

**NICOLETTA STEFÂNIA DIAS DA SILVA FLÁVIO**

**CARACTERIZAÇÃO, PATOGENICIDADE E AÇÃO DO  
CITRAL E DO MIRCENO SOBRE *Colletotrichum*  
*gloeosporioides***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Ernane Ronie Martins.

Montes Claros

2013

F589c  
2013

Flávio, Nicoletta Stefânia Dias da Silva.

Caracterização, patogenicidade e ação do Citral e do Mirceno sobre *Colletotrichum gloeosporioides* / Nicoletta Stefânia Dias da Silva Flávio. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2013.

63 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Prof. Ernane Ronie Martins.

Banca examinadora: Sérgio Avelino Mota Nobre, Fernando da Silva Rocha, Nilza de Lima Pereira Sales, Ernane Ronie Martins.

Inclui bibliografia: f. 57-63.

1. Antracnose - Maracujá. 2. Doença plantas - Pós-colheita. 3. Tratamento de frutos. I. Martins, Ernane Ronie. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 632

NICOLETTA STEFÂNIA DIAS DA SILVA FLÁVIO

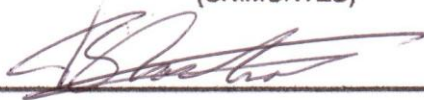
CARACTERIZAÇÃO, PATOGENICIDADE E AÇÃO DO CITRAL E DO  
MIRCENO SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides*



---

Prof. Sérgio Avelino Mota Nobre

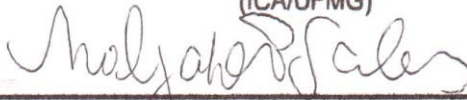
(UNIMONTES)



---

Prof. Fernando da Silva Rocha

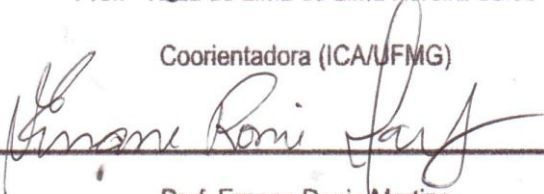
(ICA/UFMG)



---

Prof.ª Níza de Lima de Lima Pereira Sales

Coorientadora (ICA/UFMG)



---

Prof. Ernane Ronie Martins

Orientador (ICA/UFMG)

Aprovada em 21 de dezembro de 2012.

Montes Claros

2013

## Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, especialmente à minha avó, que não pôde acompanhar até o fim esta caminhada. Sei que, de onde ela está, estará sempre olhando por mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais por oferecer o Curso de Mestrado.

A Capes pelo oferecimento da Bolsa de estudos.

À minha família.

Ao Lucas o amparo.

À Professora Nilza de Lima a confiança e a orientação.

Ao Professor Ernane a disponibilidade e a orientação.

Aos colegas de Mestrado o companheirismo.

Aos colegas e amigos: Hugo Catão, César Aquino e Izabel Cristina, que sempre se dispuseram a ajudar.

Aos Professores Eduardo Robson, Christian Cabacinha e Fernando Rocha as ideias compartilhadas e o direcionamento durante a condução desta pesquisa.

Ao Professor Sérgio Avelino a colaboração.

Ao Cléber, da Universidade Federal de Viçosa, por ter cedido isolados da micoteca.

Aos colegas da graduação a companhia e a presteza.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **CAPÍTULO 2 - ESTUDO AUTOECOLÓGICO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* DO MARACUJAZEIRO**

GRÁFICO 1-	Halo de degradação da celulose (mm) produzido <i>in vitro</i> pelo isolado C95 a cada 24 horas. Análise de Regressão Quadrática ( $\alpha=0,05$ ).....	37
QUADRO 1 -	Procedência dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> .....	23
QUADRO 2 -	Coloração predominante na colônia para cada isolado de <i>C. gloeosporioides</i> nos meios de cultura, batata dextrose ágar (BDA) e aveia ágar (AVA).....	32
QUADRO 3 -	Tamanho médio ( $\mu\text{m}$ ) e forma dos conídios de cada isolado de <i>C. gloeosporioides</i> .....	34

### **CAPÍTULO 3- ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL E DO MIRCENO SOBRE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides***

GRÁFICO 1 -	Tamanho final da lesão (mm) nas cascas dos frutos de maracujá provocadas pelo isolado ISO2 e tratadas com o composto químico Mirceno .....	54
-------------	--	----

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2- ESTUDO AUTOECOLÓGICO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* MARACUJAZEIRO**

- 1- Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *C. gloeosporioides*, em função dos meios de cultura batata dextrose ágar (BDA) e aveia ágar (AVA)..... 27
- 2- Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *C. gloeosporioides*, em função das temperaturas 25 e 30°C..... 29
- 3- Densidade de esporos (esporos/mm<sup>2</sup>) dos isolados de *C. gloeosporioides*..... 31
- 4- Índice de velocidade de crescimento da lesão (IVCL) dos isolados de *C. gloeosporioides* (mm/dia), períodos de incubação e latência (dias)..... 35

### **CAPÍTULO 3- ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL E DO MIRCENO SOBRE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides***

- 1- Tratamentos utilizados e respectivas concentrações avaliadas..... 44
- 2- Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) do isolado C95 de *C. gloeosporioides*, em função dos compostos Citral, Mirceno e Citral em conjunto com Mirceno nas condições avaliadas..... 47
- 3- Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) do isolado C95 de *C. gloeosporioides*, em função das concentrações dos tratamentos..... 48
- 4- Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) do isolado ISO2 de *C. gloeosporioides*, em função das concentrações e dos compostos citral, mirceno e citral em conjunto com mirceno..... 50
- 5- Densidade de esporos (esporos/mm<sup>2</sup>) do isolado C95 de *C. gloeosporioides* submetido aos compostos Citral, Mirceno e Citral combinado com Mirceno..... 51

- 6 - Densidade de esporos (esporos/mm<sup>2</sup>) do isolado C95 de *C. gloeosporioides* submetido às diferentes concentrações dos tratamentos..... 52
- 7 - Tamanho final da lesão (mm) nas cascas dos frutos de maracujá provocadas pelo isolado ISO2, tratadas com o composto químico Mirceno e com o fungicida Folicur na dosagem recomendada..... 53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AVA** - meio de cultura aveia ágar.
- BDA** - meio de cultura batata dextrose ágar.
- BOD** - estufa incubadora.
- cm** - centímetro (unidade).
- CMC** - celulose microcristalina.
- D** - diâmetro atual.
- Da** - diâmetro do dia anterior.
- DIC** - delineamento inteiramente casualizado.
- EC** - concentrado emulsionável.
- ha** - hectare (unidade).
- IBGE** - Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- IVCM** - índice de velocidade de crescimento micelial.
- m** - metro (unidade).
- M** - molar (unidade).
- mL** - mililitro (unidade).
- mm** - milímetro (unidade).
- µL** - microlitro (unidade).
- µm** - micrômetro (unidade).
- N** - número de dias da repicagem.
- NaCl** - cloreto de sódio.
- PCR** - reação da polimerase em cadeia.
- ppm** - parte por milhão (unidade).
- pv** - patovar.
- sp** - uma espécie.
- t** - tonelada (unidade).
- UFMG** - Universidade Federal de Minas Gerais.
- v/v** - volume por volume (unidade).

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1 Principais doenças do maracujazeiro.....	12
2.2 Influência da antracnose na qualidade de frutos .....	14
2.3. Produtos vegetais no controle de fungos.....	14
2.3.1 <i>Cymbopogon citratus</i> .....	15
2.4 Tratamento de frutos.....	17
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2 - ESTUDO AUTOECOLÓGICO DE ISOLADOS DE</b> <b><i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DO</b> <b>MARACUJAZEIRO .....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>20</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 Obtenção e manutenção dos isolados.....	23
2.2 Caracterização cultural dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> .....	23
2.3 Caracterização patogênica.....	25
2.4 Produção de celulase.....	26
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
3.1 Caracterização cultural dos isolados de <i>C. gloeosporioides</i> .....	27
3.2 Caracterização patogênica.....	34
3.3 Produção de celulase.....	36
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>

<b>CAPÍTULO 3- ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL E DO MIRCENO SOBRE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i></b> .....	39
<b>RESUMO</b> .....	39
<b>ABSTRACT</b> .....	40
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	41
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
2.1 Avaliação antifúngica in vitro dos compostos Citral e Mirceno.....	43
2.2 Avaliação em tecido vegetal.....	45
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
3.1 Avaliação antifúngica in vitro dos compostos Citral e Mirceno.....	47
3.2 Avaliação em tecido vegetal.....	52
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57

## CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, sendo que 95% da produção são compostas pelo maracujá amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. No Brasil, o cultivo do maracujazeiro ocorre em todas as regiões, devido à grande adaptação e às condições edafoclimáticas (PIRES *et al.*, 2008). O nordeste brasileiro é a região de maior produção, em torno de 530 mil toneladas (t) em 37 mil hectares (ha), seguido pelo Sudeste, com 110 mil t em 6 mil ha. Em Minas Gerais, as regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba se destacam, seguidas pela região Norte, produzindo 4,9 mil t em 338 ha. Na região Norte de Minas Gerais, destaca-se o município de Janaúba, como polo da fruticultura irrigada de acordo com dados da safra 2009 (IBGE, 2010).

Os problemas fitossanitários são limitantes à produção e à qualidade dos frutos. Dentre as doenças do maracujazeiro, a antracnose, incitada por *Colletotrichum gloeosporioides*, é a de maior ocorrência, comum em todas as regiões brasileiras, causando prejuízos inclusive na pós-colheita (CHITARRA; CHITARRA, 2005, PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Para o controle dessa doença, os fungicidas são os recursos mais utilizados, mas, em contrapartida, visando a um manejo mais ecológico e de pós-colheita, o controle alternativo utilizando metabólitos secundários de plantas, tem sido uma opção promissora. Em trabalhos já realizados no Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG desde 2006, Silva *et al.* (2009), o óleo de *Cymbopogon citratus* se mostrou eficiente no controle da antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, mas se faz necessário comprovar qual o composto químico presente no óleo dessa planta possui efeito antifúngico.

Dessa forma, objetivou-se, com esta pesquisa avaliar dois compostos presentes no óleo essencial de *C. citratus*, em ação antifúngica ao *C. gloeosporioides*, no controle do patógeno *in vitro* e em frutos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O maracujazeiro é proveniente da América Tropical, com mais de 500 espécies, sendo que um terço dessas é natural do Brasil. A espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) tem sua origem incerta, podendo ter sido originada pelo cruzamento entre *P. edulis* (maracujá roxo) com alguma outra espécie relacionada ou pela mutação de *P. edulis* (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001). É uma dicotiledônea, pertencente à família Passifloraceae, que possui mais de 23 gêneros, sendo a maioria subordinada ao gênero *Passiflora*. As espécies mais cultivadas são o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), o maracujá-roxo (*Passiflora edulis*) e o maracujá-doce (*Passiflora alata*) (FALEIRO *et al.*, 2005). Essa planta possui hábito de trepadeira podendo atingir 5 a 10 m de comprimento. As suas raízes são axiais, pouco profundas, concentrando-se em 15 a 45 cm de profundidade. Possui folhas lobadas, verdes e com gavinhas e gemas floríferas e vegetativas na axila da folha. As suas flores são de coloração branca, com franja arroxeadada (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001).

### 2.1 Principais doenças do maracujazeiro

A cultura do maracujazeiro é afetada por um grande número de doenças: as viroses, como o vírus do endurecimento do fruto (PWV – Passion fruit woodiness virus) e o superbrotamento (*Phytoplasma* sp.); as bacterioses, como a mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dey) e as doenças fúngicas, como a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum*) e a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), que são comuns a todas as regiões brasileiras. Quando em condições favoráveis, ocorre a doença e os sintomas podem aparecer em toda a parte aérea da planta em qualquer estágio de desenvolvimento (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

O agente causal da antracnose é o *Colletotrichum gloeosporioides* (LIBERATO, 2002), que é um Deuteromiceto, pertencente ao grupo dos fungos mitospóricos (MARTINS *et al.*, 2005). A sua disseminação pode

ocorrer por meio de sementes, de respingos de chuva, de insetos e de implementos agrícolas (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

O *C. gloeosporioides* sobrevive em restos culturais. Por este motivo a antracnose é mais comum e danosa no segundo ano de cultivo. Quando a inoculação é artificial, a infecção só ocorre se forem realizadas lesões nas folhas, nos caules ou nos frutos (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). As colônias do fungo apresentam coloração do micélio variando do cinza claro à cinza escuro, com produção de conídios em mucilagem de cor salmão. Os conídios são liberados e disseminados quando os acérvulos se encontram úmidos (TAVARES, 2004).

Como sintomas característicos da antracnose, destacam-se as manchas com aspecto oleoso nos frutos e nas folhas, que evoluem de tamanho; as bordas adquirem uma coloração pardo-escuras, formando grandes áreas necrosadas; nos frutos ainda ocorrem lesões deprimidas e murchamento (NUNES *et al.*, 2003).

O controle mais comumente utilizado é a aplicação com fungicidas foliares, como o Folicur a 100µL/100mL, produto registrado e recomendado para a cultura. Não há no mercado nenhum fungicida registrado para a aplicação nos frutos e nem na pós-colheita (AGROFIT, 2012). Para o tratamento em pós-colheita de frutos de maracujazeiro, Benato *et al.* (2001) relatam a possibilidade de uso do tratamento hidrotérmico. A busca por variedades resistentes foi feita por Junqueira *et al.* (2003), que testaram genótipos e observaram que, para a antracnose, nenhum dos genótipos se mostrou resistente, sendo a cultivar “Vermelho” a mais suscetível a essa doença.

O gênero *Colletotrichum* pode atacar um grande número de hospedeiros e, em um hospedeiro, pode haver variabilidade de espécies, causando a antracnose, como em Martínez-Culebras *et al.* (2000), que identificaram três espécies de *Colletotrichum*: o *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. fragariae*, causando antracnose no morangueiro, com base identificação molecular, com a técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia).

## 2.2 Influência da antracnose na qualidade de frutos

A antracnose do maracujazeiro é uma doença que também causa grandes perdas em pós-colheita, por causar lesões na casca, comprometendo a aparência do fruto (FISCHER *et al.*, 2007), além de afetar a polpa (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Conforme esses autores, a doença acarreta grandes prejuízos na comercialização *in natura*, pela perda aparente de qualidade, pois a aparência é um dos parâmetros de avaliação mais utilizado pelos consumidores.

Muitas perdas no estágio pós-colheita são causadas pela contaminação ainda no campo e pela infecção quiescente dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Esse tipo de infecção pode ser explicado devido ao fato da suscetibilidade do hospedeiro aumentar após a colheita e com a maturação dos frutos, pois, nos tecidos maduros, há uma menor quantidade de compostos fenólicos e de fitoalexinas, que são tóxicos aos microrganismos. Com a maturação dos frutos, aumenta-se a disponibilização de nutrientes e energia para o desenvolvimento do patógeno. São vários os exemplos de frutas infectadas por *Colletotrichum* ou *Glomerella* na pré-colheita e que apresentam perdas na pós-colheita, como: banana, maçã, abacate, tomate, manga, mamão, pera e uva.

O mecanismo de ação dos fungos sobre o hospedeiro inclui, de modo geral, a produção de enzimas, que podem provocar a desintegração dos componentes estruturais, de substâncias ou podem afetar, diretamente, o protoplasto das células do hospedeiro. Essas enzimas degradadoras da parede celular, como pectinases, celulasas e hemicelulasas, estão provavelmente envolvidas na patogênese da maioria das doenças de plantas (PASCHOLATI, 1997).

## 2.3 Produtos vegetais no controle de fungos

O uso indiscriminado de agrotóxicos, ao longo dos anos, causa danos ao meio ambiente e aos seres vivos e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a essas substâncias químicas (GHINI; KIMATI,

2000). Segundo Campanhola e Bettioli (2003), para tentar amenizar esses problemas, deve-se buscar o controle alternativo de doenças. Dessa forma, produtos de plantas, como extratos e óleos essenciais podem ser utilizados tanto no controle direto do patógeno, quanto para a indução dos mecanismos de resistência. Assim, a exploração da atividade antimicrobiana de compostos secundários presentes nas plantas pode se constituir em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas.

Muitos são os trabalhos relatando a eficiência do controle alternativo, como: óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), os quais se mostraram eficientes no controle *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, inibindo a germinação de conídios e reduzindo o crescimento micelial; reduziram, também, a infecção do patógeno em pós-colheita nos frutos de mamão (*Carioca papaya* L.), sem afetar a qualidade dos frutos, de acordo com Barrera-Necha *et al.* (2008).

O óleo essencial de *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* e o seu principal composto, o metileugenol, foram, então, avaliados contra cinco fungos fitopatogênicos: *C. gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Alternaria humidicola*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora cactorum*. Para o fungo *C. gloeosporioides*, a inibição proporcionada pelo metileugenol foi de cerca de 80%, porém não se diferiu estatisticamente do óleo essencial (DAN *et al.*, 2010).

Combrinck *et al.* (2011) avaliaram quatro espécies de *Lippia* (pertencente à família Verbenaceae) e alguns compostos químicos importantes de óleos essenciais, como o citral, carvona, limoneno, cineol e timol em ação *in vitro* a fungos fitopatogênicos, inclusive ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do abacateiro. Tanto os óleos essenciais como as substâncias químicas isoladas foram eficientes *in vitro* aos outros fungos testados, mas não para o *C. gloeosporioides*.

### **2.3.1 *Cymbopogon citratus***

Conhecido popularmente como capim-santo, capim-cipó, capim-limão, capim-cidreira, dentre outros nomes, o *Cymbopogon citratus* é uma erva

perene, crescimento cespitoso, formando touceiras compactas e robustas de até 1,2m de altura; pertence à família Poaceae (CASTRO; RAMOS, 2003). Essa planta tem como centro de origem a Ásia e é subspontânea nos países tropicais, sendo usada para fins medicinais (MARTINS *et al.*, 2002).

Na separação e na identificação dos componentes de um óleo essencial, utilizam-se técnicas de cromatografia e espectrofotometria (DAN *et al.*, 2010). Esses autores, utilizando um cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrofotômetro, identificaram os componentes do óleo essencial de *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum*, sendo sete compostos, em maior concentração: metileugenol (59,42%) eucarvone (24,10%), 5-alil-1,2,3-trimethoxybenzene (5,72%) e 3,7,7 trimetilbicyclo (4.1.0) hept-3-eno (4,93%), e também incluindo 2,6,6-trimetilbicyclo (3.1.1) hept-2-eno (0,42%), (1S)-(1)-beta-pineno (0,75%), e 1,3-dimetoxi-5-methylbenzene (0,63%).

Aquino (2011) analisou a composição de três óleos essenciais; dentre eles, o *C. citratus*, utilizando metodologia semelhante e encontrou como principais compostos: Z-citral (34,05%), E-citral (43,69%) e beta-mirceno (15,11%) para esse óleo.

Tem-se demonstrado que *C. citratus* dispõe de substância antifúngica. Em conformidade com Silva *et al.* (2009), em trabalho testando a ação antifúngica de óleos essenciais de sete plantas, dentre elas o *C. citratus*, no controle *in vitro* de *C. gloeosporioides* isolados do maracujazeiro, verificou-se que esses óleos sem diluição foram eficientes em inibir em 100% a germinação dos esporos.

Aquino (2011) avaliou a ação inibitória de três óleos essenciais: *Lippia sidoides*, *C. citratus* e *Ocimum gratissimum*, em diferentes concentrações (1µL, 3µL, 5µL e 7µL/mL), na germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e observou o efeito inibitório de 100% da germinação de conídios na presença do óleo de *C. citratus*, desde a concentração de 1µL/mL.

No entanto faz-se necessário avaliar os componentes químicos do óleo de *C. citratus* sobre o desenvolvimento de *C. gloeosporioides in vitro* e sobre o desenvolvimento da doença nos frutos de maracujá amarelo.

## 2.4 Tratamento de frutos

A eficiência de produtos no controle de doenças nos frutos, normalmente, é avaliada pela redução da incidência e da severidade da doença. Por sua vez, a incidência é avaliada pelo número de frutos com sintomas e a severidade pode ser analisada por meio de escalas diagramáticas, que seriam a quantificação dos sintomas da planta (AMORIN; BERGAMIN FILHO, 2011).

Fischer *et al.* (2009) elaboraram e validaram uma escala diagramática para a avaliação da severidade da antracnose causada pelo fungo *C. gloeosporioides* em frutos de maracujazeiro amarelo. Com essa escala, é possível quantificar os sintomas da antracnose de forma mais acurada e precisa. Solino *et al.* (2012) utilizaram a escala diagramática para a determinação da severidade em frutos de maracujazeiro tratados com óleos de soja, copaíba, nim e extrato de jatobá. Constatou-se que os óleos de soja e de nim foram eficientes no controle da antracnose dos frutos de maracujazeiro, reduzindo a severidade da doença. Já o extrato de jatobá favoreceu o desenvolvimento da doença.

Junqueira *et al.* (2004) avaliaram o controle do óleo de soja isolado ou misturado ao benomil e thiabendazol no controle da antracnose em frutos de manga da cultivar Palmer e a severidade nos frutos. Esse tratamento se mostrou como uma alternativa eficaz no controle da antracnose em manga Palmer, aumentando a vida de prateleira.

Carvalho *et al.* (2009) testaram tratamentos alternativos, como o óleo de cravo (0,01%) sobre frutos de pessegueiro em pós-colheita. Os frutos foram imersos em água contendo os tratamentos por 30 segundos, de 3 a 9 dias após o armazenamento. Foram avaliadas a incidência e a severidade das doenças. O óleo de cravo reduziu a incidência da podridão de *Rhizopus* spp.

### 3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a ação antifúngica de dois compostos químicos, citral e mirceno, presentes em *C. citratus* sobre o fungo *C. gloeosporioides*.

## RESUMO

### CAPÍTULO 2 - ESTUDO AUTOECOLÓGICO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* DO MARACUJAZEIRO

O objetivo desta pesquisa foi caracterizar culturalmente e verificar a agressividade dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujá amarelo. Para tanto, utilizaram 7 isolados, avaliando 2 meios de cultura e, posteriormente, 2 temperaturas, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições, em esquema fatorial 7x2. A caracterização compreendeu a avaliação da coloração da colônia, tamanho e forma dos conídios, o IVCN, a produção de esporos, o índice de velocidade de crescimento da lesão, o período de incubação e de latência, a produção de celulase. Houve interação entre isolado e meio de cultura e temperatura, para o crescimento micelial e também entre os isolados e as temperaturas. Os isolados C94 e C95 apresentaram maior crescimento micelial no meio de cultura BDA e, posteriormente, sob temperatura de 25°C. Para a produção de esporos, a interação isolados e temperatura foi não significativa, sendo que os isolados C94, C95 e ISO1 as que produziram maior quantidade de esporos independente do meio de cultura e da temperatura avaliada. A coloração variou apenas em função do meio de cultura, podendo dividir os isolados em 4 grupos: o primeiro, com os isolados C94 e C95; o segundo, com os isolados C96 e ISO2; o terceiro, com os isolados ISO3 e ISO6 e o quarto, formado pelo isolado ISO1. O índice de velocidade de crescimento da lesão foi maior para os isolados C94, C95 e ISO1, tendo os períodos de incubação e latência variado em função dos isolados, sendo menor para os isolados C94 e C95. O tamanho do halo de degradação da celulose pode ser observado apenas no isolado mais agressivo, o C95, pois o isolado menos agressivo, o ISO2, não foi capaz de crescer no meio com celulose como única fonte de nutriente. Conclui-se que os isolados C94, C95 e ISO1 são os mais agressivos, dentro deste grupo de isolados estudados. O meio de cultura e a temperatura influenciam o IVCN. A temperatura não influenciou na produção de esporos e nem na coloração da colônia. Há variação na capacidade de causar doença dos isolados. Um isolado do grupo mais agressivo foi capaz de produzir celulase em meio cuja única fonte de carbono é a celulose.

**Palavras-chave:** Agressividade. Antracnose. Celulase. Meio de cultura. Temperatura.

**ABSTRACT****CHAPTER 2 - AUTOECOLOGICAL STUDY OF ISOLATES OF  
*Colletotrichum gloeosporioides* OF PASSION FRUIT**

The objective of this research was to characterize culturally and verify the aggressiveness of the isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* of the yellow passion fruit. For that, 7 isolates were used, evaluating two culture mediums and then, 2 temperatures in completely randomized design (CRD) with four replications in a 7x2 factorial arrangement. The characterization included the assessment of the color of the colony, size and shape of the conidia, the SRMG, the spore production, the speed rate parameters of lesion growth, and the incubation period of latency, the production of cellulase. There was interaction between isolated and culture medium and temperature for mycelial growth and also between the isolates and the temperatures. The C94 and C95 isolates showed higher mycelial growth on PDA culture medium, and subsequently, at a temperature of 25 ° C. For the spores' production, the interaction isolated and temperature was not significant, whereas the C94, C95 and ISO1 isolates, the ones that produced greater amount of spores from the independent culture medium and of the temperature evaluated. The color varied only due to the culture environment, and may divide the isolates into 4 groups: the first, with the C94 and C95 isolated; the second with C96 and ISO2 isolated; the third with ISO3 and ISO6 isolated and the fourth formed by ISO1 isolated. The speed rate parameters of lesion growth was higher for the C94, C95 and ISO1 isolated, it was incubation periods and latency varied depending on of the isolates, being lower for C94 and C95 isolated. The size of the halo of cellulose degradation can be observed only in the more aggressive isolated, the C95, because the isolated as the less aggressive, the ISO2, was unable to grow on medium with cellulose as the sole nutrient source. It is concluded that the isolates, the ones that C95 isolated are the most aggressive, within this group of isolated. The culture environment and temperature influence SRMG. The temperature had no effect on spore production and not in the color of the colony. There is variation in the ability of the isolates to cause disease of the isolated. An isolated group of more aggressive was capable of producing cellulase among whose only carbon source is the cellulose.

**Keywords:** Aggressivity. Anthracose. Cellulose. Culture enviroment. Temperature.

## 1 INTRODUÇÃO

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas da cultura do maracujazeiro, por ocorrer na parte aérea da planta em qualquer estágio de desenvolvimento (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Como sintomas característicos dessa doença, aparecem manchas com aspecto oleoso nos frutos e nas folhas, que evoluem de tamanho; as bordas adquirem uma coloração pardo-escura, formando grandes áreas necrosadas; nos frutos, ainda ocorre a formação de lesões deprimidas e murchamento (NUNES *et al.*, 2003).

A disseminação do patógeno pode ocorrer por meio de sementes, respingos de chuva, insetos e implementos agrícolas (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Na inoculação artificial, a infecção só ocorre se forem realizados ferimentos nas folhas, nos caules ou nos frutos (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

O agente causal é o fungo cuja fase telomórfica é *Glomerella cingulata* (B. M. Stoneman) P. Spaulding & H. Von Schrenk e a anamórfica, o *Colletotrichum gloeosporioides* (O. A. J. Penzig) O. A. J. Penzig & P. A. Saccardo (LIBERATO, 2002). O *C. gloeosporioides* é um fungo do grupo mitospórico, pertencente à ordem Melanconiales (AGRIOS, 2005). As colônias do fungo apresentam coloração do micélio, variando do cinza claro a cinza escuro; os conídios são hialinos e são liberados e disseminados quando os acérvulos se encontram úmidos (TAVARES, 2004).

A temperatura ótima para a maioria dos fungos está na faixa de 20-30°C, podendo a temperatura para crescimento diferir da ideal para esporulação, sendo importante esse conhecimento para a otimização do cultivo *in vitro*. (ALFENAS; MAFFIA, 2007). Para o gênero *Colletotrichum*, há variação da temperatura ótima de crescimento e esporulação de 20 a 30°C (FRANCISCO NETO *et al.*, 1994; MELLO *et al.*, 2004).

O carbono e o nitrogênio são as principais substâncias necessárias ao crescimento e à reprodução dos fungos; além da principal fonte de energia, o carbono é essencial à síntese de enzimas, fornecido por carboidratos (ALFENAS; MAFFIA, 2007).

O meio batata dextrose ágar, além do amido oriundo da batata, é suplementado com dextrose, promovendo o crescimento da maioria dos fungos (ALFENAS; MAFFIA, 2007). Esse meio pode promover o melhor crescimento micelial para várias espécies, como *C. musae* (COUTO; MENEZES, 2004). O meio aveia ágar também possui amido como carboidrato e não possui suplementação de glicose (SUSSEL, 2005), mas pode ser utilizado como melhor meio de crescimento e produção de esporos para o fungo *Diaporthe citri* (NOZAKI *et al.*, 2004). Esse meio é geralmente utilizado para proporcionar uma maior produção de esporos.

O *C. gloeosporioides* apresenta grande variação morfofisiológica e patogênica, mesmo entre as culturas monospóricas (SERRA *et al.*, 2008). Uma vez que a variabilidade pode existir até mesmo entre tais culturas, essa variação pode ser muito maior ainda entre culturas multiespóricas, que são isolados diferentes de uma mesma espécie.

Para a produção de novos produtos que sejam eficientes no controle dessa doença e bem como para o desenvolvimento futuro de variedades resistentes, uma vez que não há produto registrado para o tratamento pós-colheita ou aplicação direta nos frutos (AGROFIT, 2012), faz-se necessário otimizar a produção de inóculo em laboratório, tanto o desenvolvimento da colônia como a esporulação, selecionando ainda, para tais fins, indivíduos com maior agressividade. Envolve, portanto, a caracterização morfofisiológica e patogenicidade do agente causal. Assim, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar, fenotipicamente e patogenicamente, *Colletotrichum gloeosporioides* isolados da parte aérea de maracujazeiro amarelo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e manutenção dos isolados

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Minas Gerais, no Campus Montes Claros. Culturas de *C. gloeosporioides* oriundas da micoteca da Universidade Federal de Viçosa e de culturas utilizadas por Aquino (2011) foram utilizadas nesta pesquisa (QUADRO 1). Os isolados foram cultivados e mantidos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

QUADRO 1  
Procedência dos isolados de *C. gloeosporioides*.

ISOLADO	ÓRGÃO VEGETAL	REGIÃO
C94*	Fruto	Viçosa-MG
C95*	Fruto	Viçosa-MG
C96*	Fruto	Viçosa-MG
ISO3**	Haste	Seropédica-RJ
ISO1**	Folha	Seropédica-RJ
ISO2**	Fruto	Seropédica-RJ
ISO6**	Haste	Montes Claros-MG

Notas: \*Micoteca da Universidade Federal de Viçosa.

\*\*Denominação dada por Aquino (2011).

Fonte: Da autora.

### 2.2 Caracterização cultural dos isolados de *C. gloeosporioides*

Para as avaliações de caracterização cultural, transferiram-se discos de micélio da cultura pura, com 5mm de diâmetro e sete dias de idade, para o centro de uma placa de Petri de 9cm de diâmetro contendo o meio de cultura a ser testado, o BDA e o Aveia Ágar (50g de farinha de aveia e 15g de Ágar).

Tudo isso sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Incubaram-se as placas em incubadora tipo BOD, sob duas temperaturas, 25 e 30°C.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7x2 (7 isolados versus 2 meios de cultura ou 2 temperaturas), com 4 repetições, totalizando-se 14 tratamentos e 56 parcelas, sendo cada repetição composta por 1 placa. As placas permaneceram incubadas por um período de sete dias, sob fotoperíodo de 12 horas, sendo avaliadas diariamente.

Como características culturais, avaliaram-se o crescimento micelial, por meio do índice de crescimento micelial (IVCM) e a produção de esporos, por meio da determinação do número médio de esporos por mm<sup>2</sup> da colônia.

Mediu-se, com um paquímetro, o diâmetro da colônia em dois eixos ortogonais, para o cálculo das médias e, posteriormente, do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), utilizando-se a equação adaptada por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \sum (D - D_a) / N, \text{ onde:}$$

IVCM= Índice de velocidade de crescimento micelial;

D = Diâmetro médio atual;

D<sub>a</sub> = Diâmetro médio do dia anterior e

N = Número de dias após montagem do experimento (repicagem do fungo).

As mesmas placas permaneceram incubadas por mais três dias, totalizando-se 10 dias, para a verificação da esporulação. De cada placa, foram retirados três discos da colônia, de 6mm de diâmetro e colocados em tubos de ensaio estéreis, com 10mL de água destilada autoclavada. Agitaram-se, posteriormente, os tubos para a liberação dos esporos e procedeu-se à contagem, utilizando-se a Câmara de Neubauer (ALFENAS; MAFFIA, 2007). Calculou-se o número de esporos por mm<sup>2</sup> da colônia e, após análise de normalidade e homogeneidade das variâncias, transformou-se em logaritmo na base 10 (ARAÚJO *et al.*, 2009).

A caracterização morfológica baseou-se na coloração da colônia nos meios e temperaturas testadas. Utilizou-se a Carta de Munsell como parâmetro, avaliando a coloração predominante da colônia aos sete dias após a repicagem. Foi utilizado o DIC, em esquema fatorial 7x2x2, com 4 repetições.

Avaliou-se, ainda, como característica morfológica, o tamanho dos conídios de cada isolado, por meio da observação de lâminas microscópicas semipermanentes em microscópio óptico, acoplado com câmera do modelo Nikon Eclipse E200 Canon A620 Power Shot, com objetiva 40 e zoom 4 vezes.

### **2.3 Caracterização patogênica**

Para a comprovação da patogenicidade, os frutos de maracujazeiro amarelo com aparência saudável, sem manchas e sem perda aparente de massa fresca, foram lavados em água corrente e detergente neutro. A casca foi retirada e cortada em discos de 20mm de diâmetro com um ferimento no centro realizado por uma agulha estéril. Colocaram-se cinco discos sobre cada placa de Petri contendo meio de cultura Ágar-Água (2%). A inoculação foi realizada com 10 $\mu$ L de uma suspensão de esporos na concentração de 2x10<sup>7</sup> esporos/mL, obtida de uma cultura com 10 dias (AQUINO, 2011). Tais procedimentos foram realizados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

Avaliou-se, diariamente, se cada um dos isolados apresentava a lesão típica da antracnose. Mediu-se o tamanho da lesão em dois sentidos, com um paquímetro. Calculou-se a média do tamanho da lesão em mm, para cada repetição. Adaptou-se a fórmula de IVCM proposta por Oliveira (1991) para o índice de velocidade de crescimento da lesão (IVCL). Então, o IVCL=  $\Sigma (D-Da)/N$ , onde:

IVCL= Índice de velocidade de crescimento da lesão;

D = Diâmetro médio atual da lesão;

Da = Diâmetro médio da lesão no dia anterior e

N = Número de dias após a inoculação do fungo.

Avaliaram-se os períodos de incubação e latência do patógeno, para cada isolado. Considerou-se o período de incubação como sendo o período em dias necessários para o surgimento da lesão, ou seja, o aparecimento de sintomas e o período de latência como o período, em dias necessários para a formação de estruturas reprodutivas do patógeno. O delineamento utilizado para esse experimento foi inteiramente casualizado, com 7 tratamentos (isolados) e 4 repetições, totalizando 28 parcelas, sendo cada parcela composta por uma placa de Petri.

Os dados de IVCM e IVCL foram analisados utilizando-se o Programa Saeg, sendo realizados testes homogeneidade e normalidade das variâncias no programa Saeg, sem necessidade de transformação de dados e posterior teste de médias.

## **2.4 Produção de celulase**

Dois isolados, um dos mais agressivos e outro dos menos agressivos, foram avaliados quanto à produção da enzima celulase, em meio de cultura pobre, cuja única fonte de carbono é a celulose. Utilizou-se o meio C (CMC – celulose microcristalina a 1%; sulfato de amônio a 0,5%; sulfato de magnésio heptahidratado a 0,05%; ágar-água a 2%). Procedeu-se, primeiramente, à adaptação do isolado ao meio. Depois, procedeu-se, à montagem do experimento. Um disco de 6mm de diâmetro, da colônia de uma placa com meio C, após 72h de crescimento, foi repicado para uma placa nova, com o mesmo meio. Incubaram-se as placas a 25°C, fotoperíodo de 12h e avaliou-se o halo de degradação da celulose nos períodos de 24h até 120h (ALMEIDA, 2009).

Na revelação do halo, lavoram-se três vezes as placas com solução de NaCl a 1M. As placas permaneceram na geladeira por 24h, para, então, realizar a visualização e a medição do diâmetro halo, subtraindo o diâmetro da colônia.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 (24, 48, 72, 96 e 120 horas) tratamentos e 3 repetições, totalizando 15 parcelas. A análise estatística foi realizada no Programa Sisvar.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização cultural dos isolados de *C. gloeosporioides*

Para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), houve efeito significativo a 5%, para a interação entre os fatores isolado e meio de cultura (TAB. 1).

TABELA 1

Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) dos isolados de *C. gloeosporioides*, em função dos meios de cultura batata dextrose ágar (BDA) e aveia ágar (AVA)

ISOLADO	BDA	AVA
C94	11,83 Aa	7,19 Cb
C95	11,20 Aa	9,21 Ab
C96	7,05 Ba	7,20 Ca
ISO3	5,90 Bb	6,28 Da
ISO1	6,23 Bb	8,61 Ba
ISO2	7,04 Ba	7,73 Ca
ISO6	3,47 Cb	7,02 Ca
CV(%)	11,483	

Nota: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

O maior crescimento micelial foi observado nos isolados C94 e C95, que foram iguais estatisticamente no meio de cultura BDA. Já para o meio de cultura AVA, o isolado C95 apresentou o maior IVCM. Observou-se, ainda, que, para estes isolados, houve uma redução do crescimento, quando se utilizou o meio de cultura AVA. Esses dados estão em conformidade com Andrade *et al.* (2007) em trabalho avaliando meios de cultura sob temperatura de 25°C, no qual, 4 dos isolados de *C. gloeosporioides* do

mamoeiro utilizados tiveram maior crescimento no meio BDA com valores de IVCM semelhantes aos resultados desta pesquisa.

Para os isolados ISO3, ISO1 e ISO6, o meio de cultura AVA é o mais recomendado para a obtenção de um maior crescimento micelial, assim como no trabalho de Mello *et al.* (2004), em que os autores utilizaram o meio de cultura AVA e esse foi o melhor meio de cultura para o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado do pimentão.

Já para os isolados C96 e ISO2, não houve diferença no crescimento micelial quando alterou-se os meios de cultura. Esses dados estão em conformidade com Oliveira *et al.* (2011), que verificaram, com esses mesmos meios de cultura, a não influência no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolados da teca.

Portanto, há uma diferença no requerimento nutricional dos isolados de *C. gloeosporioides* avaliados, assim como em Mafacioli *et al.* (2006), em que tais autores observaram diferenças nos requerimentos nutricionais de isolados de *C. gloeosporioides* da pupunheira, influenciando o crescimento micelial e esporulação dos mesmos. Faz-se necessário saber, para o isolado estudado qual o meio de cultura promove o maior crescimento, de forma a otimizar a produção de inóculo.

A interação entre os fatores isolados e temperaturas foi significativo a 5% de probabilidade (TAB. 2).

TABELA 2

Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) dos isolados *C. gloeosporioides* em função das temperaturas de 25 e 30°C

ISOLADO	25	30
C94	11,83 Aa	6,88 Bb
C95	11,20 Aa	7,22 Ab
C96	8,12 Ba	5,98 Cb
ISO3	8,92 Ca	5,90 Cb
ISO1	6,23 Da	4,97 Eb
ISO2	7,04 Da	5,24 Db
ISO6	4,86 Ea	3,47 Fb
CV(%)	8,658	

Nota: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

A temperatura de 25°C promoveu um maior crescimento micelial para todos, assim como nos estudos de Mello *et al.* (2004), que observaram um maior crescimento micelial de *C. gloeosporioides* do pimentão, sob temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12h. Os isolados C94 e C95 apresentaram, novamente, o maior crescimento micelial, sendo esses iguais estatisticamente.

A velocidade de crescimento micelial dos isolados é influenciada pelo meio de cultura utilizado e pela temperatura de incubação, sendo notado comportamento diferente entre os isolados analisados, evidenciando, assim, a variabilidade existente entre eles. Conforme Serra *et al.* (2008), essa variabilidade pode ser observada até mesmo em culturas monospóricas provenientes de uma mesma cultura pura, ao se tratar de *C. gloeosporioides* isolados do cajueiro e da mangueira.

Estudos anteriores comprovam essa variação no comportamento de espécies de *Colletotrichum*, quanto à característica fisiológica (MELLO *et al.*, 2004). Serra *et al.* (2008) encontraram variação na fisiologia de *C. gloeosporioides* de mangueira e cajueiro, em função do meio de cultura e da

temperatura de incubação. Com relação aos fatores que influenciam o crescimento micelial e a esporulação, Francisco Neto *et al.* (1994), trabalhando com isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de Passiflora, observaram diferenças entre os isolados em relação à capacidade de crescimento e à esporulação e constataram que o meio de cultura exerceu marcante efeito sobre a produção de conídios produzidos, variando, conforme o isolado.

Tanto os meios de cultura AVA, como o BDA possuem, na sua composição, o amido como principal carboidrato, sendo esse um composto que, provavelmente, se hidrolisa de forma lenta, o que não proporciona acúmulo de ácidos no meio, não prejudicando, portanto, o desenvolvimento do fungo. Mas o meio BDA, além do amido, possui também a dextrose, outro carboidrato que, para os isolados C94 e C95, proporcionou um maior crescimento; para o isolado 3 não houve diferença. Os demais cresceram melhor com o amido sendo a única fonte de carboidrato. Portanto, a suplementação de glicose no meio de cultura que contém amido, pode ou não influenciar o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (SUSSEL, 2005).

A interação dos isolados com os meios de culturas e a interação dos isolados com as temperaturas não foram significativas para a variável produção de esporos, havendo diferença apenas entre os isolados (TAB. 3). O isolado 7 não produziu esporo em nenhuma das temperaturas e em nenhum dos meios de cultura, por isso foi retirado dessa análise. O meio de cultura não influenciou a produção de esporos desses isolados.

TABELA 3

Densidade de esporos (esporos/mm<sup>2</sup>) dos isolados de *C. gloeosporioides*

ISOLADO	PRODUÇÃO DE ESPOROS
C94	1,23 X 10 <sup>6</sup> A
C95	3,77 X 10 <sup>6</sup> A
C96	1,35 X 10 <sup>1</sup> B
ISO3	0,99 X 10 <sup>2</sup> B
ISO1	9,75 X 10 <sup>6</sup> A
ISO2	1,57 X 10 <sup>1</sup> B
CV	34,484

Nota: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

Os isolados que mais esporularam a 25°C, independente do meio usado ou da temperatura avaliada, foram: C94, C95 e ISO1. Esses foram iguais estatisticamente, diferentemente de Mello *et al.* (2004), que observaram maior produção de esporos de *C. gloeosporioides* sob 25°C. Nesta presente pesquisa a temperatura não influenciou a densidade de esporos. Diferentemente de Sussel (2005), que verificou variação da esporulação, em função do meio de cultura utilizado, sendo que o BDA promoveu maior produção de esporos.

A produção de esporos ou esporulação está ligada à capacidade de disseminação do patógeno, uma vez que os esporos que são carreados para outros locais, se depositam na superfície de novos hospedeiros. Portanto, uma maior produção de esporos gera uma maior probabilidade de atingir novos hospedeiros e, por conseguinte, poderá causar novas infecções (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Quanto à variável cor, os isolados apresentaram variação de coloração, variando do branco ao cinza (QUADRO 2). Ao se mudar o meio de cultura, a coloração da colônia variou em todos os isolados utilizados. Mafacioli *et al.* (2006) também verificaram variação da coloração da colônia de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes da pupunheira, variando do

cinza ao branco, mas não observaram nenhum isolado com coloração laranja. Esses autores utilizaram apenas um meio de cultura.

#### QUADRO 2

Coloração predominante na colônia para cada isolado de *C. gloeosporioides* nos meios de cultura, batata dextrose ágar (BDA) e aveia ágar (AVA)

ISOLADO	COR	BDA	COR	AVA
	MUNSEL		MUNSEL	
C94	10YR6/1	Cinza	10YR8/8	Laranja escuro
C95	10YR5/1	Cinza	10YR8/8	Laranja escuro
C96	7,5YR8/6	Laranja claro	7,5YR8/6	Laranja claro
ISO3	7,5YR8/1	Branco	10YR8/4	Creme
ISO1	7,5YR8/6	Laranja claro	5YR7/4	Lilás
ISO2	7,5YR8/6	Laranja claro	10YR8/8	Laranja escuro
ISO6	7,5YR8/1	Branco	10YR8/4	Creme

Fonte: Da autora.

Para as temperaturas avaliadas, não foi observada diferença de coloração entre os tratamentos. Segundo Menezes (2002), isolados pertencentes à mesma espécie de *C. gloeosporioides* apresentaram entre si grande variabilidade no mesmo substrato, admitindo que esse fato pode estar relacionado à presença de raças fisiológicas.

Os isolados podem ser separados em 4 grupos. O grupo 1, agrupando os isolados C94 e C95 com coloração acinzentada, em meio BDA e laranja, em meio AVA. O grupo 2, composto pelos isolados C96 e ISO2, com predominância de coloração alaranjada, nos dois meios de cultura. O grupo 3, formado pelos isolados ISO3 e ISO6, com coloração em meio BDA branco e no AA, cor creme. O grupo 4, com o isolado ISO1 que, em meio BDA,

possui a mesma cor do grupo 2, mas, em meio AVA, adquire cor lilás predominante na colônia.

Nos estudos de Serra *et al.* (2008), as colônias apresentaram grande diversidade com relação à cor e ao aspecto, de acordo com os diferentes isolados multiespóricos, porém não foi observada variação expressiva da cor quando se compararam isolados monospóricos com os multiespóricos originais.

Os isolados C94, C95 e ISO3 apresentaram maiores valores de comprimento (QUADRO 3). Os maiores valores de largura foram verificados nos conídios dos isolados C94, C95 e ISO6, podendo relacionar comprimento e largura do conídio com a patogenicidade, uma vez que os isolados C94 e C95 apresentaram maior comprimento e também a maior largura, sendo esses do grupo dos mais agressivos. Os conídios dos isolados C94, C95 e ISO3 apresentam forma cilíndrica; os isolados ISO1 e ISO2 forma afilada. Os conídios do isolado ISO6 são obláceos. Os conídios do isolado 3 apresentam forma cilíndrica-oblácea, assim como Silva *et al.* (2005), que verificaram variação da forma de conídios de *Colletotrichum* spp. do cafeeiro, observando conídios cilíndricos, afilados, obláceos e cilíndrico/obláceo. Carneiro *et al.* (2012) identificaram *C. gloeosporioides*, causando antracnose em cártamo, sendo os seus conídios com formato cilíndrico e hialinos, assim como nesta pesquisa, em que os isolados apresentam essa forma e todos são hialinos.

## QUADRO 3

Tamanho médio ( $\mu\text{m}$ ) e forma dos conídios de cada isolado de *C. gloeosporioides*

ISOLADO	COMPRIMENTO ( $\mu\text{m}$ )	LARGURA ( $\mu\text{m}$ )	RELAÇÃO C/L	FORMA
C94	26,31	2,63	10,00	Cilíndrico
C95	27,37	3,16	8,66	Cilíndrico
C96	10,83	1,84	5,88	Cilíndrico/obláceo
ISO3	21,05	1,72	12,23	Cilíndrico
ISO1	11,58	1,05	11,05	Afilado
ISO2	10,53	1,53	6,88	Afilado
ISO6	16,8	2,10	8,00	Obláceo

Fonte: Da autora.

Andrade *et al.* (2007), ao caracterizarem isolados de *C. gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro, verificaram tamanhos de conídios variando de 10,4 a 18,2 $\mu\text{m}$  de comprimento e largura de 3,9 a 6,5 $\mu\text{m}$ , sendo a relação comprimento/largura superior a 3,9 somente para isolados identificados como *C. acutatum*. Nesta pesquisa, alguns isolados apresentaram comprimento superior a 18,2 e a largura dos mesmos foi inferior; todos os isolados apresentaram uma relação comprimento/largura superior a 5,88.

Estudos realizados por Johnston e Jones (1997) puderam reconhecer 16 grupos distintos, de diversos isolados de *Colletotrichum*, obtidos de fruteiras na Nova Zelândia, por meio de sequenciamento de DNA.

### 3.2 Caracterização patogênica

Todos os isolados causaram lesões nos discos de frutos de maracujazeiro amarelo, tendo sido comprovada a patogenicidade dos mesmos, por meio do cumprimento dos postulados de Koch (ALFENAS; MAFFIA, 2007).

Houve diferença no índice de velocidade de crescimento da lesão entre os isolados testados. Também houve diferença significativa entre os isolados para o período de incubação e para o período de latência.

Os isolados que apresentaram maior velocidade de crescimento da lesão foram os isolados C94, C95 e ISO1, em conformidade com os testes in vitro, seguidos pelos isolados C96, ISO3 e ISO2 (TAB. 4). O isolado ISO6 foi o que apresentou o menor IVCL.

TABELA 4

Índice de velocidade de crescimento da lesão (IVCL) dos isolados de *C. gloeosporioides* (mm/dia), períodos de incubação e latência (dias)

ISOLADO	IVCL	INCUBAÇÃO	LATÊNCIA
C94	2,1148 A	1,25 A	2,50 A
C95	2,2130 A	1,25 A	2,50 A
C96	1,0793 B	4,25 D	7,00 D
ISO3	1,1429 B	3,25 C	6,25 C
ISO1	2,2684 A	2,00 B	4,25 B
ISO2	1,4004 B	4,00 D	6,25 C
ISO6	0,6055 C	4,00 D	7,00 D
CV(%)	10,14	13,23	10,68

Nota: As médias seguidas pela mesma maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Fonte: Da autora.

Foi considerado período de incubação o número de dias após a inoculação em que foi possível observar o surgimento da lesão na casca dos frutos. Considerou-se período de latência o número de dias após a inoculação até o aparecimento de estruturas reprodutivas na superfície dos discos dos frutos. Houve variação desses períodos entre os isolados, sendo menor para os isolados C94,e C95, seguido do isolado ISO1. Os isolados C96, ISO2 e ISO6 tiveram o maior período de incubação. Aquino (2011) testou os isolados ISO3, ISO1, ISO2 e ISO6 em seus experimentos e

constatou que o isolado ISO1 foi o mais agressivo, provocando um maior tamanho de lesão nos frutos.

Serra *et al.* (2008), ao analisarem isolados multispóricos e monospóricos de *C. gloeosporioides* obtidos do cajueiro e mangueira, observaram diferenças estatísticas na patogenicidade e na agressividade, tanto dos isolados multispóricos quanto dos isolados monospóricos, isso por meio da característica comprimento das lesões. A variável patogenicidade é uma característica de extrema importância na diferenciação de isolados dessa espécie, sendo analisada em diversos trabalhos (DENOYES-ROTHAN *et al.*, 2003; FREEMAN *et al.*, 2002).

### **3.3 Produção de celulase**

A celulase é uma das enzimas relacionadas à patogenicidade dos fungos, uma vez que essa compõe cerca de 30% da parede celular vegetal (PASCHOLATI, 2011). Dessa forma, espécimes ou isolados que produzem uma maior quantidade dessa enzima, provavelmente, degradarão mais facilmente a parede celular do hospedeiro.

O isolado C95, aquele escolhido no grupo dos isolados mais agressivos e o isolado ISO2, no grupo dos menos agressivos, foram usados nesta avaliação. Somente o isolado C95 cresceu no meio C, contendo celulose como única fonte de nutriente, sendo possível a realização do experimento. O isolado ISO2 não foi capaz de crescer no meio C, provavelmente, devido à sua incapacidade ou baixa capacidade de produzir celulase.

Com o isolado C95, foi possível verificar o halo de degradação de celulose. Foi notada a presença desse halo 48h após a repicagem. Como houve diferença entre os tratamentos, realizou-se a análise de regressão (GRAF. 1).

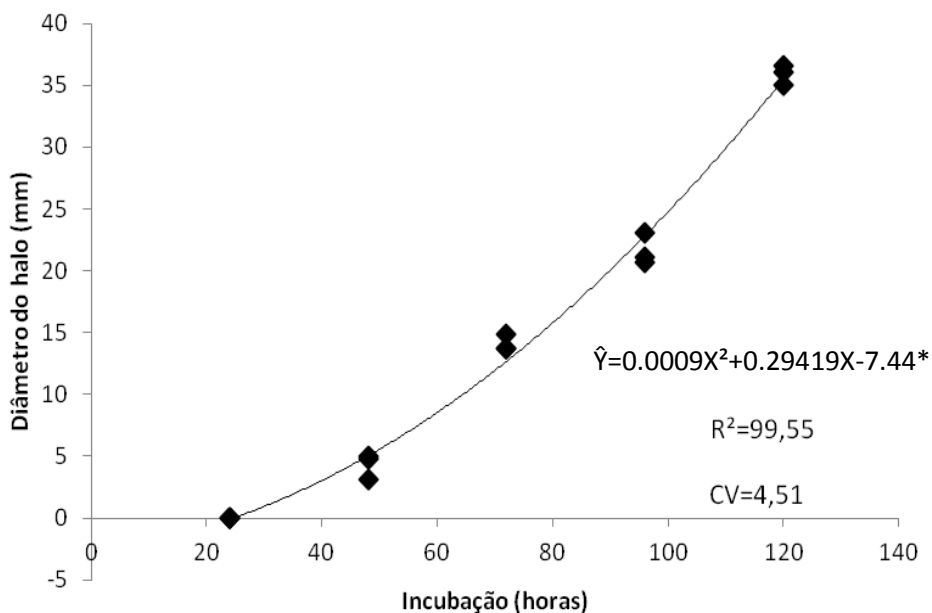


GRÁFICO 1- Halo de degradação da celulose (mm) produzido *in vitro* pelo isolado C95 a cada 24 horas. Análise de Regressão Quadrática ( $\alpha=0,05$ ).

Fonte: Da autora.

Couto *et al.* (2002), em estudo semelhante com o *C. musae* da bananeira, observaram que esse fungo produzia enzimas extracelulares, pelo fato de apresentarem atividade celulolítica em meio sólido. Já Pereira (2009) relaciona a agressividade de isolados de *C. gloeosporioides* da goiaba à produção de enzimas extracelulares, como a celulase. Esses autores confirmaram que os isolados mais agressivos foram também os que produziram os maiores halos de degradação da celulose.

## 4 CONCLUSÃO

O crescimento micelial dos isolados variou em função da temperatura e do meio de cultura. Cada isolado possui uma temperatura e meio específico para um maior crescimento in vitro.

A produção de esporos dos isolados não foi influenciada nem pelos meios de culturas e nem pelas temperaturas avaliadas.

A coloração da colônia dos isolados variou entre eles e também entre os meios usados.

Observou-se variação na capacidade de causar doença dos isolados.

Um isolado do grupo mais agressivo foi capaz de produzir celulase em meio cuja celulose é a única fonte de carbono, evidenciando a relação da atividade da celulase com a agressividade do isolado.

## RESUMO

**CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CITRAL E DO MIRCENO  
SOBRE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides***

O *Cymbopogon citratus* possui propriedades medicinais e já foi constatada ação antifúngica, inclusive no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* como sobre frutos de maracujazeiro com antracnose. Mas se faz necessário comprovar qual dos compostos químicos presente nessa planta possui efeito inibitório ao fungo. O objetivo desta pesquisa foi saber, dentre os compostos Citral e Mirceno, qual deles possui ação antifúngica ao *C. gloeosporioides*. Para tanto, avaliou-se a ação *in vitro* e no tratamento dos frutos com esses compostos químicos. Na avaliação *in vitro*, utilizaram-se 3 tratamentos, Citral, Mirceno e o Citral + Mirceno, em 5 concentrações diferentes. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3 sobre o índice de velocidade de crescimento micelial e na produção de esporos. Os frutos foram tratados com o composto que apresentou maior potencial antifúngico, conforme o experimento *in vitro*. O método utilizado foi o de discos de casca dos frutos, que possuía um ferimento no centro, onde foi depositada uma alíquota de 10µL da suspensão de esporos, na concentração  $2 \times 10^7$  esporos/mL. Avaliou-se o tamanho da final da lesão, levando-se em consideração o tamanho inicial da mesma. Ambos os experimentos foram realizados para os dois isolados: um mais agressivo e outro menos agressivo, possuindo uma testemunha com fungicida. O fungicida inibiu completamente o crescimento micelial, para os dois isolados avaliados no teste *in vitro*. Comparando-se os tratamentos com os compostos químicos, a interação não foi significativa para ambos os isolados avaliados. Para o isolado C95, houve redução no IVCM pelo mirceno e todas as concentrações dos tratamentos avaliados reduziram o IVCM. Para o isolado ISO2 todos os compostos químicos na maior concentração proporcionaram um menor IVCM. Para o tratamento dos frutos para apenas para o isolado menos agressivo, no ISO2, houve redução no tamanho da lesão dos frutos tratados com mirceno a partir das concentrações de 50%. Conclui-se que o Citral, o Mirceno e Citral + Mirceno possuem ação antifúngica *in vitro* aos isolados de *C. gloeosporioides* utilizados. O mirceno apresentou ação antifúngica nos frutos de maracujá amarelo apenas para o isolado menos agressivo.

**Palavras-chave:** Citral. Irceno.Patogenicidade. Pós-colheita.Tratamento de frutos.

## ABSTRACT

### CHAPTER 3 - ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CITRAL AND OF THE MYRCENE ON ISOLATED OF *Colletotrichum gloeosporioides*

The *Cymbopogon citratus* has medicinal properties and has been found antifungal action, including the control in vitro of *Colletotrichum gloeosporioides* as on passion fruit with anthracnose. But it is necessary to prove which of the chemical compounds present in this plant has inhibitory effect to the fungus. The objective of this research was to know, among the compounds Citral and myrcene, which one has antifungal action to *C. gloeosporioides*. For this purpose it was evaluated the action in vitro and treatment of fruits with these chemicals. In vitro evaluation, three treatments were used, Citral, Myrcene, and Citral + Myrcene in 5 different concentrations. The design was completely randomized in a 5 x 3 factorial on the speed rate of mycelial growth and in the spore production. The fruits were treated with the compound that showed the highest antifungal activity, as in vitro experiment. The method was used discs skin of fruit that had a wound in the center, where it was deposited at a rate of 10 $\mu$ L of the spore suspension, in the concentration 2 x 10<sup>7</sup> spores/mL. It was evaluated the final lesion size, taking into account the initial size of same. Both experiments were performed for both isolates: a more aggressive and another less aggressive, having a witness with fungicide. The fungicide completely inhibited the mycelial growth for both isolates in the vitro test. Comparing treatments with the chemical compounds, the interaction was not significant for both isolates. To C95 the isolated, a reduction in the SRMG by myrcene and all concentrations of the treatments reduced the SRMG. To ISO2 isolate all chemical compounds at the highest concentration gave a lower SRMG. For the treatment of fruit for the isolated only for less aggressive in ISO2, a reduction in size of the lesion treated fruits from myrcene concentration of 50%. It is concluded that citral, myrcene and the Citral + Myrcene possess antifungal action in vitro on isolated *C. gloeosporioides* used. The myrcene showed antifungal action in yellow passion fruits isolated only to the less aggressive.

**Keywords:** Citral. Myrcene. Pathogenicity. Post-harvest. Fruit treatment.

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das mais importantes doenças, presente em todas as regiões brasileiras produtoras de maracujazeiro, é a antracnose, causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Destaca-se como sendo um fator limitante à sua produção e à produtividade, por aumentar as perdas e reduzir a qualidade dos frutos, além de provocar danos na pós-colheita (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O uso de fungicidas é a medida de controle mais comumente empregada, mas, de acordo com Ghini e Kimati (2000), a utilização indiscriminada de produtos químicos pode gerar microrganismos resistentes e causar danos ao ambiente. Em pós-colheita, o controle da antracnose é pouco efetivo, pela dificuldade de obtenção de produtos certificados que possam ser aplicados.

O uso de extratos e de óleos essenciais de plantas tem se mostrado como grande potencial para o controle de fitodoenças. Solino *et al.* (2012) sustentam que o tratamento alternativo de frutos de maracujazeiro-amarelo pode ser realizado, utilizando-se defensivos naturais.

Por outro lado, a cultura do maracujazeiro amarelo possui uma grande importância para a região norte de Minas Gerais. Muitos agricultores familiares cultivam essa espécie para o consumo próprio ou para a venda, no principal mercado da região, CEANORTE de Montes Claros, ou para abastecer uma das maiores cooperativas de sucos naturais, a Cooperativa Agroextrativista Grande Sertão. Enfrentam, em seus pomares, uma baixa produtividade e qualidade dos frutos, em consequência da ocorrência da antracnose. Normalmente, não adotam nenhuma medida de manejo e o que fazem é abandonar os pomares após o ataque intenso das pragas e das doenças.

A possibilidade do emprego de produtos oriundos de plantas medicinais, especificamente do *C. citratus*, vem a ser de grande importância para esses agricultores, sendo uma técnica de menor custo, de menores consequências à saúde do homem, dos animais e menores danos ambientais quando se compara com o emprego dos agroquímicos.

O *C. citratus*, que é popularmente conhecido como capim-santo e capim-limão, pertence à família Poaceae; é uma planta perene, apresenta crescimento em touceiras com altura podendo ser superior a 1m (CASTRO; RAMOS, 2003). É uma planta medicinal muito utilizada popularmente como calmante natural. É originária da Ásia, sendo considerada subspontânea em países tropicais. O óleo essencial possui ação antimicrobiana (Aquino, 2011; SILVA *et al.*, 2009; SOUZA JUNIOR *et al.* (2009). Esses autores verificaram uma redução de 100% na germinação dos esporos e crescimento micelial de *C. gloeosporioides* quando se utilizou o óleo bruto ou diluído.

Aquino (2011), ao caracterizar a composição do óleo essencial de *C. citratus*, verificou que os compostos químicos de maior quantidade presente no mesmo são o Citral, sob forma de dois isômeros e o Mirceno. Nesse mesmo estudo, o controle *in vitro* e nos frutos de maracujazeiro amarelo proporcionado por esse óleo essencial foi efetivo até mesmo na menor concentração testada de 1,00µL/mL.

Apesar da comprovação da atividade antifúngica do óleo, há uma necessidade de se comprovar qual composto químico presente nessa planta tem efeito inibitório ao fungo.

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi saber dentre os compostos químicos Citral e Mirceno, que estão presentes no óleo essencial de *C. citratus*, qual(is) possui(em) ação antifúngica ao *C. gloeosporioides* e à antracnose do maracujazeiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Montes Claros.

### 2.1 Avaliação antifúngica *in vitro* dos compostos Citral e Mirceno

A ação dos compostos químicos do óleo essencial de *C. citratus* sobre o fungo *C. gloeosporioides* foi, por meio da determinação dos seus efeitos sobre o crescimento micelial e a esporulação, em experimento *in vitro*.

Os compostos químicos Citral e Mirceno foram adquiridos da Sigma Alderich®, com pureza de 95 e 90%, respectivamente. As concentrações utilizadas basearam-se na menor dosagem efetiva encontrada por Aquino (2011), bem como na em sua caracterização, quanto aos componentes, realizada por meio da análise cromatográfica. Foi avaliado a ação do Citral, do Mirceno e dos dois compostos juntos, em 5 concentrações, sendo utilizado o DIC, em esquema fatorial 5x3 (cinco concentrações e 3 combinações dos compostos), conforme TAB. 1. Utilizou-se, para o preparo dos tratamentos, uma solução estoque de 99mL de água destilada esterilizada e 1mL de Tween 80® (monoleato de sorbitano polioxietileno) a 1% (v/v).

TABELA 1

Tratamentos utilizados e respectivas concentrações avaliadas

PORCENTAGEM	CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )		
	CITRAL	MIRCENO	CITRAL + MIRCENO
0	0,00	0,00	0,00
25	0,20	0,04	0,20 citral + 0,04 mirceno
50	0,39	0,08	0,39 citral + 0,08 mirceno
75	0,59	0,11	0,59 citral + 0,11 mirceno
100	0,78	0,15	0,78 citral + 0,15 mirceno

Nota: Concentração de cada composto em microlitros por cada mililitro da solução estoque.

Fonte: Da autora.

Foram escolhidos para esses experimentos um isolado mais agressivo (C95) e um isolado menos agressivo (ISO2), conforme a caracterização realizada.

Após o preparo da solução dos compostos estoque e a adição dos tratamentos à mesma, adicionou-se, em cada placa de Petri estéril (9cm de diâmetro), 1mL da solução estoque mais 19mL de meio BDA fundente e com temperatura de 40°C. Utilizaram-se 4 repetições por tratamento, constituídas de uma placa de Petri, totalizando 60 parcelas para cada isolado avaliado. Avaliou-se ainda uma testemunha, com o fungicida Folicur 200 EC cujo ingrediente ativo é o tebuconazol, na concentração 100 $\mu\text{L}/100\text{mL}$  do meio de cultura (AGROFIT, 2012).

Transferiram-se discos de micélio da cultura pura dos isolados, com 5mm de diâmetro e sete dias de idade, para o centro de uma placa de Petri contendo o respectivo tratamento. Todo o procedimento citado foi realizado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Acondicionaram-se as

placas em incubadora do tipo BOD sob 25°C, fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

Para a avaliação *in vitro*, utilizaram-se como parâmetros o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a produção de esporos dos isolados.

Mediu-se, com um paquímetro, o diâmetro da colônia em dois eixos ortogonais, para o cálculo das médias diametricamente opostas e determinou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), utilizando-se a equação adaptada por Oliveira (1991), já descrita anteriormente.

A produção de esporos foi avaliada no décimo dia, por meio da determinação do número médio de esporos por mm<sup>2</sup> da colônia. Para isso, foram retirados de cada três discos (6mm de diâmetro) da colônia crescida em cada placa e colocados em tubo de ensaio estéreis, com 10mL de água destilada autoclavada. Agitaram-se, posteriormente, os tubos para a liberação dos esporos e procedeu-se à contagem, utilizando-se a Câmara de Neubauer (ALFENAS; MAFFIA, 2007). Calculou-se o número de esporos por mm<sup>2</sup> da colônia e, após análise de normalidade e homogeneidade das variâncias, transformou-se em logaritmo na base 10.

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de homogeneidade e normalidade, para posterior análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Saeg.

## **2.2 Avaliação em tecido vegetal**

A ação dos compostos químicos do óleo essencial de *C. citratus* sobre a antracnose foi determinada pela avaliação do tratamento curativo sobre o desenvolvimento da doença em frutos de maracujazeiro amarelo, pelo método de discos de frutos e conforme descrito no item 2.3 do Capítulo 2.

Após o aparecimento dos sintomas, que ocorreu no segundo dia após a inoculação, realizou-se a aplicação de 50µL da solução estoque contendo o tratamento com o composto químico que apresentou maior potencial

antifúngico no teste in vitro. As concentrações avaliadas foram as mesmas utilizadas no experimento anterior e para o fungicida foi 100 $\mu$ L/mL de água destilada esterilizada.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, sendo 5 concentrações do composto químico que aparentemente possuía maior efeito fungicida e a testemunha, com o fungicida Folicur 300 EC (TAB. 1). Utilizaram-se 4 repetições e ainda foram avaliados sobre dois isolados: um mais agressivo, o isolado C95, e um menos agressivo, o isolado ISO2, conforme o item anterior.

Avaliou-se o tamanho final da lesão de cada disco do fruto, levando-se em consideração o tamanho inicial da mesma.

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de normalidade e homogeneidade, para posterior análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Realizou-se, também, a análise de regressão, quando as variáveis foram quantitativas, utilizando-se o programa Saeg.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação antifúngica *in vitro* dos compostos Citral e Mirceno

O fungicida inibiu completamente o crescimento micelial de ambos isolados avaliados, corroborando com Tavares e Souza (2005), que observaram inibição total do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado do mamoeiro em concentrações acima de 10ppm de Folicur, a mesma concentração testada nesta pesquisa. Esses autores relataram, ainda, que quando se diminuiu a dose para 1ppm, a inibição caiu para 86%.

Comparando-se os dados dos compostos químicos com a concentração zero (sem composto) e desconsiderando-se o fungicida, houve diferença significativa entre os tratamentos testados sobre o isolado C95. A interação composto químico versus concentração não foi significativa. Independente da concentração testada, o mirceno apresentou a maior redução no crescimento micelial do patógeno (TAB. 2).

TABELA 2

Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) do isolado C95 de *C. gloeosporioides*, em função dos compostos Citral, Mirceno e Citral em conjunto com Mirceno nas condições avaliadas

COMPOSTO	IVCM	
Citral	10,7364	C
Mirceno	9,3293	A
Citral + Mirceno	10,1191	B
CV (%)	7,442	

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

Divergindo de Marques *et al.* (2003), que observaram inibição em 100% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* do mamoeiro tratados

com citral na concentração 60%(v/v), deve-se levar em consideração que a concentração utilizada por esses autores foi bem maior do que a utilizada nesta pesquisa, podendo ser esse o fator que possa explicar essa divergência.

Quanto à variável concentração, independente do composto testado, todas reduziram o crescimento micelial do fungo (TAB. 3).

TABELA 3

Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) do isolado C95 de *C. gloeosporioides*, em função das concentrações dos tratamentos

CONCENTRAÇÃO	IVCM	
0%	11,1884	B
25%	9,8732	A
50%	9,7829	A
75%	9,7438	A
100%	9,7196	A
CV (%)	7,442	

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

Os dados de literatura comprovam apenas ação do óleo essencial do *C. citratus*, inibindo em até 100% o crescimento micelial do *C. gloeosporioides* (AQUINO, 2011; ROZWALKA *et al.*, 2008), porém poucos são os relatos na literatura sobre a avaliação da ação de componentes químicos de óleos essenciais sobre fungos e demais microrganismos.

SEIXAS *et al.*, (2011) observaram uma redução de 90 para 27,52% do crescimento micelial de *Fusarium subglutinans*, utilizando 25µL de citronelal, que é um composto químico presente no óleo de *Cymbopogon nardus*, ao comparar com a testemunha sem tratamento. Esses autores não avaliaram nenhum fungicida, assim como nesta pesquisa, em que foi verificada uma redução do IVCM de *C. gloeosporioides*, mas essa redução é inferior à

verificada pelos autores, fato esse que poderia ser explicado devido às concentrações utilizadas por eles serem superiores.

Rozwalka *et al.* (2008), utilizando o *C. citratus*, observaram a inibição em 100% do crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, mas a concentração testada foi relativamente alta, sendo depositadas três alíquotas de 10µL do óleo em cada placa, no mesmo estudo os autores avaliaram decoctos, um hidrolado do óleo essencial, sendo que esse não influenciou o crescimento micelial do fungo. Esses autores não utilizaram testemunha com fungicida para comparação. Na presente pesquisa, o fungicida foi o único tratamento que inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo. Deve-se ressaltar que a quantidade de ingrediente ativo do fungicida testado foi bem maior do que os tratamentos com os compostos químicos do óleo.

Para o isolado ISO2, a interação concentração versus composto químico foi significativa (TAB. 4). O tratamento com o citral, ou o citral mais mirceno não foram capazes de reduzir o IVCM do fungo, nem mesmo na concentração 100%, iguais às testemunhas. Já para o mirceno, todas as concentrações testadas reduziram o IVCM. As mais eficientes foram 75% e 100%.

TABELA 4

Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) do isolado ISO2 de *C. gloeosporioides*, em função das concentrações e dos compostos Citral, Mirceno e Citral em conjunto com Mirceno

CONCENTRAÇÃO	CITRAL		MIRCENO		CITRAL + MIRCENO	
0%	5,70	Ab	7,03	Dc	5,48	Aa
25%	6,31	Bc	6,03	Cb	5,54	Ba
50%	7,01	Cc	5,29	Ba	5,48	Ab
75%	7,34	Cc	4,68	Aa	5,42	Ab
100%	5,48	Aa	4,92	Aa	5,46	Aa
CV (%)	7,363					

Nota: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

Linde *et al.* (2010) verificaram a inibição completa do crescimento micelial de todos os patógenos isolados de diversas culturas, dentre eles *C. gloeosporioides*, isolado da manga com Citral, na concentração de 3000µL/L, superior às concentrações testadas na presente pesquisa.

Palhano *et al.* (2004) observaram maior ação fungistática do óleo essencial de *C. citratus* sobre o *C. gloeosporioides*, do que do Citral isoladamente, sugerindo haver sinergismo entre alguns dos componentes constituintes desse óleo. Tais resultados podem corroborar a explicação do porquê da baixa ou da não eficiência do Citral na presente pesquisa. Além disso, já foram comprovados anteriormente a ação do óleo essencial dessa planta sobre o patógeno causador da antracnose no maracujazeiro (AQUINO, 2011; SILVA *et al.*, 2009; SOUZA JUNIOR *et al.*, 2009).

Quanto à produção de esporos, comparando-se os dados dos compostos químicos com a concentração zero (sem composto) e desconsiderando-se o fungicida, houve diferença significativa entre os compostos e entre as concentrações. A interação composto químico versus concentração não foi significativa.

Independente da concentração testada, os tratamentos com o mirceno e citral mais mirceno foram os mais eficientes na inibição da esporulação (TAB. 5).

TABELA 5

Densidade de esporos (esporos/mm<sup>2</sup>) do isolado C95 de *C. gloeosporioides* submetido aos compostos Citral, Mirceno e Citral combinado com Mirceno

COMPOSTO	PRODUÇÃO DE ESPOROS	
Citral	19,12 x 10 <sup>5</sup>	B
Mirceno	5,267 x 10 <sup>5</sup>	A
Citral + Mirceno	4,482 x 10 <sup>5</sup>	A
CV (%)	57,11	

Nota: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

Independente do composto testado, as concentrações de 75 e 100% inibiram a esporulação desse isolado. As concentrações de 25 e 50% foram ineficientes (TAB. 6).

TABELA 6

Densidade de esporos (esporos/mm<sup>2</sup>) do isolado C95 de *C. gloeosporioides* submetido às diferentes concentrações dos tratamentos

CONCENTRAÇÃO	PRODUÇÃO DE ESPOROS	
0%	5,818 x 10 <sup>5</sup>	B
25%	6,921 x 10 <sup>5</sup>	C
50%	6,979 x 10 <sup>5</sup>	C
75%	4,715 x 10 <sup>5</sup>	A
100%	4,441 x 10 <sup>5</sup>	A
CV (%)	57,11	

Nota: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

O isolado ISO2 produziu poucos esporos e, por isso, não atendeu aos pressupostos da análise de variância, mesmo após a transformação, não sendo realizada, portanto, análise estatística desse parâmetro para esse isolado.

### 3.2 Avaliação em tecido vegetal

Quando os frutos foram inoculados com o isolado C95 (mais agressivo) e tratados com mirceno em diferentes concentrações, não houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Quando os frutos foram inoculados com o isolado ISO2 (menos agressivo) e tratados com o mirceno em diferentes concentrações, houve diferença significativa entre os tratamentos testados ao nível de 5% de probabilidade, mesmo comparando-se com o tratamento fungicida (TAB. 7). A partir da concentração 50%, o composto foi capaz de reduzir o tamanho das lesões. O tratamento fungicida não teve ação no controle da doença.

TABELA 7

Tamanho final da lesão (mm) nas cascas dos frutos de maracujá provocados pelo isolado ISO2 e tratadas com o composto químico Mirceno e com o fungicida Folicur na dosagem recomendada

TRATAMENTO MIRCENO	TAMANHO LESÃO	
FUNGICIDA	5,53	B
0%	5,81	B
25%	4,68	B
50%	3,10	A
75%	2,99	A
100%	2,40	A
CV (%)	24,763	

Nota: As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora.

Em relação ao isolado ISO2, os resultados desta pesquisa divergem do que sugerem Aiensaard *et al.* (2011), em que os autores admitem que o Citral possui ação antimicrobiana e o Mirceno não possui tal ação, sendo capaz apenas de inibir microrganismos quando combinado com outro composto. Mas ao se levar em consideração a agressividade dos isolados avaliados, o mirceno não foi capaz de reduzir a lesão na superfície dos frutos quando os mesmos foram inoculados com o isolado mais agressivo.

Nos frutos inoculados com o isolado ISO2, há uma tendência linear de redução do tamanho da lesão, à medida em que se aumenta a concentração (GRAF. 1).

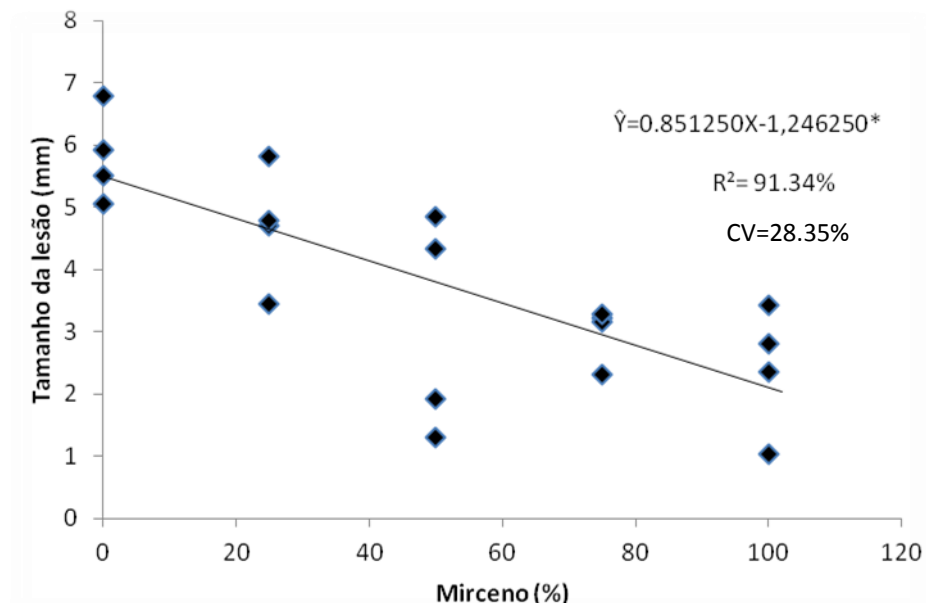


GRÁFICO 1- Tamanho final da lesão (mm) nas cascas dos frutos de maracujá provocadas pelo isolado ISO2 e tratadas com o composto químico Mirceno.

FONTE: Da autora.

O fato de não existir um fungicida registrado para o tratamento dos frutos de maracujazeiro, sendo o fungicida Folicur registrado apenas para a aplicação foliar, os resultados desta pesquisa podem direcionar novos estudos, visando à obtenção de um produto com potencialidades de controle da doença e que possa ser aplicado nos frutos até mesmo na pós-colheita. São raros os trabalhos que avaliam o controle de óleos essenciais ou compostos químicos de óleos essenciais sobre fitodoenças. A maioria dos trabalhos se restringe à avaliação *in vitro* do agente fitopatogênico.

Os resultados desta pesquisa não condizem com Aquino (2011), quando, ao analisar a ação de óleos essenciais sobre *C. gloeosporioides*, observou uma redução do tamanho da lesão, proporcionada pelo óleo essencial de *C. citratus* em concentrações superiores a 6 $\mu$ L/mL, podendo esse fato estar relacionado à concentração avaliada ou com o isolado

utilizado, que poderia ser menos agressivo que o isolado C95, que foi utilizado na presente pesquisa.

## 4 CONCLUSÃO

O composto químico mirceno apresentou ação antifúngica ao *C. gloeosporioides in vitro*, para ambos os isolados avaliados.

Quanto à esporulação, o mirceno e o mirceno mais citral foram os tratamentos que mais inibiram a esporulação, independente da concentração avaliada.

Para o tratamento no tecido vegetal dos frutos, o mirceno foi efetivo apenas para o isolado menos agressivo, o ISO2, a partir da concentração de 50%.

Para o isolado ISO2, os tratamentos mais eficientes na redução do IVCM foram Mirceno, nas concentrações 75 e 100%.

O fungicida avaliado promoveu ação de controle sobre o *C. gloeosporioides in vitro*, mas foi ineficiente no tratamento dos frutos inoculados com o isolado ISO2.

Há necessidade de avaliar os demais compostos do óleo essencial de *C. citratus* sobre a antracnose do maracujazeiro, bem como o efeito do óleo e os seus compostos sobre a qualidade dos frutos.

## REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam, NL: Elsevier Academic, 2005.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 01 dez. 2012.

AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, NL, v. 91, n. 3, p. 31-37, 2011.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV. 2007. 382p.

ALMEIDA, P. N. M. **População microbiana ruminal e atividade celulolítica de fungos provenientes de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens**. 2009. 96 f. (Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, MG. 2009.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo, SP: Agronomica Ceres, 2011. v. 1 Princípios e conceitos, p. 543-589.

AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A. Fenologia, patometria e quantificação de danos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo, SP: Agronomica Ceres, 2011. v. 1 Princípios e conceitos, p. 517-540.

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**, Brasília, DF. v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

AQUINO, C. F. **Ação de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) do maracujazeiro-amarelo.** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, MG, 2011.

ARAÚJO, R. C. Z.; CHALFOUN, S. M.; ANGÉLICO, C. L.; ARAÚJO, J. B. S.; PEREIRA, M. C. Avaliação *in vitro* da atividade fungitóxica de extratos de condimentos na inibição de fungos isolados de pães artesanais. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, MG. v. 33, n. 2, p. 545-551, 2009.

BARRERA-NECHA, L. L.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; ESTUDILHO, A. R. Efficacy of essential oils on the conidial germination growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in Papaya (Carioca papaya L.). **Plant Pathology Journal**, Pakistan, v. 7, n. 2, p. 174-178, 2008.

BENATO, E. A.; SIGRIST, J. M. M.; SOUZA, N. L.; CIA, P. Efeito do tratamento hidrotérmico no controle de podridões pós-colheita em maracujá amarelo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 27, n. 4, p. 399-403, 2001.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP, 2003. p.13-50.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; SILVA, M. R. L.; ROMANO, E. B.; BORSATO, L. C.; MARIANOWSKI, T.; GOMES, J. C. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. em *Carthamus tinctorius* L. no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 38, n. 2, p. 163-165, 2012.

CARVALHO-OKANO, R. M.; VIEIRA, M. F. Morfologia externa e taxionomia. In: BUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001, p. 33-49.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; CHALFUN, N. N. J.; MOURA, P. H. A. Alternativas de controle pós-colheita da podridão-parda e podridão-mole em frutos de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP. v. 31, n. 1, p. 78-83, 2009.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 31 p..

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras, MG: UFLA, 2005. p. 512-524.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, NL, v. 33, n. 2, p. 344-349, Mar. 2011.

COUTO, E. F.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 28, n. 3, 2002, p. 260-266, 2002.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, DF. v. 29, n. 4, p. 406-412, 2004.

DAN, Y.; LIU, H.; GAO, W.; CHEN, S. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. **Crop Protection**, Guildford, Inglaterra, GB, v. 29, n. 3, p. 295-299, 2010.

DENOYES-ROTHAN, B.; GUERIN, G.; DELYE, C.; SMITH, B.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* from strawberry. **Phytopathology**. St. Paul, Minn., US, v. 93, n. 2, p. 219-228, 2003.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, p.187-209.

FISCHER, I. H.; ALVES, S. A. M.; ALMEIDA, A. M.; ARRUDA, M. C.; BERTANI, R. M. A.; GARCIA, M. J. M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose em frutos de maracujá amarelo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 25, n. 3, p. 226-228, jul./set. 2009.

FISCHER, I. H.; ARRUDA, M. C.; ALMEIDA, A. M., GARCIA, M. J. M.; JERONIMO, E. M. PINOTTI, R. N.; BERTANI, R. M. A. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 254-259, 2007.

FRANCISCO NETO, E.; NAKAMURA, K.; OLIVEIRA, J. C. Influência de alguns fatores na germinação de conídios, no crescimento micelial e na esporulação de alguns isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de *Passiflora*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, SP, v. 20, n. 2, p. 96-100, 1994.

FREEMAN, S.; SHALEV, Z.; KATAN, T. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease**. St. Paul, Minn. US, v. 86, n. 9, p. 965-970, 2002.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal**: culturas temporárias e permanentes. 2010. Disponível em:

<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010\\_Publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf)>. Acesso em: 15 ago 2010.

JUNQUEIRA, N. T. V.; NAZARENO DOS ANJOS, J. R.; SILVA, A. P. O.; CHAVES, R. C.; GOMES, A. C. Reação à doenças e produtividade de onze cultivares de maracujazeiro-azedo cultivados sem agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 8, p. 1005-1010, 2003.

JUNQUEIRA, N. T. V.; CHAVES, R. C.; NASCIMENTO, A. C.; RAMOS, V. H. V.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, L. P. Efeito do óleo de soja no controle da antracnose e na conservação da manga Cv. Palmer em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 3, p. 222-225, 2004.

JOHNSTON, P.R.; JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycological**, New York, US, v. 89, n. 3, p. 420-430, 1997.

LIBERATO, J. R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, E. (Ed.) **Controle de doenças de plantas frutíferas**. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 2, p. 699-763..

LINDE, J. H.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. J. C.; VIRIJEVIC, S. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, Pretoria, Africa do Sul, v. 76, n. 1, p. 37-42, Jan. 2010.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D. J.; SANTOS, A. F.; VIDA, J. B. Caracterização morfo-fisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 32, n. 2, p. 113-117, 2006.

MARQUES, S. S.; SANTOS, M. P.; ALVES, E. S. S.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Uso de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos do mamoeiro. In: MARTINS, D. dos S. (Ed.) **Papaya Brasil**: qualidade do mamão para o mercado interno. Vitória, ES: Incaper, 2003. p. 591-593.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; BARRIO, E.; GARACIA, M. D.; QUEROL, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 189, n. 1, p. 97-101, Aug. 2000.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; EVANGELISTA, D. J. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2002, 220 p.

MARTINS, I.; MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; PÁDUA, R. R.; PEIOTO, J. R. **Produção de *Colletotrichum gloeosporioides* em meios líquidos**. Brasília, DF: Embrapa, 2005. 6 p. (Circular técnica, 45)

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; BEDENDO, I. P. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures, and light regimes. **Scientia Agricola**. Piracicaba, SP. v. 61, n. 5, p. 542-554, 2004.

MENEZES, M. Biological and taxonomic aspects of *Colletotrichum* species. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, n. 27: p. 23-24, 2002.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 4, p. 429-432, 2004.

NUNES, A. M. L.; DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, L. S. Doenças do maracujazeiro. In: DUARTE, M. L. R. (Ed.) **Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro: fruteiras nativas e exóticas**. Brasília, DF: Embrapa, 2003. p. 196-198.

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

OLIVEIRA, J. T. M.; ONALDO, S. M.; TRENTO, R. A. Desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. isolado de teca em diferentes meios de cultura. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, GO. v. 7, n. 13, p. 1329-1334, 2011..

PALHANO, F. L.; VILCHES, T.; SANTOS, R. B.; ORLANDO, M. T. D.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 95, n. 1, p. 61-66, 2004.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: Arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo, SP: Agronomica Ceres, 1995. v. 1 Princípios e conceitos, p. 343-364, 1997.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo, SP: Agronomica Ceres, 2011. v. 1 Princípios e conceitos, p. 543-589.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2009.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, L. R. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.(Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo, SP: Agronomica Ceres, 1997. v. 2: Doenças das plantas cultivadas, p. 495-496.

PIRES, A. A.; MONNERAT, P. H.; MARCIANO, C. R.; PINHO, L. G. R.; ZAMPIROLI, P. D.; ROSA, R. C. C.; MUNIZ, R. A. Efeito da adubação alternativa do maracujazeiro-amarelo nas características químicas e físicas do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, n. 5, p.1997-2005. 2008.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MAY DE MIO, L. L.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**. Santa Maria, RS, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SEIXAS, P. T. L.; CASTRO, H. C.; SANTOS, G. R.; CARDOSO, D. P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP. v. 13, n.esp., p. 523-526, 2011.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 34, n. 2, p. 113-120, 2008.

SILVA, M. R. L.; MENEGUIM, L.; GONÇALVES, J. S.; PISTORI, J. F.; LEITE, R. P. Caracterização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro no Estado do Paraná. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 4., 2005, Londrina, PR. **Anais eletrônicos**. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2005. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1385>> Acesso em: 15 ago 2010.

SILVA, A. C. SALES, N. L. P.; ARAÚJO, A. V.; CALDEIRA JUNIOR, C. F. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, MG, v. 33, n. esp., p. 1853-1860. 2009.

SOLINO, A. J. S.; ARAÚJO NETO, S. E.; SILVA, A. N.; RIBEIRO, A. M. S. Severidade da antracnose e qualidade de frutos de maracujá-amarelo tratados com produtos naturais em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 34, n. 1, p. 57-66, 2012.

SOUZA JUNIOR, I.T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, Florianópolis, SC, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

SUSSEL, A. A. B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose em cucurbitáceas**. 2005, 68 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2005.

TAVARES, G. M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita**. 2004. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.