadas à microscopia eletrônica de transmissão foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a 4% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,3. Depois foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,05 M e pós-fixadas em solução contendo tetróxido de Ósmio a 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M. Na sequência, os fragmentos foram desidratados em

série cetônica ascendente (acetona 50% a acetona 100% super seca) e foram infiltradas pela substituição gradual da acetona pela resina LR-White no caso das folhas destacadas e para as folhas não-destacadas foi utilizado a resina epoxi (Epon 812®). Após a substituição com a resina pura, os fragmentos foram colocados em moldes e levados à estufa a 60 °C por 48 horas, para a polimerização e obtenção de blocos sólidos.

Os blocos foram cortados em duas espessuras, 1 µm e 90 nm usando-se ultramicrotomo (Reichert Ultracut S™) equipado com navalha de diamante. Os cortes de 1 µm foram corados com azul de toluidina a 1% (Klein et.al., 2004) e observados ao microscópio óptico (Nikon Eclipse 80i). Já os cortes de 90 nm foram dispostos em uma grade de cobre e contrastados com uma solução aquosa de acetato de uranila 5% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) para observação e captura de imagens em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1400 Plus).

Para a avaliação em microscopia óptica as folhas foram submetidas à descoloração foliar, processada de acordo com protocolo adaptado de Stadnik & Buchenauer (2000). Os fragmentos foram acondicionados imediatamente após a coleta, em placas de Petri tampadas, contendo 10 mL de etanol: ácido acético glacial [3:1(v/v)] para fixação e clareamento dos tecidos por, no mínimo, 24 horas ou até os fragmentos tornarem-se de aspecto leitoso. Decorrido esse tempo os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo uma solução de lactoglicerol 1:1:1 (v/v) (ácido láctico, glicerol e água) para conservação e montagem em lâminas para microscopia. As estruturas do fungo sobre os fragmentos foram coradas com azul de algodão em lactofenol e observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse i80). Os conídios presentes nas amostras foram avaliados quanto à germinação, formação de apressório e penetração.

#### **4.5 Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro amarelo**

Para verificar a sobrevivência do patógeno nas folhas inoculadas em casa de vegetação, realizaram-se coletas aos 16 e 30 dias após a inoculação (dai), visando o reisolamento do patógeno.

Para inoculação, 10 folhas do terço médio do ramo principal das plantas foram aspergidas com suspensão de 10<sup>5</sup> conídios/mL do Isolado II. Como controle,

outro conjunto de 10 folhas foram aspergidas com água. Aos 16 e 30 dias, amostras de ambos tratamentos foram submetidas ao isolamento em cultura-pura, pelo método indireto em meio BDA, segundo Alfenas *et al.* (2007). Avaliou-se durante 15 dias o aparecimento de colônias típicas do fungo, bem como de eventuais contaminantes, comparando-se as placas feitas a partir das amostras de folhas inoculadas com as não-inoculadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Folhas destacadas

As folhas que foram inoculadas e incubadas em câmara úmida, começaram a expressar os sintomas da antracnose a partir dos 15 dias após a inoculação (dai). Tanto as folhas sem sintomas, aos 15 e 21 dai, quanto aquelas com sintomas, aos 15 dai, foram processadas para análise microscópica.

Nas amostras de folhas sem sintomas, não foi observada colonização pelo patógeno, como presença de hifas no mesofilo. Na microscopia eletrônica de transmissão (MET), contudo, mesmo aos 15 dai, observou-se a presença de apressórios envoltos em mucilagem na superfície foliar (Figura 2A) e de bactérias associadas (Figura 2B). Essa mucilagem é, geralmente, responsável pela aderência e sobrevivência dos apressórios na superfície do hospedeiro (Bergstrom & Nicholson 1999). Diversos autores relatam a sua importância na germinação, sobrevivência e dispersão dos conídios, bem como na patogenicidade de *Colletotrichum* spp. (Bailey *et al.*, 1992; Bergstrom & Nicholson 1999; Bergstrom & Nicholson, 1981; Mendgen & Deising, 1993). Essa matriz mucilaginosa caracteriza-se por ser solúvel em água, possuir altos níveis de polissacarídeos e glicoproteínas como componentes principais e enzimas associadas, essenciais para a infecção nas plantas (Bailey *et al.*, 1992; Bergstrom & Nicholson 1999). Essa associação de fungos com bactérias pode ser benéfica para os dois microrganismos, no sentido

de que eles colaboram mutuamente na formação de biofilmes, o que aumenta a sobrevivência de ambos na superfície foliar.

Abaixo da parede celular, no vacúolo das células da epiderme, foi possível observar acúmulo de substâncias eletrodensas, possivelmente fitoalexinas ou outras substâncias produzidas pela planta em resposta a presença do patógeno (Figura 2). Marques et al. (2015) observaram na interação *C. acutatum* x *Citrus sinensis* grande quantidade de gotículas de lipídeos e plastídios em estroma eletrodense. Para os autores esse acúmulo de substâncias indica que as células epidérmicas respondem ao patógeno, resultando em alterações cuticulares que podem vir a limitar a infecção. No patossistema *C. gloeosporioides* x maracujazeiro, estudos aprofundados dessas respostas são ausentes.

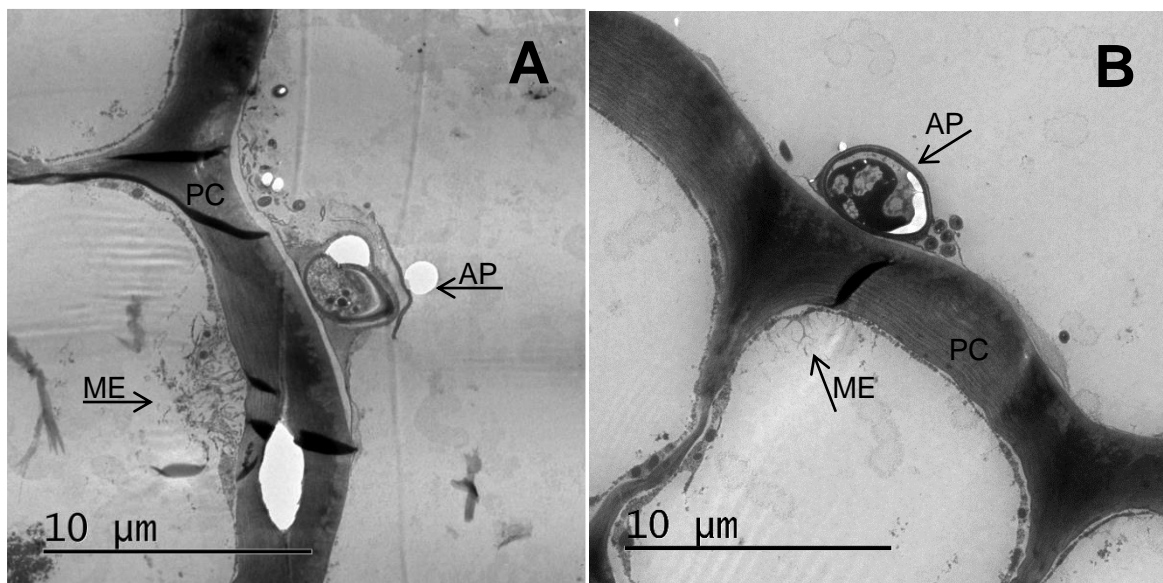


Figura 2: Fotomicrografias, em MET, de cortes transversais de folha de maracujazeiro inoculada com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* aos 15 dias após inoculação e na ausência de sintomas. (A) Apressório envolvido em mucilagem (seta) e, abaixo da parede celular epidérmica, acúmulo de material eletrodense (seta). (B) Apressório fixado na parede celular da epiderme (seta) com acúmulo de material eletrodense logo abaixo da parede celular (seta). AP: Apressório; ME: Material eletrodense; PC: Parede celular da epiderme.

Aos 21 dai, na maioria das amostras de folhas destacadas sem sintomas, não se observou presença de apressórios. Nas poucas amostras com apressórios, estes estavam presentes em baixíssima quantidade, não sendo possível a análise por MET. Alguns foram encontrados nos cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$ ) ao microscópio óptico (Figura 3). Porém, nas amostras de folhas inoculadas com o isolado II, não se observou peg de penetração ou cone apressorial, conforme relatado para *Colletotrichum* spp. em outros hospedeiros (Bentes *et al.*, 2002; Ranathunge *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2015).

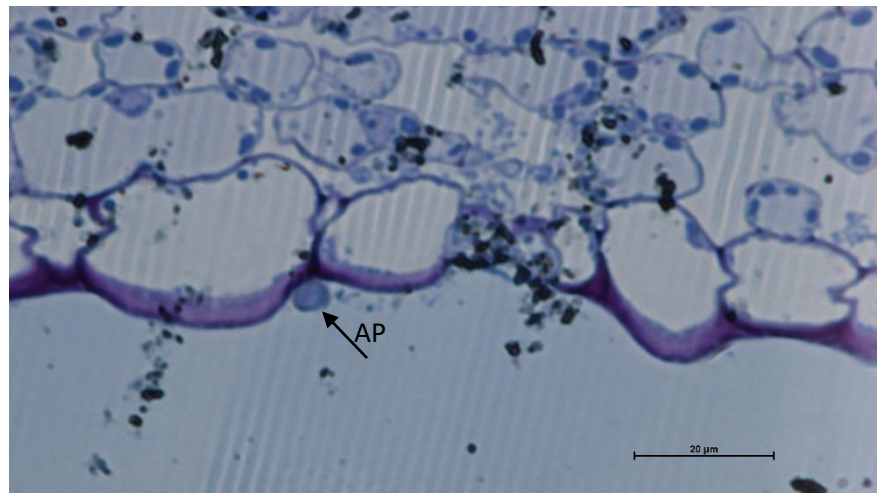


Figura 3: Fotomicrografia em microscópio óptico de corte de folha assintomática e destacada de maracujazeiro, inoculada com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, aos 21 dias de incubação após a inoculação, evidenciando presença de um apressório (AP).

Na avaliação de amostras de folhas que apresentaram sintomas, feita aos 15 dai, observou-se colonização extensiva pelo patógeno, com a presença de grande quantidade de hifas nos espaços intercelulares e entremeando a parede celular epidérmica (Figura 4B e 4C). No interior das células subjacentes do hospedeiro, observou-se espessamentos da parede celular (papilas), bem como acúmulo de substâncias eletrodensas e organelas, provavelmente envolvidas na secreção de substâncias de defesa, em resposta a presença do patógeno (Figura 4).



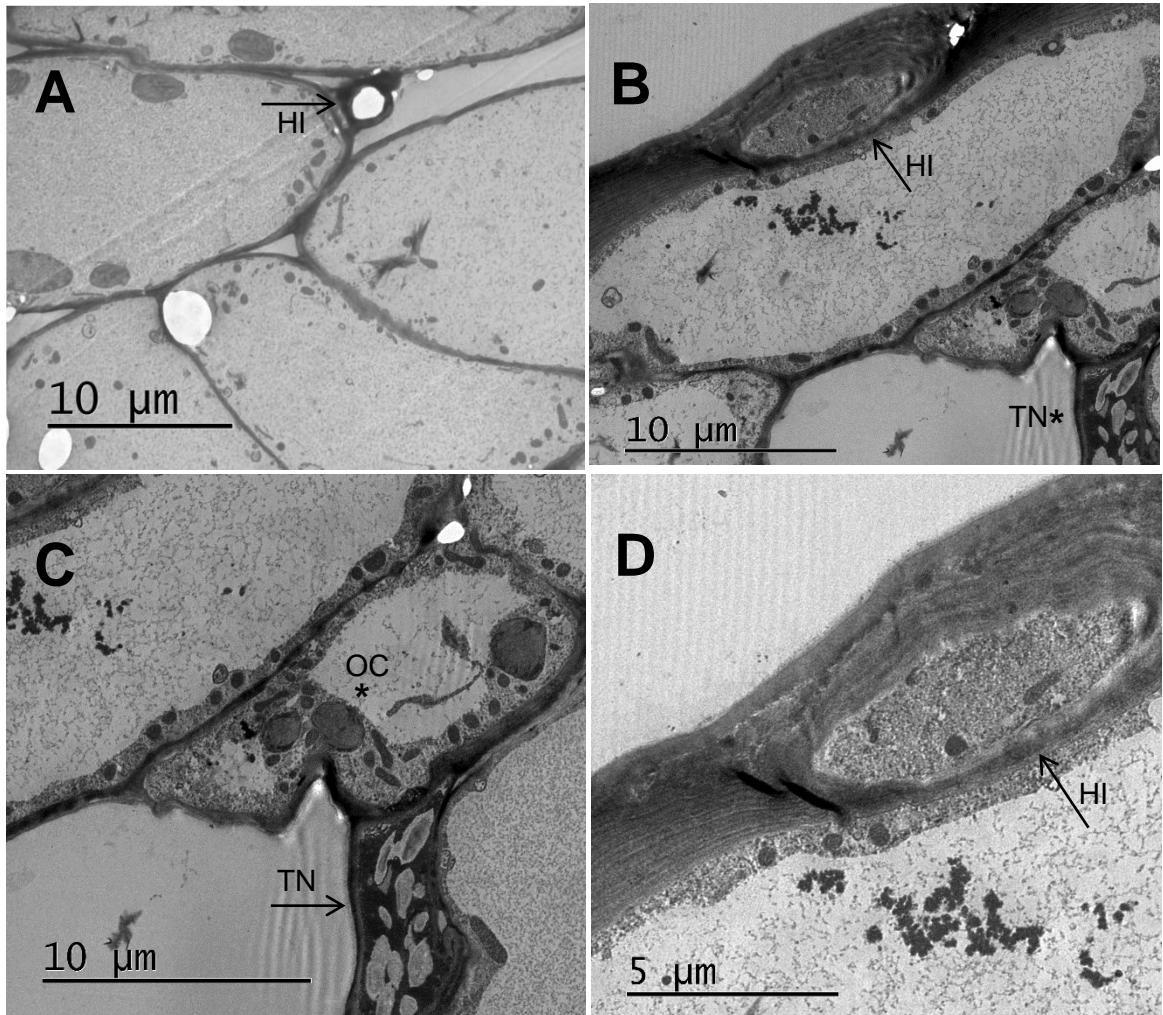


Figura 4: Fotomicrografias, ao MET, de cortes ultrafinos (90nm) de folhas de maracujazeiro-amarelo, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, aos 15 dias após a inoculação e com sintomas iniciais de antracnose. (A) Presença de hifa em espaço intercelular (seta); (B) Hifa entremeando a parede celular da epiderme abaxial (seta) e nos espaços intercelulares (TN\*). (C) Hifas no espaço intercelular do mesofilo da folha (seta) e célula adjacente com grande quantidade de organelas apresentando acúmulo de substância eletrodensa e organelas celulares (OC\*). (D) Detalhe da hifa em meio a parede celular da epiderme do hospedeiro (seta). Legenda: HI: Hifas de infecção; OC: Organelas celulares; TN: Tecido necrosado.

## 5.2 Folhas não destacadas

### 5.2.1 Microscopia Óptica de folhas diafanizadas

Os eventos de pré-penetração em folhas de maracujá, da germinação conidial até a diferenciação do apressório, foram similares ao que já foi descrito para *Colletotrichum* spp. noutros hospedeiros, como revisado por Bailey et al. (1992).

A aderência dos conídios, evento essencial para o sucesso da infecção (Mendgen & Deising, 1993; Mercure et al., 1994), para ambos isolados se deu em alta frequência sobre as junções celulares da epiderme e nas células do complexo estomático (Figura 5A e 5B), mostrando certa afinidade com a topologia da superfície foliar. O mesmo foi descrito por Ferreira et al. (2009) para *C. gloeosporioides* em folhas de *Coffea arabica* L.. A adesão conidial na superfície do hospedeiro influencia diretamente no processo germinativo e na infecção (Mercure et al., 1994). Possivelmente, este posicionamento dos conídios deve contribuir para uma rápida adesão, o que pode aumentar a chance de sucesso no estabelecimento do patógeno e no desenvolvimento da doença.

Às 3 hai, observou-se intumescimento e septação dos conídios em início de germinação para ambos isolados (Figura 5C), o que condiz com estudos precedentes de germinação conidial da espécie *C. gloeosporioides* (Mould et al., 1991; O'Connell et al., 1993; Lins et al., 2007; Ferreira et al., 2009).

O tempo da germinação para espécies de *Colletotrichum* é muito variável, indo de três até 96 hai (Nair & Corbin, 1981; Roberts & Snow, 1984; Bailey et al., 1992; Orozco, 2003). Segundo Orozco (2003), o tempo para início da germinação de conídios de *Colletotrichum* é dependente de fatores externos, especialmente da temperatura e a presença de materiais exógenos (Bailey et al., 1992; Skipp et al., 1995).

O Isolado II apresentou tubo germinativo visivelmente maior e de maior calibre com 3 hai, comparado ao isolado I, podendo-se observar um intumescimento no ápice do tubo germinativo, sendo a formação do pré-apressório (Figura 5C e 5D). Neste trabalho, assim como no de Pereira et al. (2009), a emissão do tubo germinativo ocorreu nas extremidades do conídio, havendo entretanto, alguns conídios que germinaram lateralmente (Figura 5E e 5F). Os conídios do

Isolado II não apresentaram padrão único de crescimento do tubo germinativo, apresentando comprimentos longos e curtos (Figura 5F). Pereira et al. (2009), na interação de *C. gloeosporioides* x cafeeiro, observaram que o crescimento do tubo germinativo foi variável antes da formação do apressório.

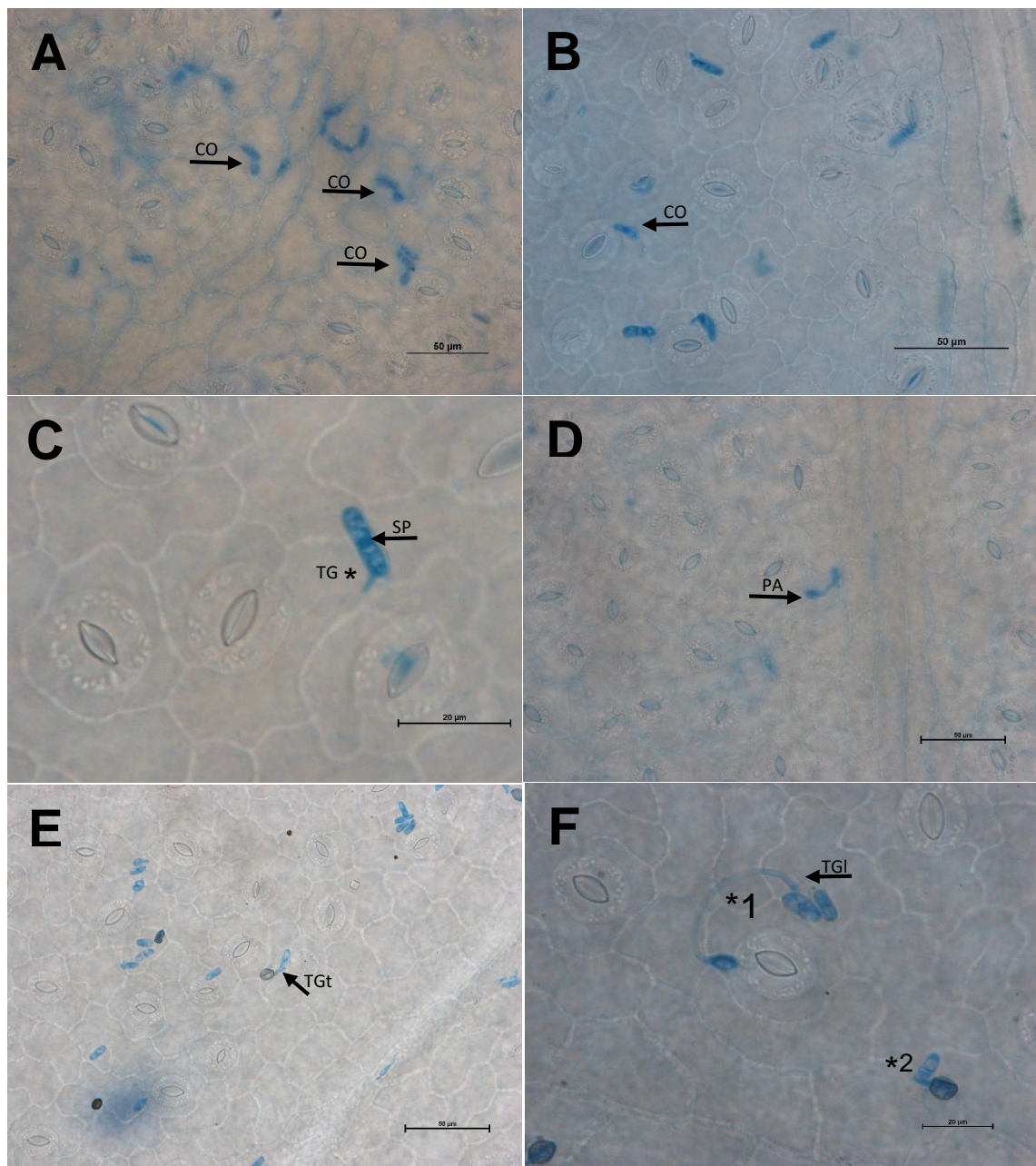


Figura 5 Fotomicrografias sob microscopia de luz de folhas descoloridas de maracujá amarelo, inoculadas com *C. gloeosporioides*. (A) Deposição dos conídios na junção das células epidérmicas e do complexo estomático - Isolado II, mostrando a germinação às 3 hai com pré-apressórios (PA). (B) Deposição dos conídios na junção das células epidérmicas e do complexo estomático - Isolado I, às 3 hai. (C) Conídios depositados na junção das células epidérmicas às 3 hai, mostrando a septação conidial e o início da formação do tubo germinativo. (D) Conídio germinando e formando pré-apressório a partir do tubo germinativo- Isolado II, às 3 hai. (E) Presença de tubo germinativo terminal em conídios às 6 hai. (F) Tubo germinativo lateral em conídios (Seta) às 6 hai, sendo alguns longos (\*1) e outros curtos (\*2) do mesmo Isolado II. Legenda: PA: Pré-apressório; TG: Tubo germinativo; SP: Septo; CO: Conídio; TGt: Tubo germinativo terminal; TGl: Tubo germinativo lateral.

O apressório, diferenciação morfológica do ápice de uma hifa, a partir do qual se origina uma hifa de penetração e têm como funções a adesão, penetração e sobrevivência do patógeno (Amorim, 1995), para ambos isolados, apresentaram-se de formato globoso a subgloboso, com contorno regular, conforme descrito para a espécie *C. gloeosporioides*. A sua formação no Isolado II teve início às 3 hai com um intumescimento do ápice do tubo germinativo, formando o pré-apressório (Figura 6A), porém a melanização do apressório, processo esse considerado um pré-requisito para a penetração e infecção na planta (Kubo & Furusawa 1991; Kubo 2005) somente foi observada às 6 hai (Figura 6B). Para o Isolado I a formação de apressórios foi mais demorada, mas às 6 hai eles já estavam formados, porém, ainda não completamente melanizados (Figura 6C). Para ambos isolados, os apressórios se originaram tanto do tubo germinativo, quanto diretamente dos conídios (Figura 6B e 6D).

Para ambos os isolados, os apressórios se diferenciaram principalmente sobre as junções das células epidérmicas, mas também foram observados alguns apressórios sobre as junções de células do complexo estomático (Figura 6F). O patógeno não depende de aberturas naturais, apresentando penetração direta. Além disso, acredita-se que o posicionamento/localização dos conídios influenciou este fato, que pode estar ligado à uma estratégia para atrasar a reação da planta, já que, nas junções o fungo permaneceria despercebido e incólume, restringindo-se aos espaços intercelulares, nas junções celulares, no início da patogênese.

A penetração do *Colletotrichum* pode ser evidenciada pela presença de um ponto interno claro, que corresponde ao poro do peg de penetração no interior do apressório (Diéguez-Uribeondo et al., 2003), o que foi observado a partir de 18 hai, para o Isolado I, e a partir de 24 hai, para o Isolado II (Figura 6E e 6F).

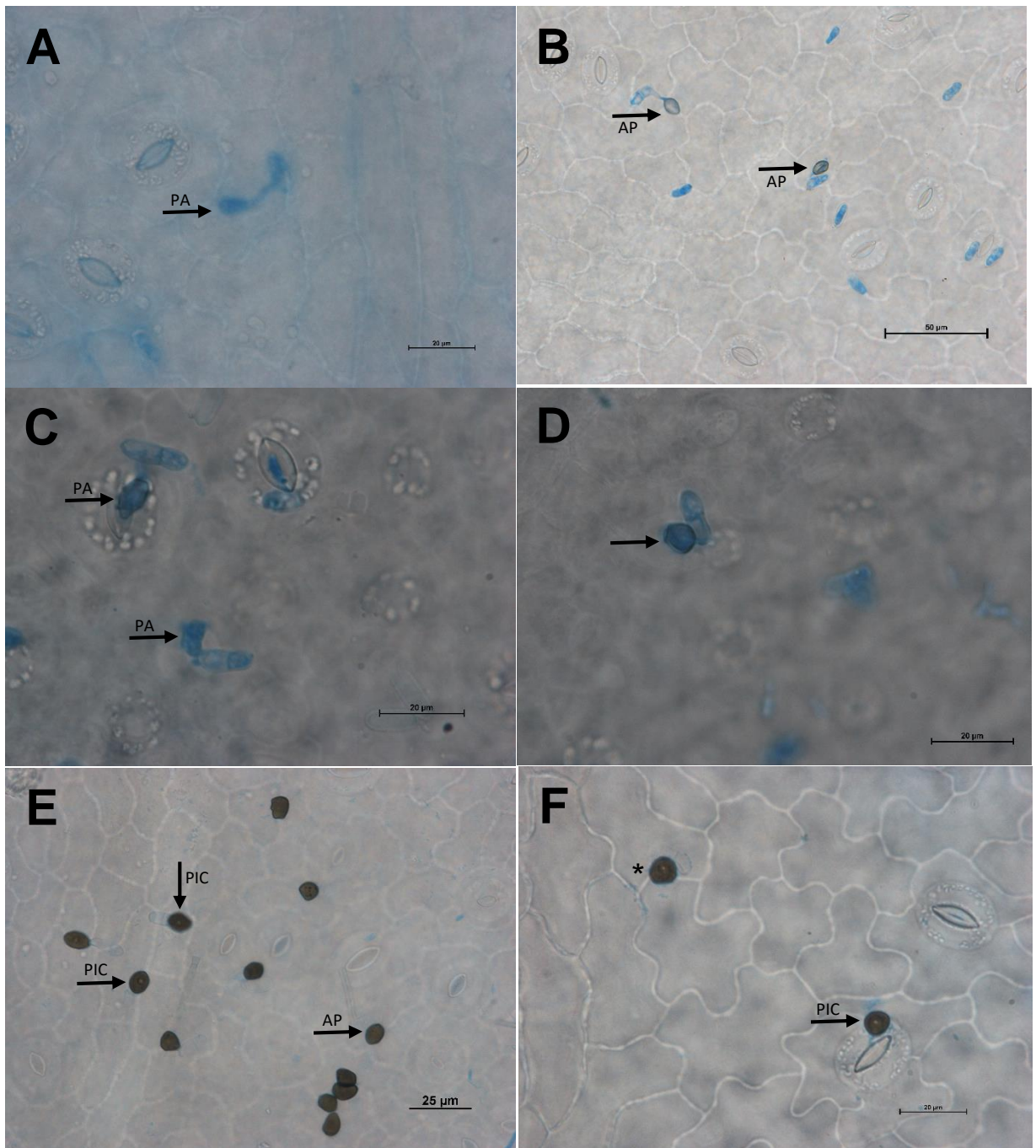


Figura 6: Fotomicrografias sob microscópio óptico de cortes de folhas descoloridas de maracujá inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Formação do pré-aperisório 3 hai - Isolado II do fungo; (B) Início da melanização dos aperiisórios do Isolado II 6 hai; e formação do aperiisório a partir do tubo germinativo; (C) Formação e início da melanização dos aperiisórios do Isolado I 6 hai; (D) Aperiisório formado direto do conídio 6 hai; (E) Aperiisórios completamente melanizados - Isolado I 18 hai, apresentando ponto interno claro e; (F) Aperiisórios localizados sobre a parede anticlinal de células da epiderme (\*) e do complexo estomático (Seta) - Isolado II 24 hai, com ponto interno claro, correspondentes ao “peg” de penetração. Legenda: PA: Pré-aperisório; AP: Aperiisório; PIC: Ponto interno claro.

A observação da diferença de tempos de penetração dos isolados deve ser levada em consideração já que o Isolado I, proveniente de ramos de maracujazeiro, pode ser mais adaptado à superfície foliar. Tais variações genéticas são comuns entre isolados e espécies de *Colletotrichum* (Perfect *et al.*, 1999). Estudos adicionais de patogênese associados a estudos moleculares poderão esclarecer as relações genéticas e divergentes entre isolados de *Colletotrichum* que colonizam diferentes órgãos da planta.

A penetração na cutícula ocorreu de forma direta e não via estômatos, tal qual descrito para *Colletotrichum* sp, na maioria dos patossistemas já estudados (Perfect *et al.*, 1999; O'Connell *et al.*, 2000). Por outro lado, *C. gloeosporioides* não penetra diretamente pela cutícula em folhas de amoreira (*Morus nigra*). O fungo utiliza as aberturas naturais dos estômatos como porta de entrada, onde a vesícula de infecção é formada (Kumar *et al.*, 2001), o que demonstra que os patótipos de *C. gloeosporioides* podem apresentar diferentes estratégias de penetração conforme a espécie hospedeira. Segundo Perfect *et al.* (1999), os eventos envolvidos na pré-penetração e penetração das espécies de *Colletotrichum* embora sejam análogos, são distintos entre as espécies quanto a sua cronologia, quanto aos mecanismos de adesão, tempo de melanização e de produção de cutinases, para penetração via cutícula da planta hospedeira.

Para ambos isolados, a germinação conidial, a formação e melanização dos apressórios e a emissão do peg de penetração nas folhas foram concluídos nas avaliações efetuadas até às 24 hai. Colonização dos espaços intracelulares por hifas, bem como a presença de vesículas de infecção, para ambos isolados, foram observados nas avaliações feitas até às 72 hai (Figura 7).



Figura 7: Cronologia do processo infeccioso inicial (pré e pós-penetração) de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro-amarelo.

### 5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Pelas análises dos cortes histológicos das amostras com 48 e 72 hai ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi possível evidenciar hifas do patógeno nos espaços intracelulares e abaixo da parede celular das células epidérmicas (Figura 8A e 8B).

Nos cortes analisados às 48 hai foi possível observar hifas de *C. gloeosporioides* colonizando as células da epiderme, abaixo da parede celular, iniciando a infecção. Nessas células, em posição adjacente as hifas, a presença de material eletrodense e de vesículas do complexo de Golgi próximo ao sítio de infecção foi observado, similarmente ao que se observou na microscopia ótica (Figura 8A). Segundo vários autores (Pecket & Small, 1980; Snyder & Nicholson, 1990), isto ocorre em alguns patossistemas em decorrência da síntese de antocianinas e outros compostos associados aos mecanismos de defesa da planta.

Às 72 hai, observou-se a formação de vesícula de infecção nas células da epiderme da folha, abaixo da parede celular, com invaginação da membrana plasmática (Figura 8C e 8D). Confirmou-se, assim, que o fungo apresenta um período de latência longo, apresentando uma relação endofítica como estratégia de sobrevivência nas folhas. Entretanto o mecanismo que desencadeia a patogênese é desconhecido, o qual pode ser acionado por alterações da planta, induzidas por estresse ambientais, alterações fenológicas e fisiológicas ou mesmo a senescência natural (Amorim, 1995)



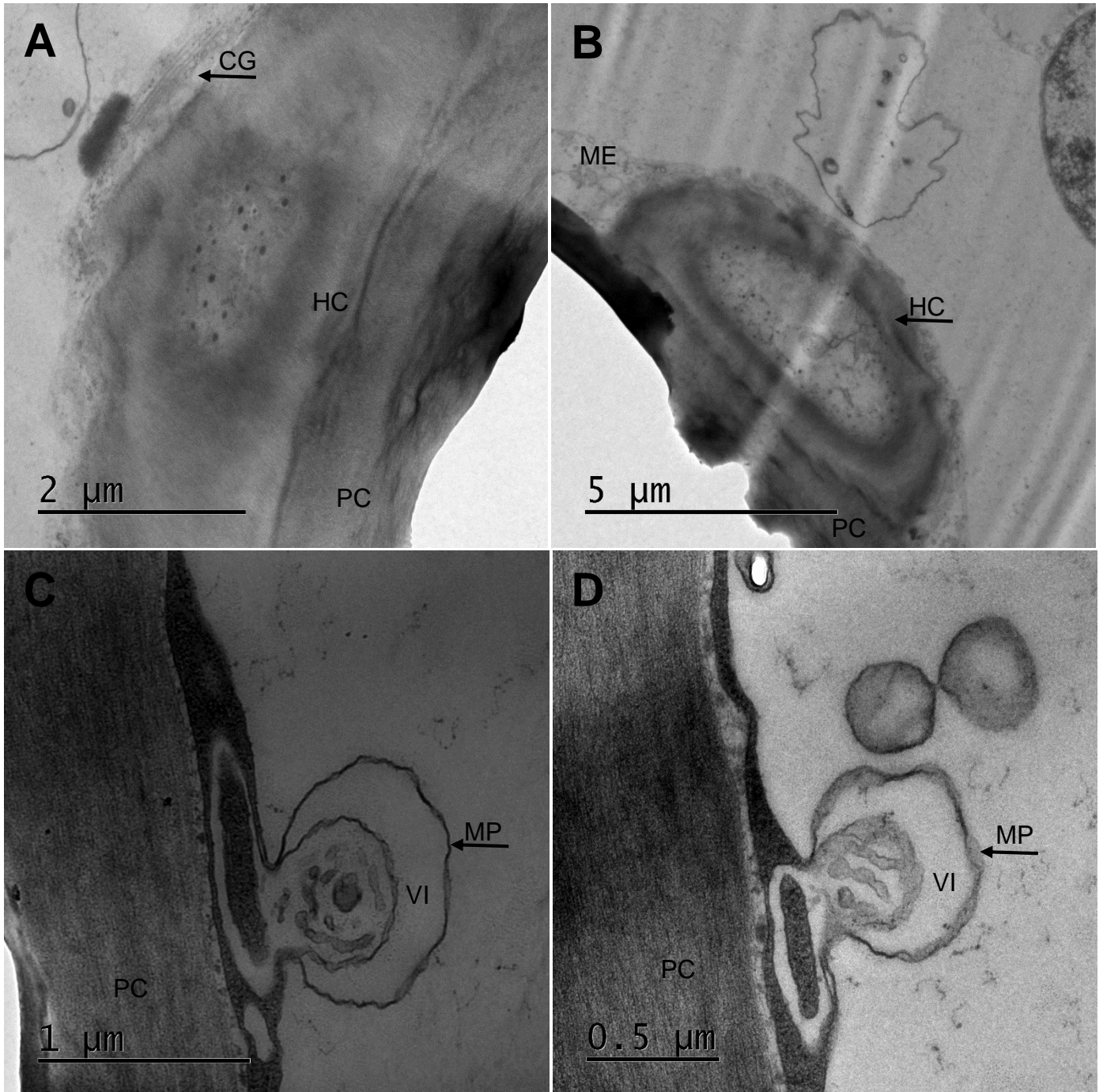


Figura 8: Fotomicrografias em MET de cortes de folhas de maracujazeiro 48 e 72 horas após a inoculação com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Grande quantidade de material eletrodense e organelas vegetais, como o complexo de Golgi (CG) em resposta à presença da hifa (HC) (B) Hifa (HC) logo abaixo da parede celular da epiderme rodeada de material eletrodense (ME). (C) e (D) vesícula de infecção do fungo invaginando a membrana citoplasmática da planta às 72 hai. Legendas: PC: Parede celular da epiderme; HC: Hifa de colonização; CG: Complexo de Golgi; ME: Material eletrodense; MP: Membrana plasmática da planta; VI: Vesícula de infecção.

### 5.3 Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro assintomáticas

Houve crescimento de colônias de *Colletotrichum* sp., em meio de cultura, em todas as amostras de folhas inoculadas, mesmo na ausência de sintomas de antracnose (Figura 9A e 9B). Das folhas não-inoculadas, não se obteve colônia de *Colletotrichum* em nenhuma das placas de isolamento (Figura 9C e 9D).

Até os 30 dias após inoculação, folhas aparentemente saudáveis e não senescentes, não apresentaram sintomas de antracnose. Ou seja, o fungo inoculado permaneceu vivo nas folhas inoculadas. Acredita-se, pelos resultados acumulados neste trabalho, que nessa fase da infecção e na ausência de sintomas, *C. gloeosporioides* apresenta, como estratégia de sobrevivência nas folhas de maracujazeiro, o endofitismo.

Espécies de *Colletotrichum* usam duas principais estratégias de colonização dos tecidos do hospedeiro para evitar respostas de defesa: colonização subcuticular intramural e colonização intracelular (Benhamou *et al.*, 1991; O'Connell & Bailey, 1991; Bailey *et al.*, 1992; Pring *et al.*, 1995; Latunde-Dada *et al.*, 1996; O'Connell *et al.*, 1996; O'Connell *et al.*, 2000; Mendgen & Hahn, 2002; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2005). Diéguez-Uribeondo *et al.* (2005) relataram ambas estratégias em *C. acutatum* colonizando amêndoas (*Prunus dulcis*) e Coates *et al.* (1993) em *C. gloeosporioides* colonizando abacate. Diferentes estratégias de infecção foram observadas em *C. acutatum* e *C. fragariae* em morangueiro (Curry *et al.*, 2002), *C. capsici* em caupi (*Vigna unguiculata*) (Pring *et al.*, 1995) e *C. gloeosporioides* em mamão (Chau & Alvarez, 1983), aonde as hifas de infecção cresceram por baixo da cutícula e no interior da parede anticlinal das células epidérmicas, apresentando colonização subcuticular intramural.

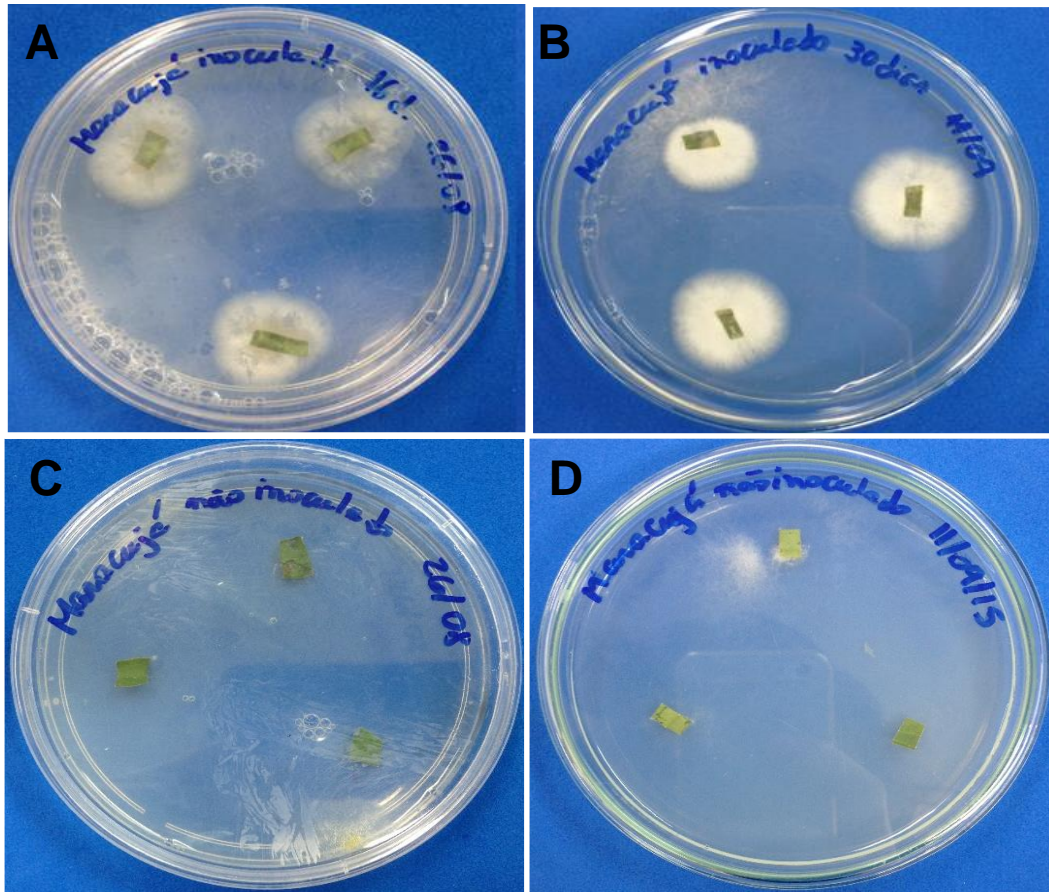


Figura 9: Placas de Petri com meio BDA contendo fragmentos de folhas de maracujazeiro-amarelo (A) Presença de colônias do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* a partir de folhas inoculadas e submetidas ao isolamento indireto 16 dai. e (B) 30 dai. (C) Folhas de maracujá não inoculadas com o fungo, submetidas ao isolamento indireto 16 dai (D) 30 dai ambas sem crescimento do fungo.

Pelos resultados levantados foi possível verificar que o fungo apresenta um período de latência longo, onde permanece em crescimento no interior do mesofilo do hospedeiro sem causar sintomas, numa estratégia de infecção endofítica, pois é notável o seu crescimento no interior das folhas, diferente do que acontece numa relação de quiescência exclusiva, onde o patógeno permanece apenas inativo, sem colonizar o interior do hospedeiro. Baseado nas várias definições do termo “endofítico”, *Colletotrichum sp.* pode ser enquadrado na definição proposta por Mostert et al. (2000) na qual diz que o patógeno pode ter uma parte do seu ciclo de vida como endófito, tendo o endofitismo como uma estratégia de infecção ou sobrevivência. Porém, fungos endófitos exclusivos são aqueles em que a colonização nunca resulta em sintomas visíveis da doença (Wilson, 1995).

Isolados de fungos podem alternar entre o endofitismo e a patogenicidade em uma escala de tempo relativamente curta. Alguns autores revelam que as duas formas de sobrevivência foram reportadas para várias espécies de *Colletotrichum* (Yu et al. 2011; Lin et al. 2011; Park et al. 2012; Loro et al. 2012), incluindo *C. gloeosporioides* (Promputtha et al. 2007; Than et al. 2008; Yan et al. 2011; Choi et al. 2012), *C. acutatum* (Than et al. 2008; Glenn & Bodri 2012), *Colletotrichum musae* (Photita et al. 2005; Promputtha et al. 2007) e *Glomerella cingulata* (Sette et al. 2006; Kwon et al. 2012). Delaye et al, (2013), analisaram a relação filogenética entre isolados endofíticos mutualistas e endofíticos-quiescente de *Colletotrichum* e concluíram que a mesma espécie ou isolado, pode alternar da fase endofítica para a necrotrófica, dependendo da fase em que se encontra no ciclo de infecção, de fatores internos, do hospedeiro e do patógeno, e de fatores exógenos.

Poucas espécies de *Colletotrichum*, como exemplo *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, atuam como endófitas mutualistas ou endófitas quiescentes (Prusky e Plumbley, 1992; Latundê-dada et al, 1999). As espécies endofíticas mutualísticas penetram as folhas do hospedeiro diretamente ou através de aberturas estomáticas e depois colonizam o mesofilo intercelularmente, sem nunca causar sintomas. As espécies endofíticas quiescentes têm uma fase de crescimento no interior do hospedeiro sem causar sintomas. Porém, iniciam a colonização necrotrófica dos tecidos, conforme o estado fisiológico do órgão infectado e das condições ambientais, causando a doença. Tais variações e a colonização endofítica representam um papel importante no ciclo de vida de espécies de *Colletotrichum*,

podendo ser a estratégia de sobrevivência usada por *C. gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro observadas neste estudo.

Segundo Arnold (2007, 2008) e Schulz & Boyle (2006) a colonização assintomática do hospedeiro pode ser entendida como um equilíbrio antagônico entre o hospedeiro e o endófito. Se este equilíbrio é alterado, o endófito se torna patogênico.

Do ponto de vista prático pôde-se observar que a antracnose do maracujazeiro não apresenta uma fase quiescente na folha e sim utiliza o endofitismo como estratégia de sobrevivência no hospedeiro. Isto passa a ser um complicador no manejo da doença em condições de campo, pois, pelo processo infeccioso e devido ao período latente variável, não se pode prever o melhor momento para aplicações preventivas de fungicidas, ao longo do período vegetativo da planta e na ausência de sintomas. Pulverizações constantes, por sua vez, são indesejáveis e onerosas. Ademais, pulverizações desnecessárias ocasionam a eliminação de inimigos naturais e de microrganismos benéficos, o que pode predispor as plantas à outras doenças, fúngicas ou não, além de exercer pressão de seleção direcionada à resistência do patógeno aos fungicidas. Pode-se pressupor, no entanto, que devido a dependência do patógeno em relação às chuvas e respingos de água, que havendo multiplicação do patógeno em órgãos senescentes da planta, a sua disseminação e infecção ocorra nas épocas chuvosas. Ou seja, o controle químico preventivo deve ser priorizado nestas épocas, mesmo na ausência de sintomas, antevendo epidemias de antracnose que normalmente, nesta cultura, se iniciam com o florescimento e a frutificação, se tornando poliéticas até o final do segundo ciclo ou ano produtivo (Buffon, 2010).

Fatores de ambiente, a produção intensa promovida pela polinização artificial, o desbalanço entre o volume da parte aérea e o volume radicular, a nutrição e a aplicação de fungicidas de amplo espectro podem predispor a planta à antracnose, numa fase em que o controle estaria fora do alcance, devido ao patógeno já estar amplamente disseminado e no interior das folhas. Novos estudos, em condições de campo, deverão ser conduzidos para se comprovar estas hipóteses e se determinar os fatores de predisposição do maracujazeiro à antracnose, induzida por formas endofíticas de *C. gloeosporioides*.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível analisar microscopicamente, tanto em condições de laboratório, como em casa de vegetação, a patogênese da antracnose do maracujazeiro em diferentes tempos, com e sem a presença de sintomas na folha.

Nas amostras de folhas destacadas com sintomas observou-se grande parte do tecido colonizado por hifas nos espaços intercelulares e deposição de organelas celulares e material eletrodense nas células, em posições justapostas as hifas do patógeno, mostrando que a planta reage ao ataque do patógeno.

Conídios de *C. gloeosporioides* dos dois isolados testados iniciaram a germinação sobre as folhas de maracujazeiro-amarelo em menos de 3 horas após a inoculação. Para o Isolado II a formação e a melanização dos apressórios foi 6 horas após a inoculação e para o Isolado I, a melanização foi observada mais tardiamente, depois de 6 horas após a inoculação.

A formação dos apressórios dos dois isolados, em sua maioria, ocorreu na junção de duas células da epiderme ou das células guarda dos estômatos, sendo a penetração direta pela cutícula.

A penetração foi evidenciada pela visualização do ponto interno claro do apressório 18 horas após a inoculação para o Isolado I e 24 horas após a inoculação para o Isolado II.

Na infecção de *C. gloeosporioides* em folhas de maracujazeiro-amarelo ocorre a formação de vesículas de infecção abaixo da parede celular da epiderme das folhas, confirmando o estabelecimento de uma fase inicialmente biotrófica.

O fungo permaneceu vivo nas folhas de maracujazeiro inoculadas e assintomáticas por pelo menos 30 dias após a inoculação, indicando um período de incubação muito longo (sem induzir sintomas). O fungo cresce no interior das folhas de maracujazeiro, utilizando o endofitismo como uma estratégia de sobrevivência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G.N. (1998). Plant pathology. Florida: Academic Pressol, 4, 817-820.
- Ainsworth GC (1971) Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 6º ed. Kew, England, Commonwealth Mycological Institute.
- Akhondzadeh, S.; Naghavi, H.R.; Vazirian, M.; Shayeganpour, A.; Rashidi, H.; Khani, M. (2001). Passion flower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 26, 363-367.
- Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. Métodos em Fitopatologia. Viçosa. Ed. UFV. 382p. 2007
- Amorim, L. Colonização e reprodução. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (1995). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1 (16): 309-324.
- Araújo, L. & Stadnik, M.J. (2011). Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tropical Plant Pathology* 36 (4) 241-248.
- Arauz, L.F. (2000). Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, Saint Paul, 84, 600-611.



- Arnold, A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev* 21: 51–66.
- Arnold, A.E. (2008). Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. In: Carson WP, Schnitzer SA (eds) *Tropical forest community ecology*. Wiley-Blackwell, West Sussex. 254–271.
- Bailey, J.A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) (1992). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, UK. CAB International. 88-120.
- Benhamou N, Lafitte C, Barthe J-P, Esquerré-Tugayé M-T (1991) Cell surface interactions between bean leaf cells and *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiol.* 97: 234-244.
- Bentes, J.L.S. & Matsuoka, K. (2002). Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 071-077.
- Bergstrom, G. C.; Nicholson R. L. (1999). The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease*, St. Paul. 83: (7) 596-608.
- Bergstrom, G. C.; Nicholson R. L. (1981). Invertase in the spore matrix of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology Zeitschrift*, Berlin. 102: (2) 139-147.
- Bernacci, L.C.; Meletti, L.M.M.; Soares-Scott, M.D. (2003). Maracujá doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25, 355-356.
- Boudreau, M.A. e Madden, L.V. (1995) Effect of strawberry density on dispersal of *Colletotrichum acutatum* by simulated rain. *Phytopathology*, 85, (9), 934-941.
- Buffon, R.B et al. (2010). Efeito de extratos de cravo da Índia e pimenta malagueta no controle “in vitro” do *Colletotrichum gloeosporioides* In: Encontro latino americano de iniciação científica, 14. Encontro latino americano de pós-graduação, 10. Vale do Paraíba. Universidade do Vale do Paraíba.

- Carlini, E.A.; Rodrigues, R.; Mendes, F.R.; Tabach, R.; Gianfratti, B. (2006). Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 690-695.
- Cavichioli, J.C.; Ruggiero, C.; Volpe, C.A. (2008). Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, (3), 649-656.
- Chau, K.F.; Alvarez, A.M. (1983). A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. *Phytopathology*, St Paul.73: 1113-1116.
- Choi, O.; Choi, O.; Kwak, Y-S.; Kim, J.; Kwon, J-H. (2012). Spot anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on tulip tree in Korea. *Mycobiology* 40: 82–84
- Choudhury, M. M. (2004). Perdas na cadeia de comercialização da manga, Embrapa Semi-Árido, Petrolina. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 86). 44 p.
- Coates, L.M.; Muirhead, I.F.; Irwin, J.A.; Gowanlock, D.H. (1993). Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. *Mycological Research*, Cambridge. 97: 1363-1370.
- Curry, K.J.; Abril, M.; Avant, J.B.; Smith, B.J. (2002). Strawberry anthracnose: histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology*, St Paul. 92: 1055-1063.
- Delaye, L.; García-Guzmán, G.; Heil, M. (2013) Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Divers* 60: 125–135
- Dhawan, K.; Dhawan, S.; Sharma, A.; (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:1-3.
- Dhawan, K.; Kumar, S.; Sharma, A. (2001). Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia*, 72, 922-926.
- Dhawan, K.; Sharma, A. (2003). Restoration of chronic- $\Delta^9$ -THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn. *British Journal of Pharmacology*, 138, 117-120.

- Diéguez-Uribeondo, J.; Förster, H.; Adaskaveg, J. E. (2003). Digital Image Analysis of Internal Light Spots of Appressoria of *Colletotrichum acutatum*. *Biochem. Cell Biol.* 93 (8): 923- 930.
- Dieguez-Uribeondo, J.; Forster, H.; Soto-Estrada, A.; Adaskaveg, J.E. (2005). Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology*, St Paul. 95: 751-758.
- Dutra, J. B. (2008). Controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) pós-colheita do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) por aplicações de fosfito, água quente e 1-metilciclopropeno. 151f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília.
- Espírito-Santo, A.P.; Lagazzo, A.; Souza, A.L.O.P.; Perego, P.; Converti, A.; Oliveira, M.N. (2013). Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Research International*, 50, 224-231.
- Farr, D.F.; Rossman A.Y. (2011). Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USTDA. Disponível em <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> Acesso em fevereiro de 2015.
- Ferreira, J.B.; Abreu, M.S.; Alves, E.; Pereira, I.S.; Fernandes, K.D. (2009). Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. *Summa Phytopathologica*, 35 (4) 273-281.
- Fischer, I.H., Arruda, M.C., Almeida, A.M., Garcia, M.J.M., Jeronimo, E.M., Pinotti R.N., Bertani, R.M. de A. (2007) Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29:254-259.
- Fischer, I.H., Kimati H., Rezende, J.A.M. (2005) Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 4ª Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2, 470p.

- Glenn, A.; Bodri, M.S. (2012). Fungal endophyte diversity in *Sarracenia*. PLoS One 7 (3): e32980.
- Hoagland, D., Arnon, D.I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: Califórnia Agricultural Experiment station. (Circular, 347).
- IBGE (2014). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal - Culturas perenes. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/> (Acesso em 2016).
- Jeffries, P.; Dodd, J.C.; Jeeger, M.J.; Pumbley, R.A. (1990). The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology, London, 39, (3), 343-366.
- Junqueira, N.T.V.; Anjos, J.R.N. dos; Sharma, R.D., Sanzonwicz, C., Andrade, L.R.M. de. (1999). Doenças do Maracujazeiro. In: Encontro De Fitopatologia, 3. 1999, Viçosa, MG. Doenças de fruteiras tropicais: palestras. Viçosa, UFV. 83-115.
- Junqueira, N.T.V., Anjos, J.R.N., Silva, A.P.O., Chaves, S.C., Gomes, A.C. (2003a) Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxico. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38:1005-1010.
- Junqueira, N.T.V., Sharma, R.D., Junqueira, K.P., Andrade, L.R.M. (2003b) Doenças constatadas na fase pós-colheira. In: Santos Filho, H.P., Junqueira, N.T.V. Eds.) Maracujá Fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 32-36.
- Klein, D.E.; Gomes, V.M. Silva-Neto, S.J.; Da Cunha, M. (2004). The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). Annals of Botany 94, 733-740.
- Kubo Y. (2005) Studies on mechanisms of appressorial penetration by *Colletotrichum lagenarium*. J Gen Plant Pathol 71:451–453.
- Kubo Y, Furusawa I. (1991) Melanin biosynthesis: prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In:

- Cole GTC, Hoch HC. (eds) The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. New York, NY, USA. Plenum Press. 205–218.
- Kumar, V.; Gupta, V.P.; Babu, A.M.; Mishra, R.K.; Thiagarajan, V.; Atta, R.K. (2001). Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. *Journal of Phytopathology*, Berlin.149: 629-633.
- Kwon, J-H.; Kang, D-W.; Kwak, Y-S.; Kim, J. (2012). An outbreak of leaf spot caused by *Corynespora cassiicola* on Korean raspberry in Korea. *Plant Dis* 96: 762.
- Latundê-Dada, A. O.; O'Connell, R. J.; Nash, C.; Lucas, J. A. (1999) Stomatal penetration of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves by a *Colletotrichum* species causing latent anthracnose. *Plant Pathol.* 48:777-785.
- Latundê-Dada, A. O.; O'Connell, R. J.; Nash, C.; Pring, R. J.; Lucas, J. A.; Bailey, J. A. (1996) Infection process and identity of the hemibiophic anthracnose fungus (*Colletotrichum destructivum*) from cowpea (*Vigna unguiculata*). *Mycol. Res* 100: 1133-1141.
- Liberato J. R., Barreto R. W., Shivas, R. G. (2005). Leaf-clearing and staining techniques for the observation of conidiophores in the *Phyllactinioideae* (Erysiphaceae). *Australasian Plant Pathology*, 34, 401-404.
- Lima, V.P.M.S. (1973). *Cultura do maracujazeiro*. Fortaleza, CE: SAAB, ANCRA-CE, 59p.
- Lima Filho, R. M.; Oliveira, S. M. A.; Menezes, M. (2003). Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília. 28 (6) 620-625.
- Lin, S-H.; Huang, S-L.; Li, Q-Q.; Hu, C-J.; Fu, G.; Qin, L.P.; Ma, Y-F.; Xie, L.; Cen, Z-L.; Yan, W-H. (2011). Characterization of *Exserohilum rostratum*, a new causal agent of banana leaf spot disease in China. *Australas Plant Pathol* 40: 246–259
- Lins, S. R. O.; Abreu, M. S.; Alves, E. (2007). Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 32 (6): 488-496.

- Loro, M.; Valero-Jiménez, CA.; Nozawa, S.; Márquez, LM. (2012). Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *J Arid Environ* 85: 46–55
- Madden, L.V., Yang, X., WILSON, L.L. (1996) Effects of rain intensity on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 86, (8), 864-874.
- Malerbo-Souza, D.T.; Nogueira-Couto, R.H.; Toledo, V.A.A. (2002). Insetos associados às flores de diferentes espécies de maracujá (*Passiflora* spp.). *Acta Scientiarum*, 24, 1269-1274.
- Marques, J.P.R.; Amorim, L.; Spósito, M.B.; Appezzato-da-Glória, B. (2015). Ultrastructural changes in the epidermis of petals of the sweet orange infected by *Colletotrichum acutatum*. *Protoplasma*. 1-10.
- Martins, M. V. V., Silveira, S. F., Carvalho, A. C., Souza, E. F. de. (2003). Erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsi* em substratos tratados em coletores solares, em Campos dos Goytacazes-RJ. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP 25, (3), 421-424.
- Medeiros, A.M. e Peruch, L.A.M. (2012). Fungicidas e argila silicatada no controle da antracnose do maracujá amarelo. *Semina: Ciências Agrárias*, 33 (5):1803–1808.
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal. 33: 83-91.
- Mendgen, K.; Deising, H. (1993). Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*, Cambridge. 124 (2): 193-213.
- Mendgen K, Hahn M (2002) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci*. 7:352-356.
- Menezes, M. (2002). Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, DF. 27: 23-27.
- Mercure, E.W.; Kunoh, H.; Nicholson, R.L. (1994). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. London. 45 (6) 407-720.

- Moraes, S.R.G.; Escanferla, M.E.; Massola Jr, N.S. (2015). Pre penetration and Penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* into Guava Fruit (*Psidium guajava* L.): Effects of Temperature, Wetness Period and Fruit Age. *Journal of Phytopathology*. 163: 149–159.
- Mostert, L.; Crous, P.W. Petrini, O. (2000). Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52: 46–58
- Mould, M.J.R.; Boland, G.J.; Robb, J. (1991). Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolli* *Medicago sativa* pathosystem. 1. Pre-penetration events. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London. 38. 179-194.
- Moura, G.S., Schwan-Estrada, K.R.F., Alves, A.P.F., Franzener, G., Stangarlin, J.R. (2012). Controle da antracnose em maracujá-amarelo por derivados de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo. 79 (3):371-379.
- Nair, J.; Corbin, J.B. (1981). Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *Pinea*. *Phytopathology*. St. Paul. 71 (8) 777-783.
- Nascimento, A.V.S., Souza, A.R.R., Alfenas, P.S., Andrade, G.P., Carvalho, M.G., Pio-Ribeiro, G., Zerbini, F.M. (2004) Análise filogenética de potyvirus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29 (4):378-383.
- Ntahimpera, N., Wilson, L.L., Ellis, M.A., Madden, L.V. (1999) Comparison of rain effects on splash dispersal of three *Colletotrichum* species infecting strawberry. *Phytopathology*, 89, (7), 555-563.
- O’Connell R.J.; Bailey JA (1991) Hemibiotrophy in *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Mendgen K, Lesemann D-E (eds), *Electron Microscopy of Plant Pathogens*, p.211-222. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- O’Connell, R.J.; Bailey, J.A.; Richmon, D.V. (1985). Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum* *Physiological Plant Pathology*. 27: 75-98.

- O'Connell, R.J.; Pain, N.A.; Bailey, J.A.; Mendgen, K.; Green, J.R. (1996) Use of monoclonal antibodies to study differentiation of *Colletotrichum* infection structures. In: Nicole, M., Gianinazzi-Pearson, V. (eds), *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganisms Interactions*, pp.79-97. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- O'Connell RJ, Perfect S, Hughes B, Carzaniga R, Bailey J, Green J (2000) Dissecting the cell Biology of *Colletotrichum* Infection Processes. In: Prusky D, Freeman S, Dickman MB (eds), *Colletotrichum*. Host specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. p. 57-77.
- O'Connell, R.J.; Uronu, A.B.; Waksman, G.; Nash, C.; Keon, J.P.R.; Bailey, J.A. (1993). Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology*, London. 42: 774-783.
- Orozco Miranda, E.F. (2003). Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae*. 147f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG
- Park, Y-H.; Lee, S-G.; Ahn, D.J.; Kwon, T.R.; Sang, U.N.; Park, S.U.; Lim, H-S.; Bae, H. (2012). Diversity of fungal endophytes in various tissues of *Panax ginseng* Meyer cultivated in Korea. *J Ginseng Res* 36: 211–217.
- Pecket C.R, Small C.J. (1980). Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry*.19:2571–2576.
- Peixoto, M. (2005). Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: *Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético*. EMBRAPA Cerrados, 647p.
- Pereira, A. L. G. (1969). Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis*, Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n. sp. *Arquivos do Instituto Biológico*. 36 (4): 163-174.
- Pereira, W. V. (2009). Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo.



- Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Pereira, I.S.; Abreu, M.S. de; Alves, E.; Ferreira, J.B. (2009). Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – Cafeeiro. *Bragantia*. Campinas. 68 (1): 117-123.
- Perfect, S. E.; Hughes, H. B.; O'Connell, R. J.; Gren, J. R. (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, San Diego. 27 (2/3): 186-198.
- Peruch, L.A.M. (1998). Controle integrado da antracnose no maracujá amarelo. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Photita, W.; Taylor, P.W.J.; Ford, R.; Hyde, K.D.; Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Divers* 18: 117–133.
- Photita, W. et al. (2004). Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity*, 16, 131-140.
- Phoulivong, S. Cai, L.; Chen, H.; Mckenzie E.H.C.; Abdelsalam, K.; Chukeatirote, E.; Hyde, K.D.. (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, Indonesia, 44, (1), 33-43.
- Pring, R.J.; Nash, C.; Zakaria, M.; Bailey, J.A. (1995). Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London. 46: 137-152.
- Prompttha, I.; Lumyong, S.; Dhanasekaran, V.; (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecol* 53: 579–590.
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 34, 413-434.
- Prusky D, Plumbley RA (1992) Quiescent infections of *Colletotrichum* in Tropical and subtropical fruits. In: Bailey JA, Jeger MJ (eds), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK: CAB International. p. 289-307.

- Queiroz, M.S.R.; Janerbo, D.I.; Cunha, M.A.L.; Medeiros, J.S.; Sabaa-Srur, A.U.; Diniz, M.F.F.; Santos, S.C. (2012). Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Journal*, 11, 89-96.
- Ranathunge, N. P.; Mongkolporn, O.; Ford, R.; Taylor, P. W. J. (2012). *Colletotrichum truncatum* Pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. *Australasian Plant Pathol.* 41: 463–473.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal Cell Biology*, 17, 208-212.
- Roberts, R.G.; Snow, J.P. (1984). Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. *Phytopathology*. St. Paul. 74 (4) 390-397.
- Rocha, D. (2004). Produtor de maracujá. 2. Ed. Fortaleza: Ministério da Ciência e Tecnologia, 48p.
- Ruggiero C. (1987). Cultura do maracujazeiro. Ribeirão Preto: Legis Summa.
- Ruggiero, C. (1998) Maracujá: do plantio à colheita. In: Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Maracujazeiro, 5, Jaboticabal, 388p.
- Ruggiero, C., São Jose, A.R., Volpe, C. A., Oliveira, J.C., Durigan, J.F., Baumgartner, J.G., Silva, J.R., Nakamura, K., Ferreira, M.E., Kavati, R.; Pereira, V.P. (1996). Maracujá para exportação: Aspecto técnico da produção. Brasília: FRUPEX/EMBRAPA-SPI. 64p.
- Santos Filho, H.P., Santos, C.C.F. (2003) Doenças causadas por fungos. In: Santos Filho, H. P.; Junqueira, N. T. V., Frutas do Brasil: maracujá – fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 12-21.
- Schulz, B.; Boyle, C. (2006). What are endophytes? In: Schulz, B.; Boyle, C. Sieber TN (eds) *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin. 1–13.
- Sette, L.D.; Passarini, M.R.Z.; Delarmelina, C.; Salati, F.; Duarte, M.C.T. (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J Microbiol Biotechnol* 22: 1185–1195.

- Silva, M.C., Nicole, M., Rijo, L., Geiger, J.P., Rodrigues Jr, C.J. (1999) Cytochemical Aspects of the Plant–Rust Fungus Interface during the Compatible Interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra) – *Hemileia vastatrix* (race III). *International Journal of Plant Sciences*. 160, (1), 79-91.
- Silva, K.S., Rebouças, T.N., Lemos, O.L., Bomfim, M.P., Bomfim, A.A., Esquivel, G.L., Barreto, A.P.P., São José, A.R., Dias, N.O., Tavares, G.M. (2006). Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) em diferentes espécies frutíferas. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal. SP. 28 (1):131-133.
- Skipp, R.A.; Beever, R.E.; Sharrock, K.R.; Rikkerink, E.H.A.; Templeton, M. D. (1995). *Colletotrichum*. In: Kohmoto, K.; Singh, U. S.; Singh, R. P. (Ed.). *Pathogenesis and host specificity in plant diseases*. Oxford: Pergamon/Elsevier Science. 2: 119-142.
- Snyder, B.A., Nicholson, R.L. (1990). Synthesis of phytoalexins in *sorghum* as a site specific response to fungal ingress. *Science*. 248, 1637-1639.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H.; (2008). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II*. 2ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 704p.
- Spoladore, S.F.; Bissaro, C.A.; Vieira, T.F.; Silva, M.V.; Haminiuk, C.W.I.; Demczuk Jr, B. (2014). Modelagem Matemática da Secagem de Casca de Maracujá e Influência da Temperatura na Cor, Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*. 5, (2), 17-25.
- Stadnik M.J., Buchenauer H (2000) Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:25-34.
- Sutton B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph. In: Bailey JA & Jeger MJ (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England, CAB International Wallingford. 388p.
- Than, P.P.; Jeewon, R.; Hyde, K.D.; Pongsupasamit, S.; Mongkolporn, O.; Taylor, P.W.J. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species

- associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathol* 57: 562–572.
- Torres Filho, J. (1983). Doenças do Maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), no planalto de Ibaiapaba, Ceará. In: Bruckner, C.H.; Picanço, M.C. (Eds) (2001). Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre. RS. 9. 243 - 276.
- Ureña-Padilla, A.R.; Mitchell, D.J.; Legard, D.E. (2001) Overwinter survival of inoculum for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue. *Plant Disease*, 85, (7), 750-754.
- Waculicz-Andrade, C.E. (2009). Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e da vegetação espontânea. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Wilson, D. (1995) Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274–276.
- Wilson, L.L., Madden, L.V.; Ellis, M.A. (1990). Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 80, 111-116.
- Yan, J.; Wu, P.S.; Du, H.Z.; Zhang, Q.E. (2011). First report of black spot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on paper Mulberry in China. *Plant Dis* 95: 880.
- Yu, X.; Zhang, W.M.; Zhao B.T.; Shi, X.P.; Gu, G.P.; Sun, L.J. (2011). First report of *Alternaria alternata* causing blight disease of *Euphorbia lathyris* in China. *J Plant Pathol*. 93: S4.63–S4.89.
- Zeraik, M.L.; Pereira, C.A.M.; Zuin, V.G.; Yariwake, J.H. (2010). Maracujá: um alimento funcional? *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20, 459-471.