



MARIA GILMARA DE OLIVEIRA SOARES

**PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION, INFECTIOUS
PROCESS AND ALTERNATIVE CONTROL OF *Colletotrichum*
IN AVOCADO**

**LAVRAS – MG
2019**

MARIA GILMARA DE OLIVEIRA SOARES

**PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION, INFECTIOUS PROCESS AND
ALTERNATIVE CONTROL OF *Colletotrichum* IN AVOCADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Soares, Maria Gilmara de Oliveira.

Phylogenetic characterization, infectious process and
alternative control of *Colletotrichum* in avocado / Maria Gilmara
de Oliveira Soares. - 2019.

99 p.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Coorientador(a): Sarah da Silva Costa Guimarães

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Persea americana* Mill. 2. Antracnose. 3. Filogenia
multilocus. I. Alves, Eduardo. II. Guimarães, Sarah da Silva Costa.
III. Título.

MARIA GILMARA DE OLIVEIRA SOARES

**PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION, INFECTIOUS PROCESS AND
ALTERNATIVE CONTROL OF *Colletotrichum* IN AVOCADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de abril de 2019.

Dr. Ângelo Albérico Alvarenga	EPAMIG
Dr. Hudson Teixeira	EPAMIG
Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Prof. Dr. Pedro Maranha Peche	UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

À meu esposo querido Aurivan, pelo companheirismo, paciência e incentivo.

Aos meus estimados pais, Maria Solange e Geraldo.

Aos meus queridos irmãos, Geórgia e Jaires.

Aos meus sobrinhos Izabella, João Vitor, Larissa, Ryan, Rakelly e Samuel

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador de todas as coisas pelas bênçãos concedidas em minha vida, e a força me dada a cada dia para vencer os obstáculos.

À Universidade Federal de Campina Grande pela formação em Agronomia.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela estrutura e a oportunidade de realização do mestrado e do doutorado.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Eduardo Alves, pelos ensinamentos e orientação no mestrado e no doutorado.

À Doutora Sarah da Silva Costa Guimarães, pela coorientação, amizade, e valiosas contribuições durante a realização deste trabalho.

À todos os professores do Departamento de Fitopatologia-DFP/UFLA, por cada ensinamento transmitido.

Aos laboratórios de Bacteriologia, Virologia, Sistemática e Ecologia de Fungos e Fisiologia Molecular de Plantas pelo suporte e disponibilização de estrutura e materiais para a realização deste trabalho.

Ao núcleo de estudos em Fitopatologia (Nefit) pelo apoio durante os congressos e pelos os valiosos eventos organizados.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pelas correções e sugestões.

A todos os alunos do DFP, especialmente, os amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) pela amizade e convivência.

A todos os funcionários da UFLA pelos serviços prestados, e em especial Ana Maria, Edinho, Luiza e Ariane.

As técnicas Aline Ferreira e Elisa por todo auxílio, amizade e competência.

As colegas Amanda e Aline Vieira pela convivência, auxílio nos experimentos e cada momento feliz, que ficarão registrados para sempre na minha memória.

Aos amigos Adriano Dorigan e Silvino Intra pela assistência durante a condução do quarto experimento.

Aos meus queridos e amáveis pais Maria Solange e Geraldo pela confiança, amor e dedicação.

Aos meus irmãos Geórgia e Jaires, pela compreensão e amizade.

Ao meu companheiro amado, Aurivan Soares, por estar sempre ao meu lado me proporcionando momentos felizes, pela amizade, sinceridade e fidelidade.

Aos meus sogros Maria Lúcia e Wilson, pela confiança, apoio e carinho.

Aos meus primos irmãos do coração Andréia e Romário, pelo carinho e fiel amizade.

Aos demais membros da família, avós, tios e primos pelo apoio e carinho.

A todos que, de certa forma, contribuíram para a realização de mais esta etapa tão sonhada.

Muito obrigada!

“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho”.

(Clarice Lispector)

RESUMO GERAL

A antracnose causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, está entre os principais fatores limitantes da produção mundial de abacates. Entretanto, informações disponíveis sobre o agente etiológico, juntamente com o conhecimento do processo infeccioso e a influência de películas de amido na inibição da doença, poderiam auxiliar nas estratégias de manejo e redução na perda de frutos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose em abacate, estudar o processo infeccioso de *Colletotrichum bredae* sp. nov. e avaliar o efeito de diferentes concentrações de películas à base de amido no controle da antracnose em abacate. No primeiro estudo, isolados de *Colletotrichum* foram caracterizados por marcadores morfológicos, análises filogenéticas dos genes *gapdh*, *act*, *tub2* e *ApMat* e teste de patogenicidade. Foram identificadas três espécies previamente descritas *C. karstii*, *C. dianesei*, *C. communis* e uma nova espécie descrita e ilustrada como *C. bredae* sp. nov. Os caracteres morfológicos não foram informativos o suficiente para delimitação das espécies. Todas as espécies incitaram sintomas de antracnose nos frutos de abacateiro. No segundo estudo, amostras de abacates inoculados foram coletadas nos períodos de 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas após a inoculação (hai). A germinação de conídios ocorreu entre 6 e 12 hai. A penetração ocorreu por meio de ferimentos realizados durante a inoculação, 48 hai. A estratégia de colonização de *C. bredae* sp. nov. foi hemibiotrófica intracelular às 144-240 hai. A esporulação ocorreu 240 hai por meio do surgimento de acérvulos e formação de conidióforos que produziram massas de conídios. No terceiro estudo, frutos de abacateiro foram tratados com fécula de mandioca e amido de milho, nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% individuais e combinadas nos métodos curativo e preventivo. Avaliou-se área média lesionada, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e peso fresco dos frutos, além de verificar a ação das películas nos frutos utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). No método curativo, houve inibição da área média lesionada e AACPD nos frutos tratados com películas individuais de fécula de mandioca 1 e 4%, amido de milho 1%, e com as combinações fécula + amido de milho a 2, 3 e 4%. No método preventivo, os frutos tratados com amido de mandioca e milho 2% individual e com as combinações fécula + amido de milho a 2 e 3% proporcionaram menor AACPD e área média lesionada. Nestes tratamentos também foram verificadas menores perdas de pesos nos frutos. Imagens em MEV revelaram inibição da germinação de conídios de *C. bredae* sp. nov. e a formação de uma camada protetora na superfície dos frutos, que retardou o amadurecimento dos frutos, impediu a penetração do patógeno e levou a deformação de hifas.

Palavras-chave: *Persea americana* Mill. Antracnose. Filogenia multilocus. Microscopia eletrônica de varredura. Pós-colheita.

GENERAL ABSTRACT

The anthracnose caused by species of the genus *Colletotrichum*, is among the main limiting factors of the world avocado production. However, available information on the etiological agent, together with the knowledge of the infectious process and the influence of starch films on the inhibition of the disease, could help in the management strategies and reduction in fruit loss. Therefore, the objective of this study was to evaluate the diversity of *Colletotrichum* species associated with avocado anthracnose, study the infectious process of *Colletotrichum bredae* sp. nov. and evaluate the effect of different starch-based films concentrations on avocado anthracnose control. In the first study, *Colletotrichum* isolates were characterized by morphological markers, phylogenetic analyses of the genes *gapdh*, *act*, *tub2* and *ApMat* and pathogenicity tests. Three species previously described *C. karstii*, *C. dianesei*, *C. communis* were identified, and a new specie described and illustrated as *C. bredae* sp. nov. Morphological characters were not informative enough to delimit the species. All species incited anthracnose symptoms in the avocado fruits. In the second study, samples of inoculated avocados were collected for periods of 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 240 hours after inoculation (hai). The conidia germination occurred between 6 and 12 hai. Penetration occurred by wounding during inoculation, 48 hai. The colonization strategy of *C. bredae* sp. nov. was intracellular hemibiotrophic at 144-240 hai. Sporulation occurred 240 hai through the emergence of acervuli and formation of conidiophores that produced conidial masses. In the third study, avocado fruits were treated with cassava starch and corn starch films at individual concentrations of 1, 2, 3 and 4% and combined in the curative and preventive methods. Mean area injured was assessed; the area under the disease progress curve (AUDPC) and the fruit fresh weight were evaluated, as well as to verify the action of the films on the fruits using Scanning Electron Microscopy (SEM). In the curative method, there was an inhibition of the mean area injured and AUDPC in the fruits treated with 1% and 4% cassava starch films, 1% corn starch, and with the cassava starch + corn starch combinations at 2, 3 and 4%. In the preventive method, the fruits treated with cassava starch and 2% individual corn starch and with cassava starch + corn starch combinations 2 and 3% provided lower AUDPC and mean area injured. In these treatments were also verified smaller weight losses in the fruits. SEM images revealed inhibition of conidia germination of *C. bredae* sp. nov. and the formation of a protective layer on the fruit surface, which delayed the ripening of the fruits, prevented the penetration of the pathogen and led to deformation of hyphae.

Keywords: *Persea americana* Mill. Anthracnose. Multilocus phylogeny. Scanning electron microscopy. Post-harvest.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Características da cultura	13
2.2	Etiologia e epidemiologia da antracnose do abacate	14
2.3	O gênero <i>Colletotrichum</i>	16
2.4	Métodos para identificação de espécies de <i>Colletotrichum</i>.....	18
2.5	Patogenicidade em espécies de <i>Colletotrichum</i>	19
2.6	Processo infeccioso de <i>Colletotrichum</i>	20
2.7	Controle da doença	22
	REFERÊNCIAS.....	25
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	32
	ARTIGO 1 - <i>Colletotrichum bredae</i> sp. nov. causal agent of anthracnose in avocado in Brazil.....	32
	ARTIGO 2 - Processo infeccioso de <i>Colletotrichum bredae</i> sp nov. em abacate por meio de microscopia eletrônica de varredura	60
	ARTIGO 3 - Controle pós-colheita de antracnose em abacate com películas de fécula de mandioca e amido de milho	76

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O abacateiro (*Persea americana* Mill.) se destaca como uma importante cultura a nível mundial (SHARMA; MAYMON; FREEMAN, 2017). Em 2017, o México foi o maior produtor mundial com 2.029.886 toneladas (FAO, 2019). Neste mesmo ano, o Brasil produziu 213.041 toneladas (FAO, 2019), sendo São Paulo o maior produtor com quase 122 mil toneladas em 2017 (ANUÁRIO DE FRUTICULTURA, 2018; IBGE, 2019). A produção de abacate ocorre em regiões que apresentam condições favoráveis ao plantio, principalmente nas de climas tropical e subtropical do mundo todo (SHARMA; MAYMON; FREEMAN, 2017).

O rendimento produtivo da cultura é afetado por doenças pós-colheita, sendo a antracnose a principal e a mais significativa delas nos países produtores, levando a perdas consideráveis (PEGG et al., 2002). Os sintomas são observados em folhas, ramos, flores e frutos. Nos frutos, os sintomas iniciam-se com pequenas lesões circulares castanhas claras a marrom, que aumentam de tamanho tornando pretas a escuras (PERKINS; JOYCE; COATES, 2019).

No Brasil, até o momento o agente causal da antracnose em abacate é relatado apenas como pertencente ao complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, porém, em países como México, os complexos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum boninense* já foram relatados em associação a esta doença (SILVA-ROJAS E AVILA-QUEZADA, 2011).

A identificação da maioria dos fungos filamentosos é tradicionalmente baseada, em características morfológicas, porém não é possível diferenciar espécies do gênero *Colletotrichum* apenas com base nestes caracteres (CANNON et al., 2012). Análises filogenéticas têm sido úteis na discriminação de espécies do gênero *Colletotrichum*, pois permitem verificar a existência de complexo de espécies e a viabilidade em estudos taxonômicos de fungos (CHOI et al., 2011). Weir, Johnston e Damm (2012) evidenciaram que estudos filogenéticos baseados em *multilocus* são necessários para delimitar espécies do complexo *C. gloeosporioides*. Entre as regiões mais utilizadas cita-se actina (*act*), β - tubulina (*tub2*), glutamina sintase (*gs*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), calmodulina (*cal*), chalcona sintase (*chs-1*), ADN-liase (*apn2*), fator de alongação 1- α (*EF-1 α*), região intergênica de genes *apn2* e *MAT1-2-1* (*ApMat*) (PRIHASTUTI et al., 2009; PHOULIVONG et al., 2010; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; LIMA et al., 2013; SHARMA et al., 2013).

A compreensão do processo infeccioso de *Colletotrichum* em abacate, bem como a constatação do momento da ocorrência dos eventos, poderão auxiliar nas estratégias de controle da doença. Em alguns estudos foi detectado que a germinação é variável (PICCININ et al., 2016; BAILEY E JEGER, 1992). De acordo com Coates et al. (1993), conídios de *C. gloeosporioides sensu lato* em frutos de abacateiro germinaram em 48 horas após a inoculação (hai). Já Prusky, Plumbley e Kobilier (1991), verificaram que a germinação ocorreu antes de 16 hai, e a penetração foi diretamente pela cutícula nas células epidérmicas 72 hai. Entretanto, informações sobre colonização e esporulação de *Colletotrichum* em abacate são ainda escassas. Há apenas um estudo, no qual foi relatada a colonização em abacate subcuticular e intracelular (COATES et al., 1993).

O controle da doença vem sendo realizado por meio de duas a três aplicações de fungicidas entre o florescimento e a frutificação (FISCHER et al., 2011; PICCININ et al., 2016). Porém, no Brasil, existem poucos fungicidas registrados para o abacateiro. A maioria deles é inorgânicos e possuem como ingredientes ativos oxiclureto de cobre, óxido cuproso, hidróxido de cobre ou enxofre. Além destes, utiliza-se thiabendazol, difenoconazol e mancozeb (BRASIL, 2019).

Por outro lado, o controle alternativo utilizando produtos naturais à base de polissacarídeos se destaca como forma viável no controle de doenças pós-colheita, pois reduz a aplicação de moléculas químicas. Estudos já comprovaram a ação de películas à base de amido como fonte promissora de controle de doenças pós-colheita em diversas frutíferas como manga, mamão, goiaba e banana (MAQBOOL et al., 2011; OLIVEIRA; CRUZ; ALVES, 2016; ORIANI et al., 2014; SANTOS et al., 2011; SERPA et al., 2014; SOARES, 2016).

Diante dos fatos abordados, os objetivos deste trabalho foram caracterizar, por meio de análises filogenéticas, isolados de *Colletotrichum* obtidos a partir de frutos de abacateiro, coletados em várias regiões do Brasil, estudar o processo infeccioso de *C. breidae* sp. nov. e avaliar o efeito de películas à base de fécula de mandioca e amido de milho no controle da antracnose em abacate.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características da cultura

O abacateiro (*Persea americana* Mill.) é uma planta dicotiledônea que pertence à ordem Laurales, Família Lauraceae e gênero *Persea*. A planta possui porte arbóreo que alcança altura de 8 a 18 metros e diâmetro do tronco variando entre 30 a 60 cm, com copa variável, às vezes, compacta e arredondada em algumas variedades (ABRAHAM; ABRAHAM; TAKRAMA, 2018; MALERBO-SOUZA et al., 2000). O abacate é originário da América Central e tem como principais centros de diversidades, México e Guatemala (FRANCISCO E BAPTISTELL, 2005; TREMOCOLDI et al., 2018). De acordo com Francisco e Baptistella (2005), o abacateiro é representado por três raças: mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), antilhana (*P. americana* var. *americana*) e guatemalense (*P. nubigena* var. *guatemalensis*).

Segundo Rocha (2016), a produção de abacate tem se expandido rapidamente nos últimos anos. Este crescimento pode estar relacionado a vários fatores, dentre estes, extensas áreas com clima favorável, avanços de tecnologias pós-colheita, reduções contínuas de barreiras comerciais e aumento no consumo influenciado pela divulgação de sua importância nutricional. (EVANS E NALAMPANG, 2006). O Brasil se encontra na sexta colocação no cenário mundial com produção de 213.041 toneladas (FAO, 2019). A produção brasileira está concentrada principalmente nas regiões Sul e Sudeste, com destaque para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, onde no ano de 2017 produziram 121.216, 50.751 e 20.003 toneladas, respectivamente (IBGE, 2019).

O abacateiro é uma planta que apresenta caule cilíndrico e lenhoso com coloração cinza escuro. Suas folhas não possuem estípulas, apresentam pecíolo curto, podem ter vários formatos como elíptico-lanceoladas, oblongos e oblongo-lanceoladas e são distribuídas alternadamente no caule (KOLLER, 2002; TABESHPOUR; RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2017). O fruto é rico em vitaminas A, C, E e do complexo B, além disso, possui teores consideráveis de carotenoides, ácidos graxos, minerais, fenólicos, compostos polifenólicos e proteínas. Estas propriedades são eficazes na prevenção de câncer e doenças cardiovasculares, além de reduzir o colesterol que é prejudicial à saúde (NAVEH et al., 2002; TABESHPOUR; RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2017). As sementes têm alto teor de fitoquímicos bioativos tais como ácidos fenólicos, taninos condensados e flavonoides (TREMOCOLDI et al., 2018). No Brasil, as cultivares mais plantadas e consumidas são: ‘Breda’, ‘Hass’, ‘Quintal’, ‘Fortuna’,

‘Geada’, ‘Fuerte’ e ‘Margarida’, sendo a primeira a mais consumida, na qual se destaca com boa resistência ao manuseio e bom potencial de comercialização (MESQUITA E OLIVEIRA et al., 2018).

Além da importância alimentar, o abacate, por ser rico em ácidos graxos polifenóis, esteroides, antioxidante e potássio, tem sido utilizado na produção de azeite (BARBOSA-MARTIN et al., 2016). Da mesma forma, ele é utilizado em indústrias farmacêuticas, cosméticos e na produção de biocombustíveis (TANGO; CARVALHO; SOARES, 2004). Entretanto, a competitividade do país neste segmento permanece um desafio, pois são necessários mais estudos e investimentos que visem assegurar a qualidade dos frutos exigida pelo consumidor, os quais devem ser livres de danos que depreciam sua qualidade, tais como injúrias mecânicas e lesões resultantes de ataques de patógenos e pragas (PERKINS; JOYCE; COATES, 2019).

2.2 Etiologia e epidemiologia da antracnose do abacate

A antracnose, por causar significativas perdas econômicas em diversas culturas, como abacate (*Persea americana* Mill.), banana (*Musa* spp.), pitaia (*Hylocereus undatus*), manga (*Mangifera indica*), goiaba (*Psidium guajava*), maracujá (*Passiflora edulis*), amêndoa (*Prunus dulcis*) e mamão (*Carica papaya*) é considerada a principal doença pós-colheita em frutíferas (FUENTES-ARAGON et al., 2018; KIMARU et al., 2018).

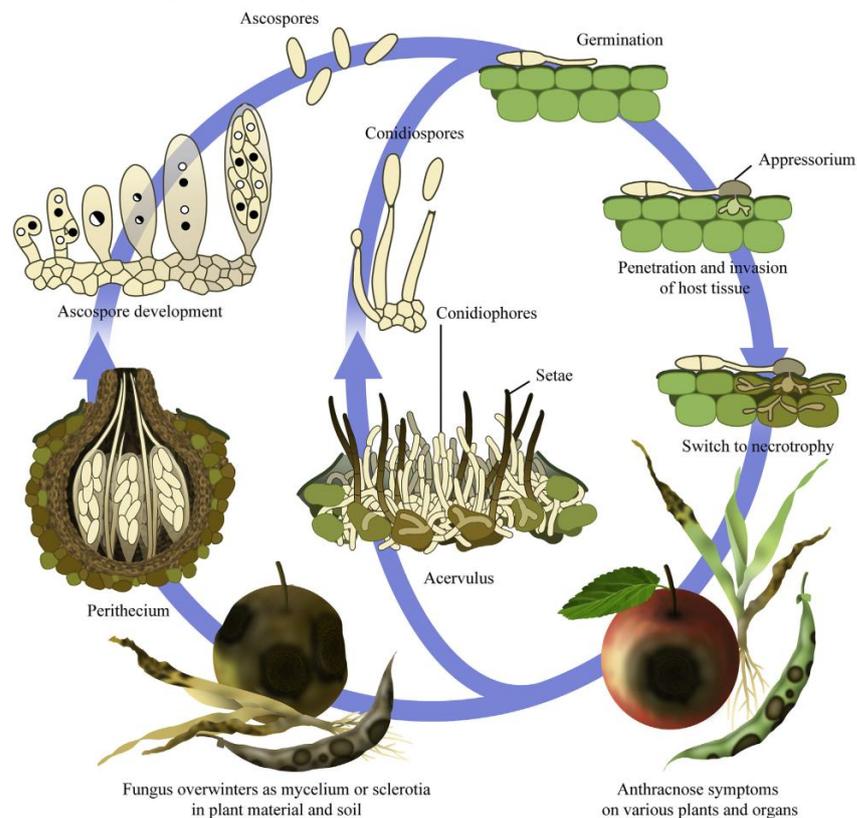
A antracnose causa danos severos em abacate, afetando a produtividade em todos os países produtores (CAMPOS-MARTÍNEZ et al., 2016). No Brasil, o agente causal da antracnose em abacate é mencionado apenas como pertencente ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* (TOZZE JÚNIOR et al., 2015; PICCININ et al., 2016). Outras espécies associadas aos complexos *C. acutatum* e *C. boninense* também são relatadas associadas a esta doença no México (SILVA-ROJAS E AVILA-QUEZADA, 2011), e também em outras frutíferas como no caso da atemoia e maracujá (FIRMINO et al., 2014; TOZZE JÚNIOR et al., 2010).

O agente etiológico da antracnose necessita de temperatura amena (22-27 °C) e água livre para realizar a infecção. O patógeno sobrevive em restos culturais, folhas, galhos velhos e frutos sintomáticos caídos no solo. A disseminação ocorre principalmente por meio da água de irrigação e vento. Todos os órgãos aéreos são afetados, principalmente os frutos. Os sintomas iniciam com pontuações de coloração marrom e formato circular, com o centro dos tecidos deprimidos e escuros, onde é produzida uma massa mucilaginosa de coloração salmão

contendo os conídios (PERKINS; JOYCE; COATES, 2019; PICCININ et al., 2016). Os abacates podem ser infectados em qualquer estágio de desenvolvimento. Durante a infecção os conídios são depositados na superfície dos frutos via dispersão de água, germinam e formam apressório que auxilia na penetração. Em sequência, o crescimento do fungo é paralisado e este permanece quiescente dentro dos tecidos só manifestando os sintomas após o amadurecimento do fruto, depois o patógeno entra na fase necrotrófica colonizando as células e os tecidos vegetais, levando-os à morte (JOSHI, 2018; SILVA et al., 2017).

A antracnose é uma doença policíclica, caracterizada por ciclos repetitivos, uma vez que novas infecções ocorrem durante a fase produtiva (AGRIOS, 2005). De acordo com Silva et al. (2017) o ciclo de infecção geral das espécies de *Colletotrichum* inclui as fases sexual e assexual, sendo a última a responsável pela manifestação dos sintomas da doença. O patógeno entra em contato com o hospedeiro e forma estrutura de sobrevivência (peritécio) que produz ascósporos que são depositados na superfície do fruto. Após esta etapa, ocorre germinação, adesão nos tecidos pela formação de apressório e penetração nas células epidérmicas. Em seguida, coloniza e desenvolve acérvulos que produzem conídios em conidióforos. Após a colonização, o patógeno continuará produzindo conídios para iniciar novas infecções (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida geral de espécies de *Colletotrichum*. Fonte: Silva et al. (2017).



Os conídios são hialinos, unicelulares e cilíndricos produzidos em acérvulos. Estas estruturas estão envolvidas por uma matriz gelatinosa composta de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, que os protegem de alterações extremas de umidade e temperatura, permanecendo viáveis por longos períodos (MENEZES, 2006).

Diversos trabalhos têm enfatizado a importância da antracnose nas regiões produtoras de abacate. Em São Paulo, foram constatadas incidência de 45,7% e 68,7% nas cultivares Fuerte e Hass, respectivamente (FISCHER et al., 2011). Incidência de 41,5% foi relatada em frutos de abacateiro provenientes de mercados varejistas do Recife, PE (SILVEIRA et al. 2001). Desta forma, é necessário conhecer a diversidade de espécies que causam antracnose em abacateiro, bem como, a especificidade na interação patógeno-hospedeiro.

2.3 O gênero *Colletotrichum*

Colletotrichum é um dos mais comuns e importantes gêneros de fitopatógenos em regiões de clima tropical e subtropical, pois está distribuído em todo o mundo. Várias espécies de plantas cultivadas são suscetíveis a uma ou mais espécies deste gênero (BONETT et al., 2012). Além disso, o patógeno tem capacidade de causar doença em todas as partes da planta como folhas, ramos, flores e frutos, causando inúmeras perdas na produção (HYDE et al., 2009; SILVA et al., 2017).

O gênero *Colletotrichum* descrito por Corda em 1831 pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Phyllachorales, Família Glomerellaceae (INDEX FUNGORUM, 2019). Este gênero engloba 190 espécies com diferentes hábitos de vida, sendo responsável por causar antracnose em uma ampla gama de hospedeiros (JAYAWARDENA et al., 2016). As espécies do gênero *Colletotrichum* causam infecções quiescentes, manifestando sintomas apenas após a maturação dos frutos (DEAN et al., 2012). No entanto, endófitos e saprófitas têm sido isolados de partes de plantas assintomáticas (CAI et al., 2009; ROJAS et al., 2010; PRIHASTUTI et al., 2009). Muitas espécies de *Colletotrichum* foram nomeadas de acordo com seu hospedeiro, sugerindo assim especificidade de hospedeiro entre as espécies (CAI et al., 2009). Além de atacar frutíferas, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, espécies deste gênero também afetam outros grupos de plantas, como cereais, gramíneas e plantas ornamentais (FREEMAN et al., 2001; ROJAS et al., 2010).

Em 2012, estudos revelaram 119 espécies de *Colletotrichum* dentro de nove complexos de espécies (DAMM et al., 2012a; DAMM et al., 2012b; WEIR, JOHNSTON;

DAMM, 2012). Porém recentemente, foram definidas 190 espécies agrupadas em 11 complexos com base nas regiões gênicas actina (*act*), β - tubulina (*tub2*), glutamina sintase (*gs*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), calmodulina (*cal*), histona (*his3*), espaçadores internos transcritos (*ITS*), manganês-superóxido-dismutase (*SOD2*), chalcona sintase (*chs-1*), ADN-liase (*apn2*), e região intergênica de genes *apn2* e *MAT1-2-1* (*ApMat*) (JAYAWARDENA et al., 2016).

As espécies comumente associadas à antracnose em frutíferas pertencem aos complexos de espécies *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, e *C. acutatum*, amplamente disseminadas em todo o mundo, e possuem uma extensa gama de hospedeiros. Espécies do complexo *C. gloeosporioides* são mais comuns, pois estão amplamente distribuídas no mundo inteiro, podendo causar doença em pelo menos 1000 espécies de plantas (PHOULIVONG et al., 2010). Atualmente este complexo é composto por 37 espécies diferentes, e uma subespécie *C. kahawae* subsp. *kahawae* (FUENTES-ARAGON et al., 2018; JAYAWARDENA et al., 2016; WEIR, JOHNSTON; DAMM, 2012). *C. boninense* representa um complexo composto por 18 espécies, incluindo *C. boninense* e *C. karstii*, associadas a abacate no México e em Israel (HYDE et al., 2009; DAMM et al., 2012a; SILVA-ROJAS E AVILA-QUEZADA, 2011; VELÁZQUEZ-DEL VALLE et al. 2016; SHARMA et al. 2017). O complexo *C. acutatum* possui 34 espécies distintas associadas a pelo menos 22 famílias botânicas diferentes (DAMM et al., 2012b; JAYAWARDENA et al., 2016).

Outro complexo de espécies recentemente associado com antracnose em frutos tropicais é o *Colletotrichum siamense*, ele está dentro do complexo *C. gloeosporioides* e engloba sete espécies (SHARAMA et al., 2017; LIMA et al., 2013; GIBLIN et al., 2018). Enquanto os demais complexos, discriminam espécies utilizando regiões *Act*, *Cal*, *Gapdh*, *ITS* e *Tub2*, para o complexo *C. siamense* é recomendado o uso do marcador *ApMat* para a identificação mais precisa de suas espécies crípticas. Este marcador apresenta alto polimorfismo, sendo bom candidato para identificação de espécies do complexo *C. siamense* que foram tradicionalmente identificadas como *C. gloeosporioides* (SHARMA et al., 2014).

Em virtude aos grandes avanços nos estudos moleculares associados aos métodos baseados em critérios morfológicos e fenotípicos, novas espécies de *Colletotrichum* podem ser descritas.

2.4 Métodos para identificação de espécies de *Colletotrichum*

A correta identificação do agente etiológico é importante na tomada de decisão durante o processo de quarentena, no desenvolvimento de plantas resistentes e na aplicação direcionada das práticas de manejo, visando manejo integrado e conseqüentemente a redução dos danos econômicos (CAI et al., 2009). Neste contexto, os principais métodos que atendem os requisitos básicos de identificação de espécies de *Colletotrichum* são os caracteres morfológicos, patogênicos e moleculares com introdução de análises filogenéticas (HONG et al., 2008; JAYAWARDENA et al., 2016).

A caracterização morfológica para espécies de *Colletotrichum* é um sistema antigo, no qual associa-se características micromorfológicas e culturais como tamanho, formato dos conídios e apressórios, células conidiogênicas, presença ou ausência de setas, acérvulos, presença de estruturas da fase sexuada, cor, taxa de crescimento e textura da colônia (CAI et al., 2009; SUTTON, 1980). Porém, estas características são consideradas incertas para discriminação e identificação em nível de espécie, devido à alta plasticidade morfológica (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). Outros atributos, como especificidade por hospedeiro e local de origem podem auxiliar na diferenciação de espécie.

Colletotrichum kahawae e *C. gloeosporioides sensu strictu* são exemplos clássicos, de espécies em café cujos os caracteres morfológicos isolados, não são suficientes para separá-las (PRIHASTUTI et al., 2009). Da mesma forma, Peres et al. (2002), utilizaram caracteres morfológicos para diferenciar isolados de *Colletotrichum* em frutíferas, mas estes caracteres não foram satisfatórios para identificação a nível de espécies.

As técnicas moleculares envolvendo análises de sequências por meio de métodos filogenéticos permitem a obtenção confiável da variabilidade em estudos taxonômicos de fungos do gênero *Colletotrichum* (CHOI et al., 2011). A análise filogenética multigênica tem sido fundamental para a identificação de espécies de *Colletotrichum*, possibilitando resolver relações evolucionárias entre espécies com agrupamentos em diferentes clados. Sob a hipótese de que as espécies evoluem de um ancestral comum, e que as espécies filogeneticamente próximas têm características mais semelhantes em relação às distantes (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). De fato, esta abordagem pode ser considerada precisa e confiável para o diagnóstico de espécies de *Colletotrichum* (BUSO, 2005; DAMM et al., 2010; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Estudos envolvendo análise filogenética de duas ou mais regiões genômicas são necessários para identificar e conhecer a diversidade de espécies do gênero *Colletotrichum*,

associadas a diferentes hospedeiros (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006). Diversas são as regiões gênicas utilizadas para a caracterização do gênero *Colletotrichum* entre elas citam-se actina (*act*), β - tubulina (*tub2*), glutamina sintase (*gs*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), calmodulina (*cal*), chalcona sintase (*chs-1*), ADN-liase (*apn2*), fator de alongação 1- α (*EF-1 α*), região intergênica de genes *apn2* e *MAT1-2-1* (*ApMat*) (PRIHASTUTI et al., 2009; PHOULIVONG et al., 2010; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; LIMA et al., 2013; SHARMA et al., 2013).

Análises de regiões gênicas como *act*, *cal*, *chs1*, *gapdh*, *ITS*, *tub2* e *ApMat* foram utilizadas para conhecimento da diversidade filogenética de espécies de *Colletotrichum* associados à manga. O gene *ApMat* foi capaz de identificar sete linhagens dentro do complexo *C. siamense*, incluindo *C. jasmini-sambac*, *C. hymenocallidis*, *C. melanocaulon*, *C. siamense sensu stricto* e três linhagens não nomeadas, que são potencialmente novas espécies (SHARMA et al., 2013). Análise filogenética das regiões *tub2* e *ITS* mostrou que a antracnose das frutíferas abacateiro, mangueira, maracujazeiro e pessegueiro pode ser causada por diferentes espécies do complexo *C. gloeosporioides*, revelando também a presença de *C. boninense* associada à antracnose do maracujá no Estado de São Paulo (Tozze Júnior et al. 2015).

A abordagem polifásica baseada na integração de vários métodos tornou-se rápida e mais eficaz para se realizar estudos de diversidade e caracterização de espécie do gênero *Colletotrichum*, as quais possibilitam resultados mais conclusivos e precisos para a correta identificação e conhecimento da variabilidade existente entre isolados de determinado fitopatógeno (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

2.5 Patogenicidade em espécies de *Colletotrichum*

Estudos de patogenicidade são importantes para determinar se um isolado é patogênico ou não a determinada espécie hospedeira. Entretanto, vale resaltar que uma mesma planta hospedeira pode ser infectada por diferentes espécies, o que compromete a manifestação dos sintomas, dificultando a identificação do patógeno (FIRMINO et al., 2014; ÁLVAREZ et al., 2014). Além disso, os níveis de virulência podem ser diferentes entre isolados de uma mesma espécie.

A patogenicidade com espécies de *Colletotrichum* tem sido ferramenta útil na confirmação do agente patogênico da espécie hospedeira, além de determinar a virulência da espécie. Assim, em trabalho realizado com abacate foi verificado patogenicidade das espécies

C. aenigma, *C. alienum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. nupharicola*, *C. perseae* sp. nov., *C. siamense* e *C. theobromicola*, sendo observada maior virulência de *C. aenigma* (SHARMA; MAYMON; FREEMAN, 2017). Andrade et al. (2007) verificaram que 33 isolados de *Colletotrichum* spp. foram patogênicos em mamão e produziram sintomas característicos de antracnose nove dias após a inoculação. A caracterização patogênica permitiu evidenciar maior especialização patogênica de *C. acutatum* em frutos e inflorescências de morangueiro, e de *C. fragariae* em pecíolos e rizomas. Mesmo assim, estes patógenos apresentaram diferentes níveis de patogenicidade em cultivares distintas, e causaram sintomas com semelhança no mesmo órgão da planta (TANAKA E PASSOS, 2002). Em outro estudo, foi relatado que *C. acutatum* proveniente de morango mostrou-se patogênico quando inoculado em outros frutos, como abacate, mamão, maracujá, manga e goiaba, porém, não foi patogênico em banana (PERES et al., 2002). Da mesma forma Lima et al. (2013) observaram que as espécies *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. dianesei* e *C. karstii* foram patogênicas em frutos de mangueira.

É importante ressaltar, que quando se trata da descrição de nova espécie, além da confirmação dos Postulados de Koch, também deve-se incluir dados dos testes de patogenicidade para descrição dos sintomas no hospedeiro (DAMM et al., 2010).

2.6 Processo infeccioso de *Colletotrichum*

A infecção é uma das etapas do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (PAULA et al., 2015; WHARTON E DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Para espécies de *Colletotrichum*, o processo infeccioso encontra-se dividido em etapas. A primeira é a pré-penetração, que consiste na deposição dos esporos na superfície do hospedeiro, fixação na superfície, germinação e formação de apressório. Em seguida, ocorre a penetração, na qual pode ser realizada por meio de: aberturas naturais, ferimentos ou diretamente por rompimento da epiderme. Após estas etapas, ocorre o estabelecimento de relações parasitárias estáveis entre patógeno e hospedeiro, ou seja, a colonização dos tecidos vegetais e a produção de acérvulos e esporulação (SILVA et al., 2017; WHARTON E DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Todavia, o processo infeccioso pode variar, pois depende das condições de crescimento do patógeno, do tecido hospedeiro, da cultivar e do fungo (WHARTON E DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

Em frutos de abacateiro, as informações disponíveis sobre o processo infeccioso de *Colletotrichum* são limitadas, especialmente, em relação ao momento da ocorrência dos eventos. A germinação de conídios e a emissão do tubo germinativo dentro deste gênero é variável, iniciando-se entre 3 e 48 horas após a inoculação (hai) (PICCININ et al., 2016; BAILEY E JEGER, 1992). Em estudo realizado com abacate, ficou evidenciado que a germinação de *C. gloeosporioides sensu lato* ocorreu em 48 hai com a formação de tubo germinativo e apressório (COATES et al., 1993). Neste trabalho, foi também observado septos em todos os conídios, que penetraram na camada de cera espessa e na cutícula da casca às 48 hai. Em outro estudo com abacate, 97% dos conídios de *C. gloeosporioides* germinaram 16 hai e a maioria formou apressório imediatamente, penetrou na cutícula e atingiu as células epidérmicas 72 hai. O apressório de *Colletotrichum* é essencial na penetração cuticular e da parede celular do hospedeiro (PRUSKY; PLUMBLEY; KOBILER, 1991),

Em estudos realizados com *Colletotrichum* infectando outras espécies hospedeiras, também, foi possível demonstrar os eventos iniciais de penetração. Araujo e Stadnik (2013), quantificaram o número de conídios germinados com formação de apressório para dois isolados (MANE55 e MANE147) de *C. gloeosporioides sensu lato*, provenientes de macieira e constataram que os eventos iniciais de penetração foram semelhantes nos dois isolados, porém, o isolado MANE55 apresentou maior número de conídios germinados com múltiplos apressórios. Em algodão, foi verificada germinação de conídios de *C. capsici*, produção de apressório 4 hai, formação de tubo germinativo e penetração através da cutícula (ROBERTS E SNOW, 1984). A penetração de *C. gloeosporioides sensu lato* em goiaba e cafeeiro ocorreu diretamente através da cutícula e algumas vezes por estômatos (MORAES et al., 2013; FERREIRA et al., 2009).

O patógeno coloniza o tecido do hospedeiro para estabelecer as relações de parasitismo e em seguida a esporulação (WHARTON E DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; SILVA et al., 2017). De acordo com Bailey et al. (1992) existem duas estratégias para *Colletotrichum* colonizar o hospedeiro: a hemibiotrófica intracelular e a subcuticular intramural, sendo a primeira a mais comum. Neste tipo de colonização, o patógeno desenvolve a fase biotrófica onde há surgimento de hifa primária dentro do lúmen celular sem desenvolvimento de sintomas, posteriormente após colonização de células adjacentes, a hifa primária origina hifas secundárias e inicia a fase necrotrófica (SILVA et al., 2017). Na subcuticular intramural o fungo cresce sob a cutícula nas paredes anticlinais e periclinais das células epidérmicas, iniciando a fase necrotrófica com destruição e morte das células do hospedeiro (MORAES et al., 2013; SILVA et al., 2017).

Na literatura, estas informações referentes à *Colletotrichum* em abacate são escassas. Coates et al. (1993) observaram que a colonização envolve os tipos hemibiotrófica intracelular e subcuticular intramural, porém, não especificaram em quantas horas ocorreu infecção. Estes eventos foram bem esclarecidos para outros patossistemas. Hifas de *Ramularia areola* colonizaram inter e intracelularmente o mesóflo foliar de algodoeiro, e a esporulação ocorre por meio dos estômatos presentes nas superfícies adaxial e abaxial da camada epidérmica foliar (CURVELO et al., 2010). Lins, Alves e Abreu (2007) evidenciaram em estudos histopatológicos de *C. gloeosporioides sensu lato* em frutos de cafeeiro, que a colonização dos tecidos do córtex, floema e xilema ocorreu até o sexto dia após inoculação. Da mesma forma, Ferreira et al. (2009) constataram em plântulas de cafeeiro infectadas por *C. gloeosporioides sensu lato* colonização dos tecidos do exocarpo, mesocarpo, endocarpo, endosperma e hipocótilos.

2.7 Controle da doença

Apesar do Brasil dispor de condições apropriadas para a produção de abacate, faltam informações na perseacultura sobre o manejo adequado durante a cadeia produtiva do fruto. Além disso, a ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando uma mesma espécie hospedeira pode dificultar o controle da antracnose, tornando a doença mais importante (PEREIRA, 2015).

O manejo da doença deve ser iniciado no campo de forma preventiva com a realização de práticas culturais como adubação equilibrada, eliminação de restos culturais e frutos sintomáticos e a aplicação de fungicidas na pré-colheita. Na colheita e na pós-colheita, deve-se evitar ferimentos nos frutos, pois estes facilitam a entrada do fungo (FISCHER et al., 2011).

Os primeiros produtos químicos utilizados no controle da antracnose em abacate foram captafol e benzimidazóis (DENHAM; WALLER, 1981). Atualmente, existem poucos fungicidas registrados no Brasil, além dos pertencentes aos grupos químicos benzimidazol, ditiocarbamato, imidazolilcarboxiamida e as formulações comerciais contendo misturas de estrobilurina e triazol. A maioria é inorgânicos, possuindo como ingredientes ativos oxiclureto de cobre, óxido cuproso, hidróxido de cobre e enxofre (BRASIL, 2019). O controle da antracnose antes da colheita por meio da aplicação de fungicidas, muitas vezes não ocorre, sendo necessário que os frutos sejam tratados após a colheita, especialmente quando são exportados por via marítima ou consumidos após 15 dias do seu tratamento (BLEINROTH E

CASTRO, 1992). O fungicida Tecto® SC encontra-se registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pode ser utilizado no tratamento de abacates em pós-colheita (PICCININ et al., 2016). A eficiência do fungicida Tecto® SC no controle da antracnose do abacate 'Fuerte' foi avaliada por Dyk, Villiers e Korsten (1997) de acordo com estes autores houve redução da doença na dosagem 150mL/50L.

Embora a utilização de fungicidas seja eficiente no controle da doença, esta prática pode ocasionar contaminação ambiental e humana, além de selecionar populações resistentes do patógeno. Em virtude destas informações, surge a busca por produtos alternativos que visem o controle, sem causar riscos à saúde humana e ao ambiente.

Os amidos de mandioca e milho são alternativas promissoras no controle de doenças pós-colheita. São produtos naturais extraídos de raiz de mandioca e endosperma de milho, na forma de pó branco, inodoro e sem sabor. Estes produtos são utilizados como ingredientes em diversas áreas da atividade industrial (MALI et al. 2010; WOGGUM et al. 2014). O preparo dos géis para formar a película se baseia no princípio da gelificação, realizado por meio da agitação constante dos componentes sob temperaturas de 70 a 90 °C. Após a obtenção dos géis, as suspensões devem permanecer em repouso em temperatura ambiente até o resfriamento (HENRIQUE E PRATI, 2011).

A utilização de películas comestíveis à base de amido tem aumentado recentemente, isso porque esta matéria-prima apresenta propriedades como barreira ao oxigênio, baixa solubilidade em água, transparência, resistência, brilho, pegajosidade, além de apresentar preço baixo e não ser tóxica (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; WOGGUM; SIRIVONGPAISAL; WITTAYA, 2014).

Na conservação e controle de doenças pós-colheita, diversos trabalhos evidenciaram efeito positivo na aplicação de películas à base de amido. Santos et al. (2011) constataram em frutos de manga menor perda de peso quando foi realizado tratamento com amido de milho à 2, 4 e 6%, juntamente com fécula de mandioca à 2, 4 e 6%. Película de mandioca à 3% combinada com extrato de cravo e canela proporcionou redução de podridão em frutos de manga (SERPA et al., 2014). Goma arábica

10% foi eficiente na redução da antracnose em banana e mamão (MAQBOOL et al., 2011). Em frutos de morango, revestidos com película de mandioca à 2% associada com quitosana à 1%, houve prolongamento na vida útil, bem como, redução da incidência de doenças pós-colheita (CAMPOS; KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2011). Película de fécula de mandioca na concentração de 4% reduziu a perda de peso em pepino e proporcionou aos frutos aparência atrativa (REIS et al., 2006). Desta forma, a aplicação de produtos alternativos

poderá contribuir na elaboração de estratégias de controle pós-colheita, conseqüentemente, reduzir o número de aplicações de moléculas químicas, aumentando a sustentabilidade ambiental e lucratividade no cultivo de abacates.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. D.; ABRAHAM, J.; TAKRAMA, J. F. Morphological characteristics of avocado (*Persea americana* Mill.) in Ghana. **African Journal of Plant Science**, Benin, v. 12, n. 4, p. 88-97, Apr. 2018.
- AGRIOS, G. N. **Environmental effects on the development of infectious plant disease**. In: _____. Plant pathology. 5th ed. Burlington: Elsevier, 2005. p. 498.
- ÁLVAREZ, E. et al. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 139, n. 2, p. 325-338, Jan. 2014.
- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 22, Jan./Fev. 2007.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2018. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 48 p.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J. Múltiplos apressórios e tubos de anastomoses conidiais no processo infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 2, p. 180-183, June. 2013.
- BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control .Oxford: **British Society for Plant Pathology**, Wallingford, p.388, 1992.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. **Infection strategies of *Colletotrichum* species**. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. England: CAB Internacional Wallingford, 1992. chap.5, p.1-26.
- BARBOSA-MARTIN, E. et al. Enrique et al. Chemical and technological properties of avocado (*Persea americana* Mill.) seed fibrous residues. **Food and Bioproducts Processing**, Boulder, v. 100, p. 457-463, Oct. 2016.
- BLEINROTH, E. W.; CASTRO, J. V. Matéria-prima. In: ITAL. **Abacate**: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2.ed. Campinas: ITAL, 1992. p. 58-148.
- BONETT, L. P. et al. Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família Asteraceae sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, Ago. 2012.
- BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Acesso em: 07 fev. 2019.
- BUSO, G. S. C. Marcadores **Moleculares e Análise Filogenética**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documento 137, Brasília, p.22, Ago. 2005.

- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Chiang Rai, v. 39, n. 1, p. 183-204, Dec. 2009.
- CAMPOS-MARTÍNEZ, A. et al. Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* JH Simmonds on avocado fruits. **Crop Protection**, Guildford, v. 89, p. 101-104, Nov. 2016.
- CAMPOS, R. P.; KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 5, p. 554-560, Sept./Oct. 2011.
- CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, p.181-213, Sept. 2012.
- CHOI, K. J. et al. Morphology, molecular phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum panacicola* causing anthracnose of Korean ginseng. **Plant Pathology**, Toowoomba, v. 27, n.1, p. 1-7, Feb. 2011.
- COATES, L.M. et al. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 11, p. 1363-1370, Nov. 1993.
- CORDA, A.C.I. In: Sturm J (ed.) **Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen**. Sturm, Nurnberg, v. 3, Abt. 12, 33-64, tab, 21-32. 1831.
- CURVELO, C. R. et al. Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 108-113, Mar./Apr. 2010
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.73, n.1, p.36. Sept. 2012a.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in mycology**, Utrecht, v. 73, p. 37-113, Sept. 2012b.
- DAMM, U. et al. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. **IMA Fungus**, San Juan, v. 1, n. 2, p. 161-165, 2010.
- DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, London, v. 13, n. 4, p. 414-430, Apr. 2012.
- DENHAM, T. G.; WALLER, J. M. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 98, n. 1, p. 65-77, May. 1981.
- EVANS, E.; NALAMPANG, S. **World, U.S. and Florida Avocado Situation and Outlook. Food and Resource Economics** Department document FE639. 2006. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/fe639>> Acesso em: 25 mar. 2009.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de café e com sintomas de mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, Jul./Ago. 2009.

FIRMINO, A. C. et al. Identificação de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose em plantas de atemóia e colonização do fungo nos frutos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 4, p.323-328, Set. 2014.

FISCHER, I. H. et al. Pós-colheita de abacates ‘Fuerte’ e ‘Hass’: características físicas e químicas, danos e controle de doenças. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.1, p.209-220, Jan./Mar. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2017). **Produção de abacate**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 06 fev. 2019.

FRANCISCO, V. L. F. S.; BAPTISTELLA, C. S. L. Cultura do abacate no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 27-41, 2005.

FREEMAN, S. et al. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology**, Berlin, v. 91, n. 6, p. 586-592, Feb. 2001.

FUENTES-ARAGÓN, D. et al. *Colletotrichum fructicola*, a Member of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, is the Causal Agent of Anthracnose and Soft Rot in Avocado Fruits cv. ‘Hass’. **Mycobiology**, Korea, v. 46, n. 2, p. 92-100, Apr. 2018.

GIBLIN, F. R. et al. *Colletotrichum* species associated with pre-and post-harvest diseases of avocado and mango in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 47, n. 3, p. 269-276, May. 2018.

HENRIQUE, C. M.; PRATI, P. Uso de biofilmes de amido em raízes de mandioca minimamente processadas. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, Hermosillo, v. 12, n. 2, p. 227-236, 2011.

HONG, S. K. et al. Morphological variation, genetic diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in Korea, **Plant Pathology**, Toowoomba, v. 24, n.1, p. 269-278, Ago. 2008.

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, Utrecht, v. 39, n. 1, p. 147-182, Dec. 2009.

INDEX FUNGORUM (2019) <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?pg=2>. Acesso em 12 de março de 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 5 fev. 2019.

JAYAWARDENA, R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, China, v.7, n.8, p.1192-1260, Dec. 2016.

JAYAWARDENA, R. S. et al. Mycosphere Essay 6: Why is it important to correctly name *Colletotrichum* species?. **Mycosphere**, China, v.7, n.8, p.1076-1092, June. 2016.

JOSHI, R. A. Review on *Colletotrichum* spp. Virulence mechanism against host plant defensive factors. **Journal of Medicinal Plants**, Shizuoka, v. 6, n. 6, p. 64-67, Nov. 2018.

KIMARU, S. K. et al. Morphological and Molecular Identification of the Causal Agent of Anthracnose Disease of Avocado in Kenya. **International journal of microbiology**, Biratnagar, v. 2018, p. 1-10, Feb. 2018.

KOLLER, O. C. **Abacate: produção de mudas, instalação e manejo de pomares, colheita e pós-colheita**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.145, 2002.

LIMA, N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, Utrecht, v. 61, n. 1, p. 75-88, July. 2013.

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

MALERBO-SOUZA, D. T. et al. Polinização em flores de abacateiro (*Persea americana* Mill.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 22, n. 4, p. 937-941, 2000.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Starch films: production, properties and potential of utilization. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p.137-55. Jan./Mar 2010.

MAQBOOL, M. et al. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p.71-6, Oct. 2011.

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

MESQUITA, D. L.; OLIVEIRA, A. F. Caracterização dos mercados global e brasileiro de abacate. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 39, n. 303, p. 7-11, Fev. 2018.

MORAES, S. R. G. et al. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 657-664, June. 2013.

NAVEH E. et al. Defatted avocado pulp reduces body weight and total hepatic fat but increases plasma cholesterol in male rats fed diets with cholesterol. **Journal of Nutrition**, Oxford, v. 132, n. 7, p. 2015-2018, Apr. 2002.

OLIVEIRA, B. F.; CRUZ, A. F.; ALVES, E. Cassava starch coatings for postharvest control of papaya anthracnose. **Phytopathologia Mediterranea**, Itália, v. 55, n. 2, p. 276, Aug. 2016.

ORIANI, V. B. et al. Properties of Cassava Starch-Based Edible Coating Containing Essential Oils. **Journal of food science**, Chicago, v. 79, n. 2, p. E189-E194, Jan. 2014.

PAULA, P. V. A. A. et al. Formas de penetração do gênero *Cercospora*. **Nucleus**, Ituverava, v.12, n.2, p.271-280, Dez. 2015.

PEGG, K.G. et al. Foliar, fruit and soil diseases. In: WHILEY, A.W.; SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B.N. (Ed.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CAB International Press, p. 299-338, 2002.

PEREIRA, P. A. **Evolução da produção mundial e nacional de abacate**. 2015. 55 p. Monografia Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2015.

PERES, N. A. R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.150, n. 3, p. 128-134, Setp. 2002.

PERKINS, M. L.; JOYCE, D. C.; COATES, L. M. Possible contribution of impact injury at harvest to anthracnose expression in ripening avocado: A review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 785-790, Feb. 2019.

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Utrecht, v. 44, n. 1, p. 33-43, Oct. 2010.

PICCININ, E. et al. Doenças do abacateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 5.ed. São Paulo: Ceres, v. 2, cap. 01, p. 4, 2016.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Utrecht, v. 39, n. 1, p. 89-109, Dec. 2009.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R. A.; KOBILER, I. The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant pathology**, Toowoomba, v. 40, n. 1, p. 45-52, 1991.

REIS, K.; S. et al. Pepino japonês (*cucumis sativus* L.) submetido ao tratamento com fécula de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 487-493, May./June. 2006.

ROBERTS, R. G.; SNOW, J. P. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 4, p. 390-397, Setp.1984.

ROCHA, I. L. **Números do abacate**. Hortiescolha. Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura. Acesso em: 15 out. 2016.

ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, Jan. 2010.

- SANTOS, A. E. O. et al. Influência de biofilmes de fécula de mandioca e amido de milho na qualidade pós-colheita de mangas' Tommy Atkins'. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Pernambuco, v. 6, n. 3, p. 509-513, Jul./Set. 2011.
- SERPA, M. F. P. et al. Conservação de manga com uso de fécula de mandioca preparada com extrato de cravo e canela. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 6, p. 975-982, Nov./Dez, 2014.
- SHARMA, G. et al. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Diversity**, Utrecht, v. 61, p. 117-138, July. 2013.
- SHARMA, G. et al. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. **Fungal Diversity**, Utrecht, v. 71, n. 1, p. 247-264, July. 2014.
- SHARMA, G. MAYMON, M.; FREEMAN, S. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. **Scientific reports**, Beijing, v. 7, n. 1, p. 15839, Nov. 2017.
- SILVA, D. D. et al. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, Utrecht, v. 31, n.3, p. 155-168, June. 2017.
- SILVA-ROJAS, H. V.; ÁVILA-QUEZADA, G. D. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. **Plant Pathology**, Toowoomba, v. 60, n. 5, p. 899-908, Mar. 2011.
- SILVEIRA, N. S. S. et al. Hongos fitopatogenos associados a frutos comercializados em Recife, Pernambuco (Brasil). **Boletín Micológico**, Chile, v. 16, p. 41-47, 2001.
- SOARES, M. G. O. **Padronização da inoculação e controle da antracnose em bananas com película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais**. 2016. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 696 p, 1980.
- TABESHPOUR, J.; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. Effects of Avocado (*Persea americana*) on metabolic syndrome: a comprehensive systematic review. **Phytotherapy research**, London, v. 31, n. 6, p. 819-837, Apr. 2017.
- TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 484-488, Set./Out. 2002.
- TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 17-23, Abr. 2004.
- TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, Jun. 2006.

TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Austrália, v. 5, n. 1, p. 70-72, Dec. 2010.

TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 270-280, Out./Dez. 2015.

TREMOCOLDI, M. A. et al. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. **PloS one**, California, v. 13, n. 2, p. e0192577, Feb. 2018.

VAN DYK, K.; VILLIERS, E. E.; KORSTEN, L. Alternative Control of Avocado Post-Harvest Diseases. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Pretoria, v. 20, p.109-112, 1997.

VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G. et al. First report of avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. **Plant disease**, Saint Paul, v. 100, n. 2, p. 534-534, Dec. 2016.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p.115-180, Aug. 2012.

WHARTON, P. S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. In **Anales del jardín botánico de Madrid**, Spain, v. 61, n. 1, p. 3-22, 2004.

WOGGUM, T.; SIRIVONGPAISAL, P.; WITTAYA, T. Properties and characteristics of dual-modified rice starch based biodegradable films. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 67, p.490-502, June. 2014.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

***Colletotrichum bredae* sp. nov. causal agent of anthracnose in avocado in Brazil**

(Versão preliminar – em processo de submissão)

Elaborado em concordância com as normas do periódico “**Fungal Diversity**”

Abstract

The anthracnose caused by species of *Colletotrichum* is considered one of the main post-harvest diseases for avocado. In this study, *Colletotrichum* isolates associated with anthracnose in fruits of avocado from the states of SP, MG, RJ, TO, PA and MT were evaluated through phylogenetic analysis, morphological characterization and pathogenic test. The initial measure of genetic diversity was performed with partial sequence analysis of the gene *gapdh* from 57 isolates. Based on the generated groupings and the geographical origin, 14 isolates were selected for phylogeny analysis of multilocus (*gapdh*, *act*, *tub2* and *ApMat*). Three species previously described were identified: *Colletotrichum karstii* belonging to the *C. boniense* species complex, *C. dianesei* and *C. communis* belonging to the *C. siamense* species complex. Still in the complex *C. siamense* was identified a monophyletic group formed by studied isolates which represents a new species formally described and illustrated as *Colletotrichum bredae*. The morphological characters evaluated of isolates were: coloring and growth rate of the colony, size and form of conidia and apressoria. All *Colletotrichum* isolates evaluated caused typical symptoms of anthracnose in avocado. This study represents the first report *C. karstii*, *C. dianesei*, *C. communis* and *C. bredae* causing anthracnose in avocado in Brazil.

Keywords *Persea americana* Mill . Phylogeny multilocus . Disease post-harvest . Species Complex . *Colletotrichum*

Introduction

The avocado (*Persea americana* Mill.) is an economically important culture for the fruit sector in several regions around the world (Perkins et al. 2019). Its cultivation mainly takes place in regions of tropical and subtropical climates (Sharma et al. 2017). The avocado has high nutritional value because it is rich in vitamins A, C, E and complex B and it has high contents of carbohydrates, proteins, fibers and monounsaturated fats (Naveh et al. 2002; Daiuto et al. 2013). The world production of avocados in 2017 was 5.924.398 tons, and Brazil production was 213.041 tons (Fao, 2019). Despite advances in the productive chain of this fruit, the production is affected in all producing regions in view of action of diseases post-harvest, and anthracnose is the main one among them (Campos-Martínez et al. 2016).

The anthracnose symptoms are characterized by formation of round lesions initially brown, but in the long run they get greater varying from black to dark. As well as in fruits, symptoms occurred in stems, branches and leaves (Fuentes-Aragon et al. 2018; Perkins et al. 2019). This disease also affects other tropical fruits, reducing the quality and limiting the retail value. The infection can happen in the field before the harvest, subsequently, with the maturation of the fruit, lesions extended in the epicarp like a brown spot coalesces becoming

black and at more advanced levels produce a mass of conidia with salmon color (Velázquez-del Valle et al. 2016; Willingham et al. 2000). The anthracnose is caused by species of *Colletotrichum*, belonging to complexes *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum boninense* (Velázquez-del Valle et al. 2016; Honger et al. 2016; Weir et al. 2012; Silva-Rojas & Ávila-Quezada 2011).

In Brazil, the species *Colletotrichum gloeosporioides* was reported as being responsible for anthracnose in avocado (Peres et al. 2002; Tozze Júnior et al. 2015). However, this attribution was based only on morphological and pathogenic characteristics. *C. gloeosporioides* is currently defined as a complex of species consisting of 37 species formally described and accepted that were defined by phylogeny of multilocus (Weir et al. 2012; Jayawardena et al. 2016; Fuentes-Aragon et al. 2018). In this complex, based on phylogeny of the regions rDNA ITS-5.8S and β -*tubulin*, different species associated with anthracnose of avocado have already been identified, such as: *C. siamense sensu lato*, *C. fructicola*, *C. queenslandicum*, *C. alienum* and *C. gloeosporioides* (Tozze Júnior et al. 2015).

In Mexico, species of complexes *C. acutatum* and *C. boninense* were reported in associated with anthracnose in avocado, and the first report of complex *C. boninense* causing symptoms of the disease were observed by Silva Rojas & Avila-Quezada (2011). However, in Brazil, there are no reports species these complexes causing anthracnose in avocado. Nevertheless, the accurate identification of species *Colletotrichum* causing lesions in epicarp and mesocarp in avocado is important for a correct diagnosis, monitoring of anthracnose taking decisions in quarantine and also in the effective control of anthracnose. Furthermore, different species can have distinct interactions with the host and may respond differently to fungicides system and applications (Giblin et al. 2018).

Thus, the aim of this work was to characterize isolates of *Colletotrichum*, obtained from fruit of the avocado tree from different regions in Brazil using phylogenetic analysis, morphological characterization and pathogenicity test.

Material and Methods

Collection and isolation of isolates

Ninety four *Colletotrichum* isolates from different regions of Brazil, were obtained from fruits of avocado cultivars 'Breda', 'Margarida', 'Manteiga', 'Fortuna', 'Hass' and 'Quintal' (Table 1). Direct isolation was carried out by transferring portions of fungal mycelium present on the avocado tissue surface to Petri dish containing potato-dextrose-agar (PDA). In indirect isolation the asymptomatic avocado fruits were incubated during 48 hours in the humid chamber next, fragments of tissues (5mm) were removed between symptomatic and asymptomatic area, and then disinfested in alcohol 70 % for 30 seconds, sodium hypochlorite 2 % for 1 minute. Subsequently, the fragments were washed with sterilized distilled water, dried with filter paper and placed on Petri dishes containing PDA plus streptomycin sulphate (100 g L^{-1}), and incubated for 8 days at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with a 12-h of photoperiod (Lima et al. 2013). The monosporic culture of isolates was obtained from suspension of conidia adjusted to 10^6 conidia mL^{-1} , using hemacytometer, and 100 mL this suspension was spread out in Petri dishes containing agar-water medium (AW), and incubated in BOD at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 hours. A unique conidia germinated was transferred to another Petri dish containing PDA. Monosporic cultures were stored in microtubes at $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ containing sterilized distilled water.

Representative isolates of different species are available at Coleção Micológica de Lavras (CML) from Federal University of Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brazil (<http://www.dfp.ufla.br/cml>) (Table 1).

Table 1. Isolates of *Colletotrichum* from avocado fruits (Continue)

Species	Access code ^a	State / Region ^b	Cultivar de <i>P. americana</i>	Code GenBank			
				<i>gapdh</i> ^c	<i>act</i> ^c	<i>ApMat</i> ^c	<i>tub2</i> ^c
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 1	Janaúba- MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum karstii</i>	MG 2, CML 4024	Janaúba- MG	Margarida	MK501947	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 3	Janaúba- MG	Margarida	MK501948	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum karstii</i>	MG 4, CML 4040	Janaúba- MG	Margarida	MK501944	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 5	Janaúba- MG	Margarida	MK501946	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 6	Campo Grande-MT	Margarida	MK501919	x	x	x
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 7	Holambra-SP	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 8	Holambra-SP	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 9	Holambra-SP	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum dianesei</i>	MG 10, CML 4038	Lavras-MG	Margarida	MK501892	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 11	Lavras-MG	Margarida	MK501945	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 12	Lavras-MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 13	Lavras-MG	Breda	MK501896	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 14	Lavras-MG	Breda	MK501898	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 15	Campinas-SP	Fortuna	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 16, CML 4025	Campinas-SP	Breda	MK501899	MK501878	MK501864	MK501850
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 17	Campinas-SP	Breda	MK501900	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 18	Belém-PA	Breda	MK501901	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 19, CML 4026	Belém-PA	Breda	MK501902	MK501879	MK501865	MK501851
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 20	Patos de Minas-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 21	Patos de Minas-MG	Breda	MK501903	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 22^T, CML 4027	Patos de Minas-MG	Breda	MK501904	MK501880	MK501866	MK501852
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 23	Patos de Minas-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 24	Curvelo-MG	Manteiga	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 25	Curvelo-MG	Manteiga	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum communis</i>	MG 26, CML 4034	Curvelo-MG	Manteiga	MK501894	MK501881	MK501867	MK501853
<i>Colletotrichum</i> sp.indet.6	MG 27, CML 4035	Curvelo-MG	Manteiga	MK501905	MK501882	MK501868	MK501854
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 28	São João do Miriti-RJ	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 29, CML 4029	São João do Miriti-RJ	Breda	MK501906	MK501883	MK501869	MK501855
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 30	São João do Miriti-RJ	Breda	MK501895	x	x	x
<i>Colletotrichum dianesei</i>	MG 31, CML 4039	São João do Miriti-RJ	Breda	MK501893	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 32	Uberaba-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 33	Uberaba-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 34	Uberaba-MG	Fortuna	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 35	Lafaeti-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum bredae</i>	MG 36	Lafaeti-MG	Breda	MK501907	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 37	Lafaeti-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 38	São Caetano do Sul-SP	Breda	NS	NS	NS	NS

Table 1. Isolates of *Colletotrichum* from avocado fruits (Continue)

Species	Access code ^a	State / Region ^b	Cultivar de <i>P. americana</i>	Code GenBank			
				<i>gapdh</i> ^c	<i>act</i> ^c	<i>ApMat</i> ^c	<i>tub2</i> ^c
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 39	São Caetano do Sul-SP	Breda	MK501908	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 40	São Caetano do Sul-SP	Breda	MK501897	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 41	São Sebastião da estrela-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 42	São Sebastião da estrela-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 43	São Sebastião da estrela-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 44	Palmital do Cervo-MG	Breda	MK501909	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 45	Palmital do Cervo-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 46	Ribeirão Vermelho-MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 47	Ribeirão Vermelho-MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 48	Ribeirão Vermelho-MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 49	Ribeirão Vermelho-MG	Breda	MK501910	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 50	Ribeirão Vermelho-MG	Breda	MK501911	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 51	Boa Esperança-MG	Breda	MK501912	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 52	Boa Esperança-MG	Breda	MK501913	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 53	Boa Esperança-MG	Breda	MK501914	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 54	Boa Esperança-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 55	Boa Esperança-MG	Breda	MK501915	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 56	Formiga-MG	Breda	MK501916	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 57	Formiga-MG	Breda	MK501917	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 58	Gurupi-TO	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 59, CML 4028	Gurupi-TO	Breda	MK501918	MK501884	MK501870	MK501856
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 60	São João del Rei-MG	Breda	MK501920	MK501885	MK501871	MK501857
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 61, CML 4030	São João del Rei-MG	Breda	MK501921	MK501886	MK501872	MK501858
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 62	Três Corações-MG	Breda	MK501922	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 63	Três Corações-MG	Breda	MK501923	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 64	São Gotardo-MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 65	São Gotardo-MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 66	São Gotardo-MG	Margarida	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 67	Concorde-SP	Breda	MK501924	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 68, CML 4031	Concorde-SP	Breda	MK501925	MK501887	MK501873	MK501859
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 69	Perdões-MG	Quintal	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 70	Perdões-MG	Quintal	MK501926	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 71	Lambari-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 72	Lambari-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 73	Lambari-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 74	Viçosa-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 75	Viçosa-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 76	Viçosa-MG	Breda	MK501927	NS	NS	NS

Table 1. Isolates of *Colletotrichum* from avocado fruits (Conclusion)

Species	Access code ^a	State / Region ^b	Cultivar de <i>P. americana</i>	Code GenBank			
				<i>gapdh</i> ^c	<i>act</i> ^c	<i>ApMat</i> ^c	<i>tub2</i> ^c
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 77	Agaf-SP	Breda	MK501928	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 78	Agaf-SP	Breda	MK501929	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 79	Agaf-SP	Margarida	MK501930	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 80	Agaf-SP	Margarida	MK501931	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 81, CML 4032	Bauru-SP	Hass	MK501932	MK501888	MK501874	MK501860
<i>Colletotrichum</i> sp.indet.7	MG 82, CML 4036	Bauru-SP	Hass	MK501933	MK501889	MK501875	MK501861
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 83	Bauru-SP	Quintal	MK501934	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 84	Bauru-SP	Quintal	MK501935	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 85	Piraju-SP	Breda	MK501936	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 86	Piraju-SP	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 87, CML 4033	Piraju-SP	Quintal	MK501937	MK501890	MK501876	MK501862
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 88	Piraju-SP	Quintal	MK501938	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.indet.8	MG 89, CML 4037	Piraju-SP	Margarida	MK501939	MK501891	MK501877	MK501863
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 90	Piraju-SP	Margarida	MK501940	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 91	São João da Boa Vista-SP	Breda	MK501941	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum breidae</i>	MG 92	São João da Boa Vista-SP	Breda	MK501942	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 93	São Sebastião do Paraíso-MG	Breda	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum</i> sp.	MG 94	São Sebastião do Paraíso-MG	Breda	MK501943	NS	NS	NS

^a MG: Coleção Pessoal Maria Gilmar; CML: Coleção Micológica de Lavras

^b State of Brazil: MG = Minas Gerais, SP = São Paulo, PA= Pará, MT = Mato Grosso, TO = Tocantins, RJ = Rio de Janeiro

^c Genetic regions: *gapdh* = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *act* = actin, *ApMat* = intergenic regions *apn2-Mat1-2-1*, *tub2* = β -tubulin 2

T = Isolated type, in boldface; NS = No sequenced

Extraction of DNA, amplification of genetic regions and sequencing

The isolates were cultivated in PDA during 8 days at 25 °C with 12 hours of photoperiod. Fragments of the cultures were placed in 110 mL broth medium of liquid malt extract at 2% (20 g of malt extract L⁻¹; Himedia® Laboratories, Mumbai, India, 5g of sucrose and 2g of yeast extract) and placed in agitator table during 7 day at 25 °C. The biomass was collected through filtration and harvested, and the total genomic DNA of isolates was extracted according to the method of Kuramae-Izioka (1997). Later, NanoDrop espectrophotometer and electrophoresis in agarose gel were used in order for evaluation of DNA concentration and quality.

Fifty-seven isolates were selected based on the geographical region for amplification of gene barcode glyceraldehyde of 3-phosphate dehydrogenas (*gapdh*), (Table 1). After that, a subset of 14 isolates were chosen based on groupings generated in *gapdh* phylogenetic analysis and geographical origin were amplified for actin (*act*), β -tubulin (*tub2*) and intergenic region genes *apn2* and *MAT1-2-1* (*ApMat*).

The PCR was done with total volume of 25 μ L using kit GoTaq Colorless Master Mix (Promega Corporation, Fitchburg, WI, EUA), My Cyclor Thermocycler (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA). The *primers* used for amplification and sequencing of gene regions as well as the cycle conditions are shown on Table 2. The products of amplification were visualized in UV transilluminator, after electrophoresis, through agarose gel 1% stained with Gel-Red (Biotium, Hayward, USA. The products of PCR were purified with KitWizard® SV gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, WI) and sent to sequencing at Macrogen Corporation in the United States of America (USA).

DNA extraction, PCR, and sequencing

Isolates were inoculated in 100 ml of 2 % malt extract broth medium (20 g of malt extract L⁻¹; Himedia Laboratories, Mumbai, India) and incubated in agitator table for 7 days at 25 °C. Biomass was collected by filtration and harvested and total genomic DNA of the isolates was extracted using the method of Kuramae-Izioka (1997). DNA concentration and quality were evaluated in NanoDrop espectrophotometer and electrophoresis in agarose gel.

DNA sequences of glyceraldehyde of 3-phosphate dehydrogenas (*gapdh*) were obtained for 57 isolates selected according to geographical region, and based on the *gapdh*

tree (Table 1), 14 isolates were selected for further analysis of actin (*act*), β -tubulin (*tub2*), intergenic region genes *apn2* and *MAT1-2-1* (*ApMat*).

The PCR was done with total volume of 25 μ L using kit GoTaq Colorless Master Mix (Promega Corporation, Fitchburg, WI, EUA), My Cycler Thermocycler (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA). The *primers* used for amplification and sequencing of gene regions as well as the cycle conditions are shown on Table 2. The products of amplification were visualized in UV transilluminator, after electrophoresis, through agarose gel 1% stained with Gel-Red (Biotium, Hayward, USA. PCR products were purified using a Wizard@SV Gel kit and PCR Clean-up System (Promega Corporation, WI) and and sequenced by MacroGen Corporation in the United States of America (USA).

Phylogenetic analysis

Consensus sequences were assembled from bidirectional DNA sequences using software SeqAssem ver. 07/2008(Hepperle, 2004). Sequences were aligned with reference sequences of members from species complex of *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. acutatum* and *C. boninense* (Damm et al. 2012a; Damm et al. 2012b; Weir et al. 2012; Lima et al. 2013; Sharma et al. 2014) available in GenBank. (Table 3). Alignments were obtained using MUSCLE as implemented in the software MEGA 5.1 (Tamura et al. 2011) as well Maximum parsimony (MP) and Maximum likelihood (ML) analysis which were performed on the multilocus alignment using for each gene separately and concatenated sequences (gene limits GAPDH: 1-264, ACT: 265-543, TUB2: 544-1007 and ApMat: 1008-1855). The alignment of concatenated sequences resulted in 1855 characters including “gaps”.

Partial deletion was used for gaps/lack of data treatments in MP and ML. MP was performed for all sets of data using Bisection and Reconstruction of Tree. The consistency index (C) and retention index (RI) were estimated as measures for homoplasy in the data set and tree length was calculated for generated trees. The analysis based on ML was inferred with K80 + G for concatenated data, and analysis was done by calculus of a initial tree using BioNJ and the subsequent heuristic search done with NNI (Nearest-Neighbor-Interchange). The robustness of topology for MP and ML was evaluated through *bootstrap* statistics test. The sequences generated in this study were deposited at GenBank and the alignment at TreeBase.

Table 2. Primers used and conditions of amplification

Gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Reference	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
<i>Gapdh</i>	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Templeton et al. (1992)	94 °C for 4 min	94 °C for 45 s	60 °C for 45 s	72 °C for 1 min	72 °C for 7 min
	GDR	GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT	Templeton et al. (1992)					
<i>Actin</i>	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone & Kohn (1999)	95 °C for 5 min	94 °C for 30 s	58 °C for 30 s	72 °C for 45 s	72 °C for 7 min
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Carbone & Kohn (1999)					
<i>Tub2</i>	TB5	GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT	Panaccione & Hanau (1990)	95 °C for 5 min	94 °C for 30 s	62 °C for 30 s	72 °C for 2 min	72 °C for 7 min
	TB6	GCAGTCGCAGCCCTCAGCCT	Panaccione & Hanau (1990)					
<i>ApMat</i>	CgDL_F6	AGTGGAGGTGCGGGACGTT	Rojas et al. (2010)	94 °C for 3 min	94 °C for 45 s	62 °C for 45 s	72 °C for 1 min	72 °C for 7 min
	CgMAT1_F2	TGATGTATCCCGACTACCG	Rojas et al. (2010)					

Table 3. Isolates of *Colletotrichum* spp. used in this study with information about species, host, geographical location and access at GenBank (Continue)

Taxon	Isolate designation	Host	Origin	<i>gapdh</i>	<i>act</i>	<i>tub2</i>	<i>ApMat</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> species complex							
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	<i>Persea americana</i> Mill.	Israel	JX010044	NM	NM	NM
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071*	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	JX010028	JX009572	JX010411	KC888927
<i>C. alienum</i>	ICMP 12621	<i>Persea americana</i> Mill.	New Zealand	JX0109959	NM	NM	NM
<i>C. asianum</i>	MTCC 10987*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010053	JX009584	JX010406	FR718814
<i>C. communis</i>	MTCC 11599*	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894632	JQ894546.	JQ894602	JQ894582
<i>C. fruticola</i>	ICMP 18581*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010033	FJ907426	JX010405	JQ807838
<i>C. fruticola</i>	ICMP 12568	<i>Persea americana</i> Mill.	Australia	JX0109946	NM	NM	NM
<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17821*	<i>Citrus sinensis</i>	Italy	JX010056	JX009531	JX010445	JQ807843
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>Ciggaro</i>	ICMP 18539*	<i>Olea europaea</i>	Australia	JX009966	NM	NM	NM
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>Ciggaro</i>	ICMP 18531	<i>Persea americana</i> Mill.	New Zealand	JX009999	NM	NM	NM
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>Ciggaro</i>	ICMP 12952	<i>Persea americana</i> Mill.	New Zealand	JX009971	NM	NM	NM
<i>C. nupharicola</i>	ICMP 18187*	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>poly sepala</i>	USA	JX009972	JX009437	JX010398	JX145319
<i>C. perseae</i>	CBS141365*	<i>Persea americana</i> Mill.	Israel	KX620242	KX620145	KX620341	KX620177
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX009934	JX009447	JX010414	KC888928
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 12564	<i>Persea americana</i> Mill.	Australia	JX009934	NM	NM	NM
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	JX009916	JX009562	JX010403	KC888925
<i>C. tropicale</i>	ICMP 18653*	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX010007	JX009489	JX010407	KC790728
<i>Colletotrichum siamense</i> species complex							
<i>C. dianesei</i>	MFLUCC 1300058*	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KC517194	KC517298	KC517254	KX094304
<i>C. endomangiferae</i>	CMM3814*	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KC702955	KC702922	KM404170	KJ155453
<i>C. hymenocallidis</i>	ICMP 18642*	<i>Hymenocallis americana</i>	China	JX010019	GQ856775	JX010410	JQ807842
<i>C. jasmini-sambac</i>	ICMP 19118*	<i>Jasminum sambac</i>	Vietnam	HM131497	HM131507	JX010415	JQ807841
<i>C. murrayae</i>	GZAAS 5.09506*	<i>Murraya</i> sp.	China	JQ247609	JQ247657	JQ247644	N. S
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578*	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX009924	FJ907423	JX010404	JQ899289
<i>C. siamense</i>	ICMP 18569	<i>Persea americana</i> Mill.	South Africa	JX009963	NM	NM	NM
<i>C. siamense</i>	ICMP 18570	<i>Persea americana</i> Mill.	South Africa	JX009969	NM	NM	NM
<i>C. siamense</i>	ICMP 12565	<i>Persea americana</i> Mill.	Australia	JX009940	NM	NM	NM
<i>C. siamense</i>	ICMP 12567	<i>Persea americana</i> Mill.	Australia	JX009937	NM	NM	NM

Table 3. Isolates of *Colletotrichum* spp. used in this study with information about species, host, geographical location and access at GenBank (Conclusion)

Taxon	Isolate designation	Host	Origin	<i>gapdh</i>	<i>act</i>	<i>tub2</i>	<i>ApMat</i>
<i>Colletotrichum</i> sp. indet. 1	GC02 ^a	<i>Coffea robusta</i>	India	KC790734	KC790620	KC790867	KC790672
<i>Colletotrichum</i> sp. indet. 2	ITCC6165	<i>Punica granatum</i>	India	KC790772	KC790661	KC790907	KC790711
<i>Colletotrichum</i> sp. indet. 3	GM385 ^a	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894626	JQ894536	JQ894596	JQ894568
<i>Colletotrichum</i> sp. indet. 4	MTCC9664	<i>Carica papaya</i>	India	KC790761	KC790648	KC790894	KC790698
<i>Colletotrichum</i> sp. indet. 5	GM390 ^a	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894627	JQ894537	JQ894597	JQ894570
<i>Colletotrichum boninense</i> species complex							
<i>C. annellatum</i>	CBS 129826	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colombia	JQ005309	NM	NM	NM
<i>C. boninense</i>	CBS 123755*	<i>Crinum asiaticum</i>	Japan	JQ005240	NM	NM	NM
<i>C. brasiliense</i>	ICMP 18607*	<i>Passiflora edulis</i>	Brazil	JQ005322	NM	NM	NM
<i>C. hippeastri</i>	CBS 125376*	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005318	NM	NM	NM
<i>C. karstii</i>	CBS 132134*	<i>Vanda</i> sp.	China	HM585391	NM	NM	NM
<i>C. karstii</i>	J1B ^b	<i>Persea americana</i> Mill.	México	JQ247605	NM	NM	NM
<i>C. parsonsiae</i>	ICMP 18590*	<i>Parsonsia capsularis</i>	New Zealand	JQ005320	NM	NM	NM
<i>C. phyllanthi</i>	CBS 175.67*	<i>Phyllanthus acidus</i>	India	JQ005308	NM	NM	NM
<i>Colletotrichum acutatum</i> species complex							
<i>C. acutatum</i>	CBS 112996*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JQ948677	NM	NM	NM
<i>C. fioriniae</i>	CBS 127600	<i>Persea americana</i> Mill.	Australia	JQ948638	NM	NM	NM
<i>C. fioriniae</i>	CBS 127599	<i>Persea americana</i> Mill.	Australia	JQ948639	NM	NM	NM

Abbreviation: CBS Culture Collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; GZAAS Guizhou Academy of Agricultural Sciences herbarium, China; ICMP International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; MFLUCC Mae Fah Luang University Culture Collection, Thailand; MTCC Microbial Type Culture Collection and Gene Bank, Chandigarh, India; ITCC Indian Type Culture Collection, New Delhi, India; NS=sequence not available on Genbank; NM=sequence not used in multigene phylogeny * ex-holotype or ex-epitype cultures;^a Sequences generated by Sharma et al.,(2013) ;^b Sequences generated by Velázquez-del-Valle et al (2016).

Evaluation of morphological character

Based on the result of phylogenetic analysis, isolates of species *C. bredae* sp. nov. (9), *C. dianesie* (2), *C. communis* (1) *C. karstii* (2) and *Colletotrichum* sp., indet. (3) were selected for the evaluation of morphological characteristics of colonies, conidia and apressoria (Sutton, 1992). Morphological characterization of the *Colletotrichum* isolates was carried out based on cultures grown on potato dextrose agar. Cultures were incubated at 25 °C with a 12-h photoperiod for 8 days. Morphological characters such as colour, shape and size of conidia and conidiogenous cells and colony diameter was measured determine the growth rate (mm/day) with digital pachymeter in two perpendicular directions (Sharma et al. 2014). From the data, the mycelial growth rate was calculated according to Oliveira (1991).

$$\text{MGR} = \sum (D-D_a)/N$$

where:

MGR= mycelial growth rate (mm day⁻¹);

\sum = summation

D= current mean diameter of colony (mm);

D_a= mean diameter of colony the previous day (mm);

N= number of days after inoculation.

The length and width of 30 conidia and apressoria, chosen randomly in dishes after 8 days of incubation per isolate, were measured. (Table 4). For production of apressoria, the technique of culture in blades was used, which cut of 10 mm² medium PDA was performed and placed in blades lined with filter paper in Petri dishes (Cai et al. 2009). After that, using a sterilized needle, conidia masses were deposited in the margin of mean and covered with glass slides (Johnston and Jones 1997). The cultures were incubated from 5 to 7 days at 25 °C and photoperiod of 12 h.

The experiment was performed under a completely randomized desing with 17 treatments (isolates), three repetitions and a dish per plot. To determine the significance of differences in conidia dimensions and growth rates of *Colletotrichum* isolates was performed. variance analysis (ANOVA). The significant means in F test were grouped through Scott-Knott test, at 5% of probability in Sisvar software (Ferreira, 2008).

Pathogenicity test

The isolates representing species *Colletotrichum bredae* sp. nov., *C. dianesei*, *C. karstii* and *C. communis* for pathogenicity test on avocado fruits cv. Breda asymptomatic and without application of fungicides. The fruits were desinfested using 2% of NaOCl for 3 minutes, washed in sterilized distilled water and dried with paper towel. The inoculum was prepared by culturing each monosporic isolates on PDA at 25 °C for 8 days, and then conidia suspension were prepared to 10⁶ conidia mL⁻¹. The fruits were wounded in distinct locals with sterilized multi-needle inoculated with 20 µL of conidia suspension. The negative control consisted of avocado fruits inoculated with sterilized distilled water. After inoculation, the fruits were placed in plastic bags and kept in moist chamber at 60 ± 5% of relative humidity and temperature 25 ± 2 °C during 48 h. The experiment was performed under a completely randomized design with three repetitions for treatment (17 isolates). The virulence of the isolates was evaluated by measurement of the lesion after 8 days of incubation, and. The mean area injured was calculated in inoculated points using the formula area of circle adapted by Soares et al. (2017). Fungi were reisolated from symptomatic plants.

$$A = \pi r^2$$

where:

A = mean area injured;

π = constant with value 3,1416

r = average radius of lesion.

The data were submitted to variance analysis (ANOVA). The significant means in test F were grouped by Scott-Knott's test, at 5% of probability in Sisvar software (Ferreira, 2008).

Results

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyze based on partial sequences of gapdh gene, obtained for 57 isolates using MP, revealed that a strongly supported clade was formed with only 41 strains of this study, and the others isolate grouped in 2 clades, which corresponded to species previously

described as *C. dianesei* and *C. karstii*. All identified belong to *C. siamense* species complex (Fig. 1). In the combined tree (*gapdh*, *act*, *tub2* and *ApMat*), was confirmed that all isolates belong to the *C. siamense* species complex. The isolate CML 4034 grouped together with the type strain of *C. communis*. The isolates CML 4035, CML 4036 and ML 4037 did not cluster with any known species and were nominated as *Colletotrichum* sp. indet. 6, *Colletotrichum* sp. indet. 7 and *Colletotrichum* sp. indet. 8, respectively. The other 10 isolates form a monophyletic group and represent a new phylogenetic species that it is named here as *Colletotrichum bredae* (Fig. 2).

Fig. 1. Phylogram of maximum parsimony of species *Colletotrichum* based on the sequence of *gapdh* gene. The tree was rooted with sequences of isolates of species *C. acutatum* e *C. fiorinae*. The length of the branches is presented by scale in the base of the tree and *bootstrap* values (1.000 replications) ≥ 70 % are indicated internodes. Isolates from avocado fruits are indicated in bold. T = isolate type; CI = Index of consistency; RI = Index of retention.

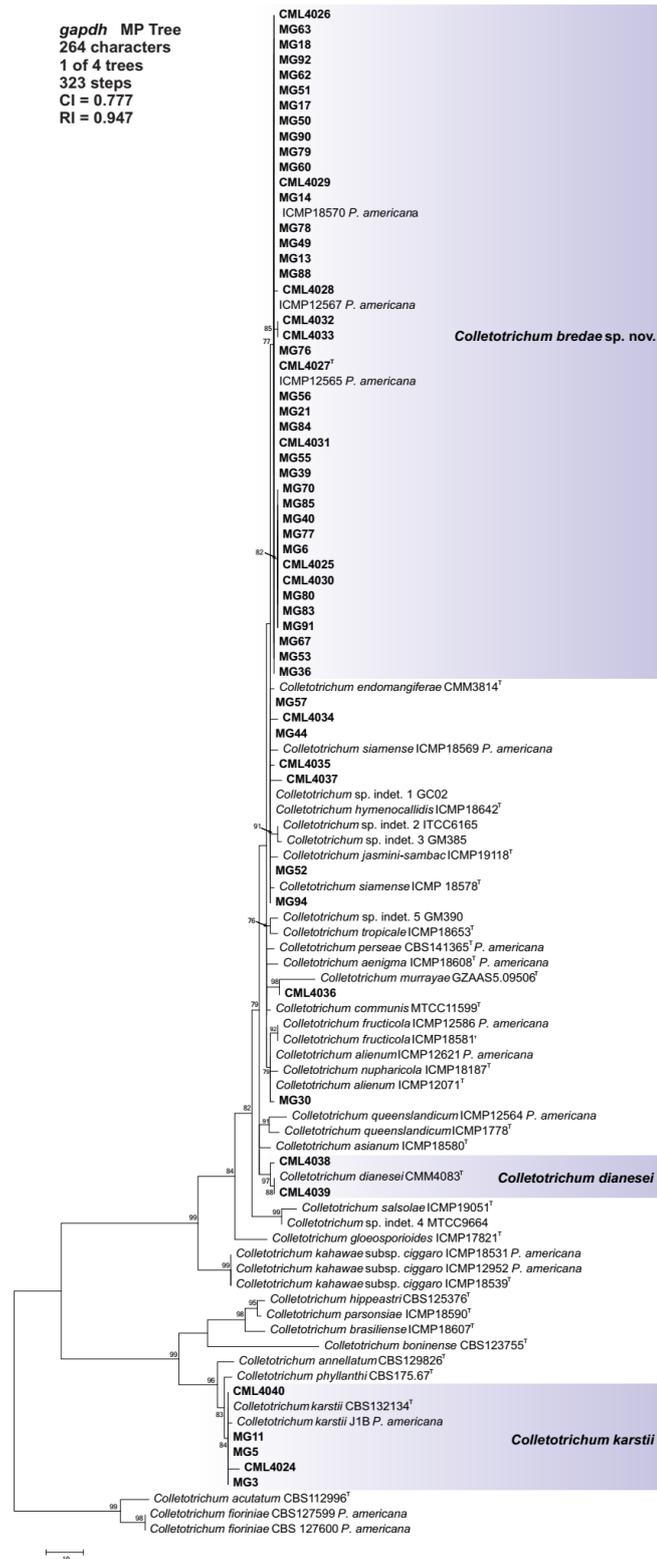
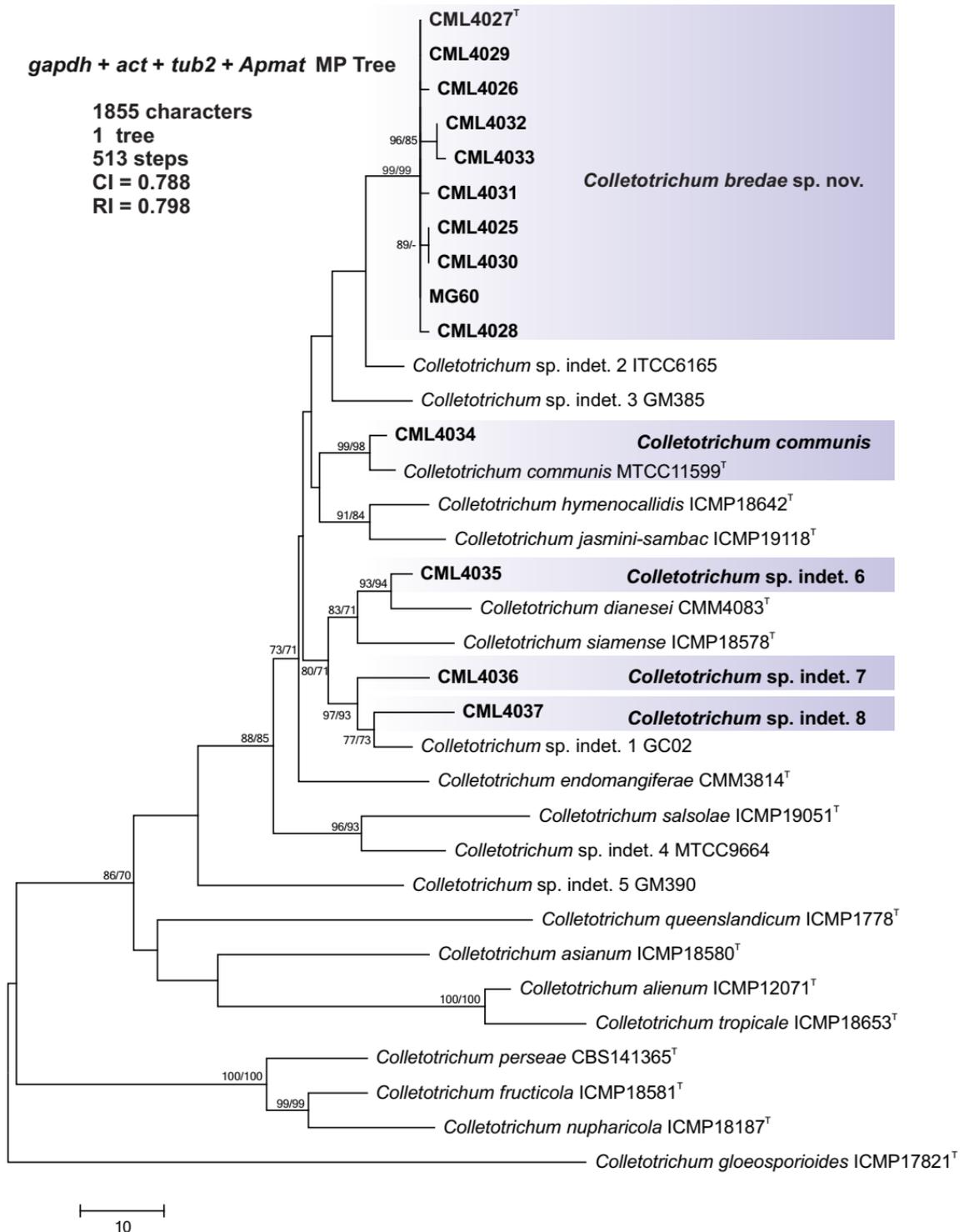


Fig. 2. Phylogram of maximum parsimony of species *Colletotrichum* based on sequences of *gapdh* genes, *act*, *tub2* and *ApMat*. The tree was rooted with sequence of isolate species *Colletotrichum gloeosporioides*. The length of the branches is presented by scale in the base of the tree and *bootstrap* values (1.000 replications, MP/ML) ≥ 70 % are indicated in internodes. Isolates from avocado fruits are indicated in bold. T = isolate type; CI = Index of consistency; RI = Index of retention.



Evaluation of morphological characters

C. bredae colony color variable, pinkish white mycelium with gray shades and beige to salmon, and colony reverse with the presence of conidia mass. *C. communis* isolate showed white colony and pink reverse; *C. karstii* isolates light pink colonies and pink reverse; *C. dianesei* beige colonies and salmon reverse, and the isolates of *Colletotrichum* sp. indet. 6, 7 and 8 white and pink colonies and pink and white reverse (Fig. 3). The growth rate, size and shape of conidia and appressoria were similar among species therefore, these data were not informative enough to support the separation of phylogenetic species determined in this work and/or for separation in complexes (Table 4).

Fig. 3. Colonies color: *Colletotrichum bredae* sp. nov. colony surface (A) and colony reverse (B); *C. communis* colony surface (C) and colony reverse (D); *C. karstii* colony surface (E) and colony reverse (F); *C. dianesei* colony surface (G) and reverse (H); *Colletotrichum* sp. indet colony surface (I) and colony reverse (J).

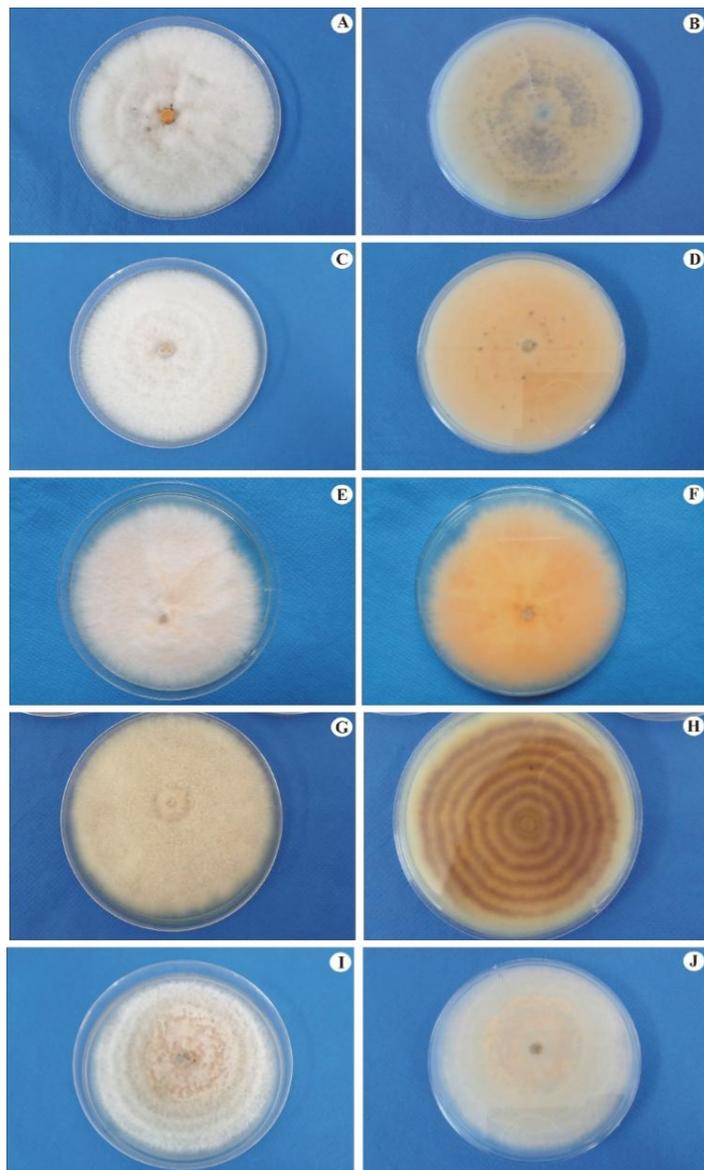


Table 4. Summary of evaluation of morphological characters of *Colletotrichum* isolates

Species	Isolate	Morphology of colonies	Length of conidium (μm)	Width of conidium (μm)	Format of conidium	Growth Rate (mm/day)*	Length of apressoria (μm)	Width of apressoria (μm)
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4025	White to greyish mycelium	8,9-14,9 Mean = 11,7 \pm 1,3	2,2-5,1 Mean = 3,5 \pm 0,8	Cylindrical	6,54 d	3,90-11,26	4,91-7,89
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4026	White to greyish mycelium	7,9-16,5 Mean = 11,8 \pm 1,9	1,8-4,4 Mean = 3,0 \pm 0,8	Cylindrical	10,44 a	4,49-10,76	3,41-8,32
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4027	Dense white to pinkish mycelium	11,2-18,5 Mean = 15,3 \pm 1,9	3,0-5,7 Mean = 4,4 \pm 0,8	Cylindrical	10,20 a	4,36-14,09	4,37-12,55
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4029	White, aerial mycelium	8,4-18,9 Mean = 13,0 \pm 2,7	1,6-5,3 Mean = 2,8 \pm 0,8	Cylindrical	9,75 b	3,40-13,39	2,77-7,82
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4028	White to greyish mycelium	10,1-16,2 Mean = 12,4 \pm 1,5	2,1-5,0 Mean = 3,6 \pm 0,7	Cylindrical	9,74 b	4,00-12,34	2,78-7,47
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4030	White to greyish mycelium	9,4-14,2 Mean = 11,5 \pm 1,3	1,6-4,5 Mean = 3,2 \pm 1,6	Cylindrical	9,54 a	5,07-10,35	3,53-8,56
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4031	White to beige pale mycelium	12,3-17,7 Mean = 14,5 \pm 1,5	2,8-5,0 Mean = 4,0 \pm 0,5	Cylindrical	10,63 b	5,99-13,43	3,20-6,84
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4032	White to greyish mycelium	8,2-15,9 Mean = 11,1 \pm 1,7	1,9-3,9 Mean = 3,0 \pm 0,6	Cylindrical	10,35 a	5,03-9,41	5,05-8,71
<i>C. bredae</i> sp.nov.	CML 4033	White to beige pale mycelium	9,5-14,6 Mean = 11,3 \pm 1,2	2,6-5,0 Mean = 3,7 \pm 0,6	Fusiform	10,20 a	5,41-13,19	3,41-6,81
<i>C. communis</i>	CML 4034	White, aerial mycelium	8,1-15,7 Mean = 12,1 \pm 1,7	2,1-5,6 Mean = 3,3 \pm 0,9	Fusiform	9,90 b	5,20-15,16	3,14-13,00
<i>C. dianesei</i>	CML 4038	Beige and salmon aerial mycelium	7,4-13,4 Mean = 10 \pm 1,4	2,0-3,8 Mean = 2,9 \pm 0,6	Cylindrical	9,52 b	4,89-18,00	2,37-12,83
<i>C. dianesei</i>	CML 4039	White to beige mycelium	8,8-16,5 Mean = 16,5 \pm 1,7	3,0-5,9 Mean = 4,4 \pm 0,9	Cylindrical	10,60 a	3,06-8,81	2,29-5,91
<i>Colletotrichum</i> . sp indet.6	CML 4035	White, aerial mycelium	7,6-14,0 Mean = 11,2 \pm 1,6	2,5-4,5 Mean = 3,5 \pm 0,6	Cylindrical	10,02 a	2,68-19,94	3,06-11,57
<i>Colletotrichum</i> . sp indet.7	CML 4036	Pinkish white, aerial mycelium	9,3-15,9 Mean = 12,8 \pm 1,7	2,4-5,5 Mean = 4,0 \pm 0,8	Fusiform	9,37 b	4,37-11,86	4,25-10,12
<i>Colletotrichum</i> . sp indet.8	CML 4037	White to greyish mycelium	7,8-16,5 Mean = 11,0 \pm 1,9	1,5-5,0 Mean = 3,5 \pm 0,8	Fusiform	9,27 b	4,38-11,92	2,91-8,42
<i>C. karstii</i>	CML 4024	Pink pale mycelium	5,1-11,0 Mean = 7,1 \pm 1,4	1,9-3,3 Mean = 2,5 \pm 0,4	Fusiform	6,36 d	4,59-11,48	2,87-8,87
<i>C. karstii</i>	CML 4040	Pink to salmon mycelium	5,7-13,5 Mean = 8,3 \pm 1,6	1,8-3,6 Mean = 2,4 \pm 0,4	Fusiform	7,44 c	4,11-12,73	3,36-14,40

* Mean rates followed by the same letter do not differ among them by Scott-Knott test at 5% probability.

Taxonomy

Colletotrichum bredae M.G.O. Soares, & S. S.COSTA **sp. nov.** (Fig. 3A-H)

Etymology: Refers to the association with avocado fruit from cultivar Breda.

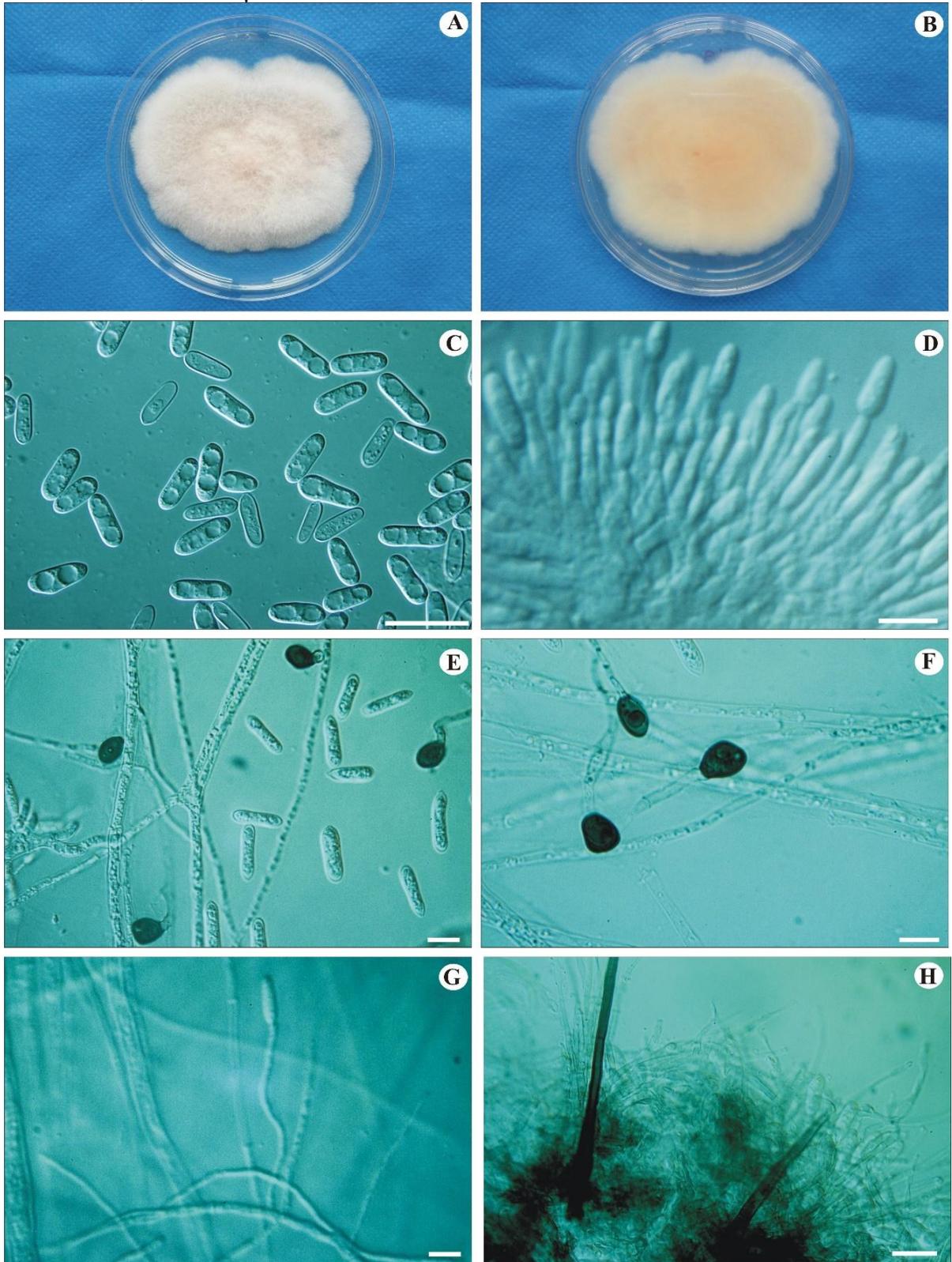
Description: Colonies in PDA at 25 °C attaining 59-90 mm diameter after 8 days, growth rate of 6,54-10,63 mm day⁻¹ (Table 4), white to pinkish coloring, dense, and reverse salmon to light pink. Aerial mycelium, dense, with the presence of salmon conidial mass after 10 days of growth (Fig. 4A, B). Acervuli absent in medium of culture. *Conidia* common in mycelium, hyaline, cylindrical with rounded edges, some times fusiforms measuring 11.2–18.5 × 3.0–5.7 μm (n=30) (Fig. 4C). *Apresório*: formed in PDA mean, dark brown, variable shape, 4.36–14.09 × 4.37–12.55 μm (n = 30) (Fig. 4E, F, Table 4). Setae present but rare, dark brown to black, tapered toward apices, 41–90 × 4-6 μm (n = 10). (Fig. 4G, H).

Sexual phase: Sexual phase not observed in PDA dish.

Typification: BRAZIL-Patos de Minas, Minas Gerais, in fruits of *Persea americana* Mill., June 15th 2017, Coll. M. G. O. Soares (Ex-type culture CML 4027); Geographic distribution: Minas Gerais, Brazil.

Genetic identification: This species is accurately identified by phylogeny using the *ApMat* marker, like all species belonging to the *Colletotrichum siamense* species complex.

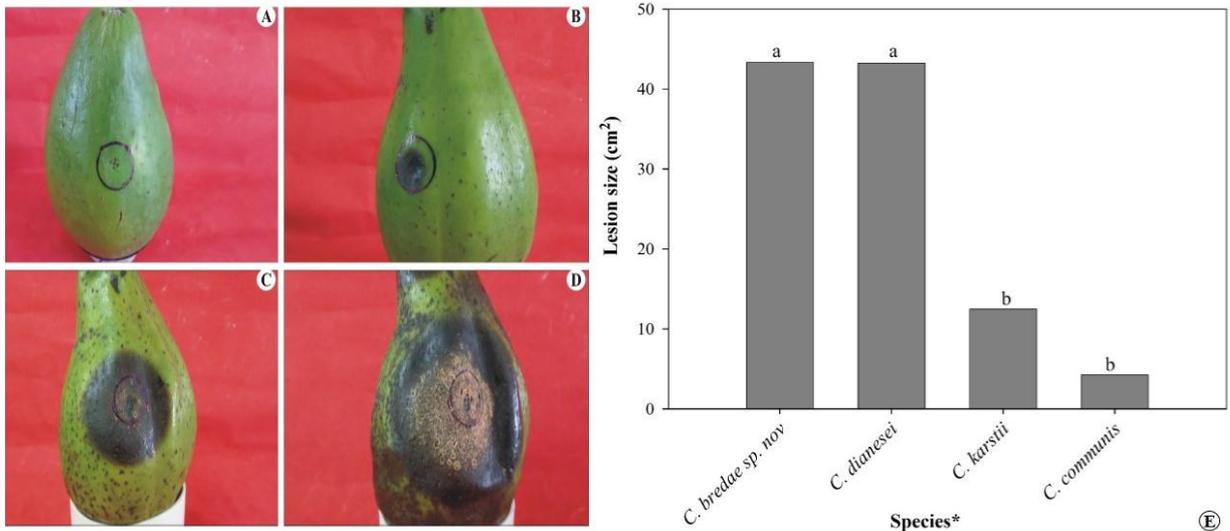
Fig. 4. *Colletotrichum bredae* (CML 4027^T) - colony on PDA 6 days after inoculation at 25 °C. Upper (A) and reverse (B); (C) conidia; (D) conidiogenous cell; (E, F) appressoria; (G) phialide; (H) brown to dark brown conidiomata and dark brown setae; Bars: 20 µm.



Pathogenicity test

All isolates of *Colletotrichum bredae* sp. nov. *C. dianesei*, *C. karstii* and *C. communis* were pathogenic to avocado fruits, causing anthracnose. In the inoculation points, little dark depressed lesions were observed, which advanced from epicarp to mesocarp developing a mass of salmon coloring (Fig. 5B, C, and D). Koch's postulates were confirmed through re-isolation of pathogens from tissues of the infected host in cultivation with PDA. In negative control did not develop symptoms of the disease (Fig. 5A). There was a significant difference in the level of virulence of species based on the difference from the size of the lesion ($P \leq 0,05$). The most virulent isolates were *C. bredae* sp. nov. (43.35 mm^2) and *C. dianesei* (43.24 mm^2), and less virulent isolates were *C. karstii* and *C. communis* (Fig.5E).

Fig. 5. Anthracnose symptoms in avocado fruits inoculated with *Colletotrichum bredae* (CML 4027^T): (A) Negative control inoculated with sterilized water; (B-D) Small necrotic spots that have advanced in the epicarp developing masses of coloration salmon in the more advanced stage; (E) Size of lesions caused by *Colletotrichum* species in avocado fruits (cultivar Breda). *Columns (*Colletotrichum* species) with the same letter do not differ significantly according to Scott-knott test at 5% of probability ($P \leq 0,05$).



Discussion

In this study, different species of *Colletotrichum* were found causing anthracnose in avocado in Brazil using a phylogenetic approach together with the evaluation of morphological characters and pathogenicity test. The species found belong to complex *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum siamense*.

Colletotrichum spp. belonging to complexes of species *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense* and *C. acutatum* were already reported in association with avocado fruits showing symptoms of anthracnose (Silva-Rojas & Ávila-Quezada, 2011; Weir et al. 2012; Velázquez-Del Valle et al. 2016). Within *C. gloeosporioides* species complex have already been reported, *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. fructicola*, *C. kahawae* subsp. *cigaro*, *C. queenslandicum* and *C. siamense* (Weir et al. 2012). Currently, *C. siamense* represents a complex of species that is formed by seven different ones (*C. jasmini-sambac*, *C. hymenocallidis*, *C. siamense sensu stricto*, *C. dianesei*, *C. endomangiferae*, *C. murrayae* and *C. communis*) and five lineages called *Colletotrichum* sp. indet 1-5 which cause disease in tropical fruits (Sharma et al. 2014). These authors recommend the use *ApMat* marker as being essential to distinguish species in the complex *C. siamense*, once this marker has polymorphism to generate high resolution of clades. The efficiency of *ApMat* marker was also verified in works with mango tree involving complex *C. siamense* (Sharma et al. 2013; Vieira et al. 2014).

Based on *gapdh* tree, forty-one isolates this study formed a well supported monophyletic group, that is nominated herein as *Colletotrichum bredae* sp. nov. and the monophyly of this species was confirmed by multigene analysis (*gapdh*, *act*, *tub2* and *ApMat*). In *gapdh* tree the isolates obtained of *P. americana* ICMP18570, ICMP12567 from South Africa and ICMP1256 Australia grouped in clade of *C. bredae* sp. nov. These were previously identified *C. siamense* by Weir et al. (2012) however, they did not group with the type-strain of *C. siamense* (ICMP 18578). In this study, the species *C. dianesei*, *C. communis*, *C. karstii* were also identified; besides, three haplotypes named as *Colletotrichum* sp. indet. 6, 7 and 8, following Sharma's et al. (2014).

C. dianesei was previously registered from mango fruits in the Northeast of Brazil (Lima et al. 2013), and later, it was reported in North America causing stemmed canker in *Vaccinium macrocarpon* and it identified with synonymy of *C. melanocaulon* (Doyle et al. 2013). *Colletotrichum communis* was described by Sharma et al. (2014), in India, based on sequence *ApMat* marker, and it is a pathogen of a wide variety of hosts. *Colletotrichum*

bredae sp. nov. is widely distributed geographically, being found in the Brazilian states of MG, RJ, SP, TO and PA, and it showed haplotype diversity based on genes analyzed, showing a high evolutive potential of the species. According to Lima et al. (2013) the greater the genetic diversity, the bigger the chance of an individual gets adjusted to changes under environmental conditions.

Colletotrichum karstii belonging to *C. boninense* species complex, was firstly reported in India in orchid leaves *Vanda* sp. (Yang et al. 2011). Recently, it has been associated with anthracnose in symptomatic avocado fruits in Australia, Mexico and Israel (Glibin et al. 2018; Sharma et al. 2017; Velázquez-Del Valle et al. 2016) and also in pear leaves (Fu et al. 2019). This species is associated with a wide variety of host plants, such as branches and citric leaves in China and Portugal (Peng et al. 2012; Ramos et al., 2016), and in mango fruits in Brazil (Lima et al. 2013). In the complex *C. acutatum*, a species was related in association with avocado tree, *C. fioriniae* (Damm et al. 2012a) although in this study no species of this complex was found.

The cultural and morphological characters evaluated of isolates of *Colletotrichum* from avocados did not provide enough information for separation of isolates in species and complexes. The synapomorphy of cultural and morphological characters among species makes it impossible to get the correct identification of species of *Colletotrichum*. Therefore, multilocus phylogeny has been essential for identification of species *Colletotrichum*, besides making the understanding of relations among them possible (Cai et al. 2009; Lima et al. 2013).

In pathogenicity test, using isolates belonging to four species of *Colletotrichum*, it was observed all species were pathogenic to avocado fruits causing typical symptoms of anthracnose. This result demonstrates that the capacity to cause anthracnose in avocado developed in a convergent way once different species cause equal symptoms in the same host. The virulence of different isolates for cultivar Breda was significantly different among species. Among the four species registered in this study *C. bredae* and *C. dianesei* are the most virulent followed by *C. karstii* and *C. communis* with less virulence. According to Lima et al. (2013), the development of symptoms can vary due to some factors, such as cultivating, inoculation, humidity, temperature, and concentration of inoculum.

The results generated in this study show that at least four species, *C. karstii*, *C. dianesei*, *C. communis* and *C. bredae* sp. nov. are causal agents of anthracnose in avocado in Brazil. This information is extremely important because it contributes to knowing the etiology

of anthracnose in avocado and can urge in implementing more effective control measures of the disease contributing to fruit quality and increase shelf time.

Acknowledgements The authors are thankful for the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financing productivity scholarship in research provided to the last author. For the laboratories of Plant Molecular Physiology, Bacteriology, Virology and Systematic and Fungi Ecology of Plant biotechnology and Phitopathology Departament of UFLA for equipment provided to realize this study.

References

- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas, RG, Mckenzie EHC, Johnston, PR (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39: 183-204
- Campos-Martínez A, Velázquez-del Valle, M G, Flores-Moctezuma HE, Suárez-Rodríguez R, Ramírez-Trujillo, JA Hernández-Lauzardo AN (2016). Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* JH Simmonds on avocado fruits. Crop Protection 89:101-104
- Carbone I, Kohn LM (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 553-556
- Daiuto ÉR, Vieites RL, Tremocoldi MA, Carvalho LRD, Fumes JGF (2013). Postharvest of ‘Hass’ avocados submitted to UV-C radiation. Revista Colombiana de Ciências Hortícolas 7:149-160
- Damm U, Cannon, PF, Woudenberg, JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG, Crous PW (2012a). The *Colletotrichum boninense* species complex. Stud Mycol 73:1-36
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW (2012b). The *Colletotrichum acutatum* species complex. Stud Mycol 73:37-113
- Doyle VP, Oudemans PV, Rehner SA, Litt A (2013). Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. from wild and agricultural landscapes in North America. PLoS One 8:e62394
- Ferreira, D. F. (2008). Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium, 6, 36-41
- Food and agriculture organization of the united nations- Fao. (2017). Produção de abacate. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 06 fev. 2019
- Fu M, Crous PW, Bai Q, et al. (2019) *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Pyrus* spp. in China. Persoonia 42: 1-35

- Fuentes-Aragón D, Juárez-Vázquez, SB, Vargas-Hernández M, Silva-Rojas HV (2018). *Colletotrichum fructicola*, a Member of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato, is the Causal Agent of Anthracnose and Soft Rot in Avocado Fruits cv. "Hass". *Mycobiology* 1-9
- Giblin FR, Tan YP, Mitchell R, Coates LM, Irwin JAG, Shivas RG (2018). *Colletotrichum* species associated with pre-and post-harvest diseases of avocado and mango in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 47:269-276
- Hepperle D (2004). SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. <http://www.sequentix.de>.
- Honger JO, Offei SK, Oduro KA, Odamtten GT, Nyaku ST (2016). Identification and molecular characterisation of *Colletotrichum* species from avocado, citrus and pawpaw in Ghana. *South African Journal of Plant and Soil* 33:177-185
- Jayawardena RS, Hyde KD, Damm U, Cai L, Liu M, Li XH, Yan JY (2016). Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7:1192-1260
- Johnston PR, Jones D (1997). Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420-430
- Kuramae-Izioka E E (1997). A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Unimar* 19:683-689
- Lima NB, Batista MVDA, Morais MA, Barbosa MA, Michereff SJ, Hyde KD, Câmara MP (2013). Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61:75-88
- Naveh E, Werman MJ, Sabo E, Neeman I (2002). Defatted avocado pulp reduces body weight and total hepatic fat but increases plasma cholesterol in male rats fed diets with cholesterol. *Journal of Nutrition* 132:2015-2018
- Oliveira JA (1991). Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras
- Panaccione DG, Hanau RM (1990). Characterization of two divergent β - tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. *Gene* 86:163-170
- Peng L, Yang Y, Hyde KD, Bahkali AH, Liu Z (2012). *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Cryptog Mycolog* 33:267-283
- Peres NAR, Kuramae EE, Dias MS, Souza NL (2002). Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology* 150:128-134

- Perkins M, Joyce DC, Coates LM (2019). Possible contribution of impact injury at harvest to anthracnose expression in ripening avocado: A review. *Scientia Horticulturae* 246:785-790
- Ramos AP, Talhinhos P, Sreenivasaprasad S, Oliveira H (2016). Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. *Phytoparasitica* 44: 549-561
- Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael AS, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pan GJ, Ruiw UW, Yaping Z, Peng YQ, Sha T (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* sl associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102:1318-1338
- Senhor RF, Câmara MPS, Prichoa LDF, Lima MB, Sales JRR, Michereff SJ (2008). Influência do método de inoculação, intensidade do ferimento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em melão. *Summa Phytopathologica* 34, 232-237
- Sharma G, Kumar N, Weir BS, Hyde K D, Shenoy BD (2013). The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Diversity* 61:117-138
- Sharma G, Pinnaka AK, Shenoy BD (2014). Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. *Fungal Diversity* 71:247-264
- Sharma G, Maymon M, Freeman S (2017). Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific reports* 7:15839.
- Silva-Rojas HV, Ávila-Quezada, GD (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology* 60:899
- Soares, MGO, Alves, E, Freitas, AS (2017). Influence of inoculation and watering in the development of *Colletotrichum musae* injuries in banana. *Agrotropica* 29: 213-218
- Sutton, BC (1992) The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International 388:1-26
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28:2731-2739
- Templeton MD, Rikkerink, EH, Solon SL, Crowhurst RN (1992). Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122:225-230

- Tozze Júnior HJ, Firmino AC, Fischer IH, Furtado EL, Massola Júnior NS (2015). Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo. *Summa Phytopathologica* 41:270-280
- Velázquez-del Valle MG, Campos-Martínez A, Flores-Moctezuma HE, Suárez-Rodríguez R, Ramírez-Trujillo JA, Hernández-Lauzardo AN (2016). First report of avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. *Plant disease* 100:534-534
- Vieira WA, Michereff SJ, Morais Jr MA, Hyde KD, Câmara MP (2014). Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Divers* 67:181-202
- Weir, BS, Johnston PR, Damm U (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol* 73:115-180
- Willingham SL, Cooke AW, Coates LM, Pegg KG (2000). "Pepper spot: A new preharvest *Colletotrichum* disease of avocado cv. Hass," *Australasian Plant Pathology* 29:151-151
- Yang YL, Cai L, Yu ZN, Liu ZY, Hyde KD (2011). *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. *Cryptog Mycolog* 32:229-253

ARTIGO 2

**Processo infeccioso de *Colletotrichum bredae* sp nov. em abacate por meio de
microscopia eletrônica de varredura**

(Versão preliminar – em processo de submissão)

Elaborado em concordância com as normas do periódico “**Australasian Plant Pathology**”

Resumo

A antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum* produz lesões deprimidas arredondadas marrons a escuras em frutos de abacateiro, causando perdas severas na pós-colheita. Neste estudo, os eventos de infecção em abacates por *C. brendae* sp. nov. foi examinado usando microscopia eletrônica de varredura. Frutos verdes foram inoculados com 10^6 conídios mL^{-1} . Em seguida, os frutos foram incubados a 25 °C em câmara úmida por 48 h. As amostras foram coletadas às 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas após a inoculação (hai). A germinação de conídios ocorreu entre 6 e 12 hai. A penetração ocorreu através de ferimentos às 48 hai. A estratégia de colonização de *C. brendae* em abacate foi hemibiotrófica intracelular entre 144 e 240 hai. A esporulação ocorreu às 240 hai por meio da produção de acérvulos, conidióforos e conídios. Considerando a importância da antracnose na pós-colheita de abacate, estes resultados permitem uma melhor compreensão do ciclo de vida do fungo e poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo da doença.

Palavras-chave: antracnose, *Persea americana* Mill., germinação, colonização, esporulação.

Introdução

O abacateiro (*Persea americana* Mill.) é uma planta de crescente importância mundial, cultivado em regiões de clima tropicais e subtropicais do mundo inteiro (Perkins et al. 2019; Tremocoldi et al. 2018). O Brasil em 2017, cresceu 58,26% em volume de exportação e produziu 213.041 toneladas (Anuário de Fruticultura, 2018; Fao, 2019). Esta produção é afetada por doenças pós-colheita destacando-se como principal a antracnose, responsável por perdas significativas nos frutos (Pegg et al. 2002). Os agentes etiológicos desta doença pertencem ao gênero *Colletotrichum* que causam lesões arredondadas de coloração marrom deprimidas, que se expandem rapidamente em tamanho tornando pretas a escuras (Kimaru et al. 2018). Todavia, antes dos sintomas serem observados, o patógeno infecta frutos imaturos ainda no campo e permanece quiescente dentro do hospedeiro até o amadurecimento (Joshi, 2018; Silva et al. 2017). Durante a quiescência, a atividade do patógeno é suspensa e quase nenhum crescimento ocorre, sendo que neste estágio é difícil definir como cada espécie fúngica reage às transições de quiescência para necrotrofia (Silva et al. 2017).

As informações disponíveis sob o processo infeccioso de *Colletotrichum* spp., em abacate são limitadas, especialmente em relação ao momento da ocorrência dos eventos. Prusky et al. (1991) constataram em frutos de abacateiro germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* às 16 horas após a inoculação (hai). Outros estudos evidenciaram a formação do tubo germinativo, apressórios e penetração de *Colletotrichum* pela cutícula, após 48 e 72 hai (Coates et al. 1993; Prusky et al. 1991). Entretanto, em alguns trabalhos com espécies do gênero *Colletotrichum* foram relatadas diferentes formas de

penetração, incluindo a cutícula para *Colletotrichum acutatum* em folhas de morango e para *C. gloeosporioides* em frutos de mamoeiro, além dos estômatos para *C. gloeosporioides* em folhas de cafeeiro (Chau e Alvarez, 1983; Ferreira et al. 2009; Leandro et al. 2001; Miles et al. 2009).

Após penetrar, o patógeno coloniza o tecido do hospedeiro para estabelecer relações parasitárias (Paula et al. 2015; Silva et al. 2017). Na literatura, há relato apenas de *C. gloeosporioides sensu lato* colonizando a epiderme intracelular e subcuticular em frutos de abacateiro, porém utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (Coates et al. 1993). Em outros trabalhos este evento está bem esclarecido, como a colonização hemibiotrófica intracelular de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira (Moraes et al. 2013) e colonização subcuticular de *C. acutatum* e *C. fragariae* em folhas de morangueiro (Curry et al. 2002; Arroyo et al. 2005).

Em relação a esporulação de *Colletotrichum* spp., em abacate, não existem informações indicando o local e o momento que este evento ocorre. Com o intuito de esclarecer estas questões, objetivou-se com este trabalho estudar por meio de microscopia eletrônica de varredura o processo infeccioso de *Colletotrichum bredae* sp. nov. em abacate, incluindo as fases de germinação, penetração, colonização e esporulação.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. Frutos de abacateiro da cultivar Breda, foram inicialmente desinfestados com hipoclorito de sódio por 3 min, lavados com água destilada e secos com papel toalha.

Inoculação de *Colletotrichum bredae* sp. nov.

O isolado de *C. bredae* sp. nov. (CML 4027) utilizado neste estudo foi previamente caracterizado e identificado com base em filogenia molecular utilizando multilocus (*gapdh*, *act*, *tub2* e *ApMat*) e está preservado na Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, UFLA. Para a obtenção da suspensão de esporos, placa de Petri contendo cultura monospórica do isolado foi lavada com água destilada esterilizada. A suspensão obtida

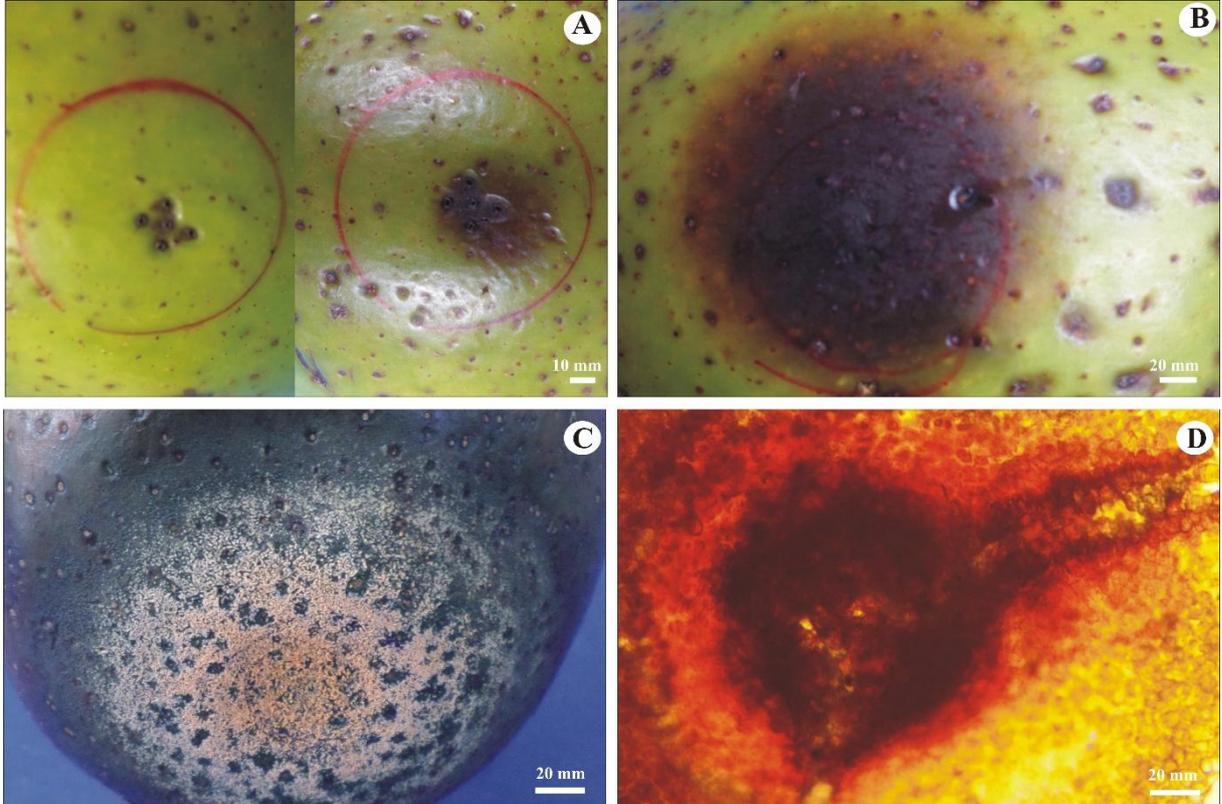
foi filtrada em gaze e a concentração ajustada para 10^6 conídios mL^{-1} , utilizando hemacitômetro.

A inoculação foi realizada na superfície dos frutos em áreas de 15 mm previamente feridas com multiagulada esterilizada. Em seguida papéis germitest foram umedecidos com 50 μL de suspensão e aplicados em cada área. Logo após, os frutos foram colocados dentro de sacos plásticos transparentes, permanecendo sob temperatura e umidade relativa média de 25 °C e 90%, respectivamente. A remoção dos papéis e dos sacos plásticos foi realizada após 48 h (Coates et al. 1993).

Avaliação da germinação, penetração, colonização e esporulação de *Colletotrichum* por meio da microscopia eletrônica de varredura

A germinação de conídios e a penetração do micélio foram avaliadas às 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 horas após a inoculação (hai), coletando-se em cada tempo de amostragem, 10 amostras de 5 mm de diâmetro dentro das áreas inoculadas. A colonização e a esporulação foram analisadas quando iniciaram os primeiros sintomas e a esporulação do fungo nas lesões tornou-se evidente (Figura 1). Neste caso, foram coletadas amostras de 5 mm de diâmetro às 120, 144, 168 e 240 hai, respectivamente. Inicialmente, todas as amostras foram fixadas em solução Karnovsky modificada (2,5 % de glutaraldeído, 2,5 % de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 e CaCl_2 0,001 M) durante 24 h. Depois de fixadas e seccionadas, as amostras foram transferidas para solução tampão de cacodilato de sódio 0,05M por três vezes de 10 min. Em seguida, o material desidratado em uma série gradual crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez de 10 min cada, e 100 %, por três vezes de 10 min). Após desidratação, o material foi submetido a secagem ao ponto crítico (Balzers modelo CPD 030®). Em seguida, as amostras foram montadas em suportes de alumínio, cobertos com uma película de papel alumínio, usando fita de dupla face de carbono. Finalmente, todas as amostras foram cobertas com uma camada de ouro (Evaporador de ouro SCD 050®) e observadas em MEV LEO Evo 40 Zeiss® operando a 20 Kv e distância de trabalho 10 mm. As imagens foram adquiridas por meio do software SmartSEMZeiss®, e as selecionadas foram editadas utilizando software Corel Draw v.12.0®.

Fig. 1. (A-D) Fotografias dos sintomas de antracnose em fruto de abacateiro. (A) Início dos primeiros sintomas as 120-144 horas após a inoculação (hai). (B-C) Aumento das lesões deprimidas com coloração escura circundadas por uma massa de conídios em coloração salmão. (D) Esteriomicrografia da esporulação de *C. bredae* sp. nov. na superfície do fruto 240 hai.



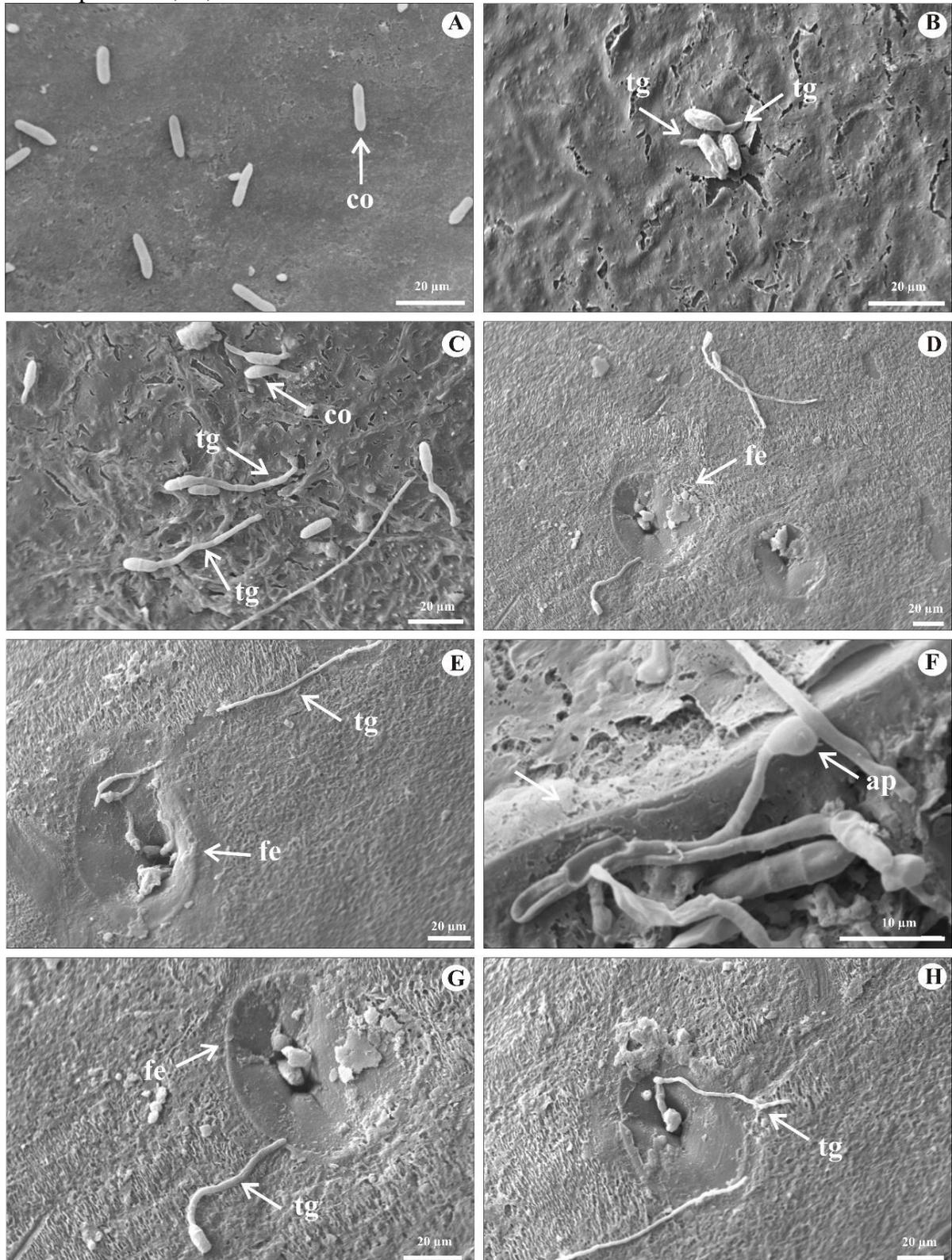
Resultados

Com as técnicas de microscopia eletrônica foi possível observar todos os eventos de infecção de *C. bredae* sp. nov. em frutos de abacateiro, desde a germinação até a esporulação.

Germinação e penetração de *Colletotrichum bredae*

Nas amostras avaliadas entre 3 e 4 horas após a inoculação (hai), não foi observado germinação de conídios na superfície do epicarpo em abacate (Fig. 2 A). Houve variação no período de germinação de conídios sobre a superfície dos frutos. A germinação iniciou entre 6 e 12 hai, e intensificou-se entre 24 e 48 hai, sempre com emissão de apenas um tubo germinativo na lateral dos conídios (Fig. 2 B-E). Foi observado em várias ocasiões crescimento do tubo germinativo em direção aos ferimentos e houve formação de apressório às 48 hai (Fig. 2 F). Observou-se penetração apenas por ferimentos entre 24 e 48 hai (Fig. 2 G-H).

Fig. 2. Eletromicrografias de varredura da germinação e penetração de *C.bredae* sp. nov. em frutos de abacateiro. (A) Conídios não germinados 3 e 4 horas após a inoculação (hai). (B) Início da emissão do tubo germinativo na lateral dos conídios 6 hai. (C) Crescimento dos tubos germinativos entre 24 e 48 hai. (D-E) Tubo germinativo crescendo em direção ao ferimento 48 hai. (F) Formação de apressório 48 hai. (G-H) Penetração através de ferimento 48 hai. co, conídio; tg, tubo germinativo; ap, apressório; fe, ferimento.



Colonização e esporulação de *Colletotrichum bredae*

A colonização de *C. bredae* ocorreu de forma hemibiotrófica intracelular. Às 72 hai iniciou-se a formação de hifa primária no interior do local de penetração (fase biotrófica do patógeno), mas as células permanecem vivas sem surgimento de sintomas (Fig. 3 A). Hifas primárias infectivas colonizaram células epidérmicas e intensificaram seu crescimento no epicarpo dos frutos desenvolvendo hifas secundárias às 144 hai (Fig. 3 B). Entre 144 e 168 hai as hifas secundárias necrotróficas atingiram inter e intracelularmente os tecidos do mesocarpo, e às 240 hai colonizaram os tecidos do pericarpo, degradando as paredes da célula hospedeira, intensificando a fase necrotrófica do patógeno (Fig. 3 C-D).

A esporulação foi observada no epicarpo dos frutos, com surgimento de estruturas acérvulos e formação de conidióforos que produziram massas de conídios na superfície às 240 hai (Fig. 3 E-F). A figura 4 resume a cronologia dos eventos envolvidos na infecção, colonização e esporulação em abacate por *C. bredae* sp. nov.

Fig. 3. Eletromicrografias de varredura da colonização e esporulação de *C. bredae* sp. nov. em frutos de abacateiro. (A) Surgimento de hifa primária no local de infecção 72 horas após a inoculação (hai). (B) Hifas colonizando a epiderme do epicarpo do fruto às 144 hai no local do ferimento (C-D) Corte transversal do fruto com hifas secundárias colonizando espaços inter e intracelulares das células do mesocarpo 144-168 hai e hifas colonizando tecidos do pericarpo às 240 hai. (E-F) Acérvulos produzindo conidióforos com formação de conídios e massas de conídios na superfície do epicarpo 240 hai. fe, ferimento; hi, hifas; cf, conidióforos; co, conídio; mc, massa de conídios.

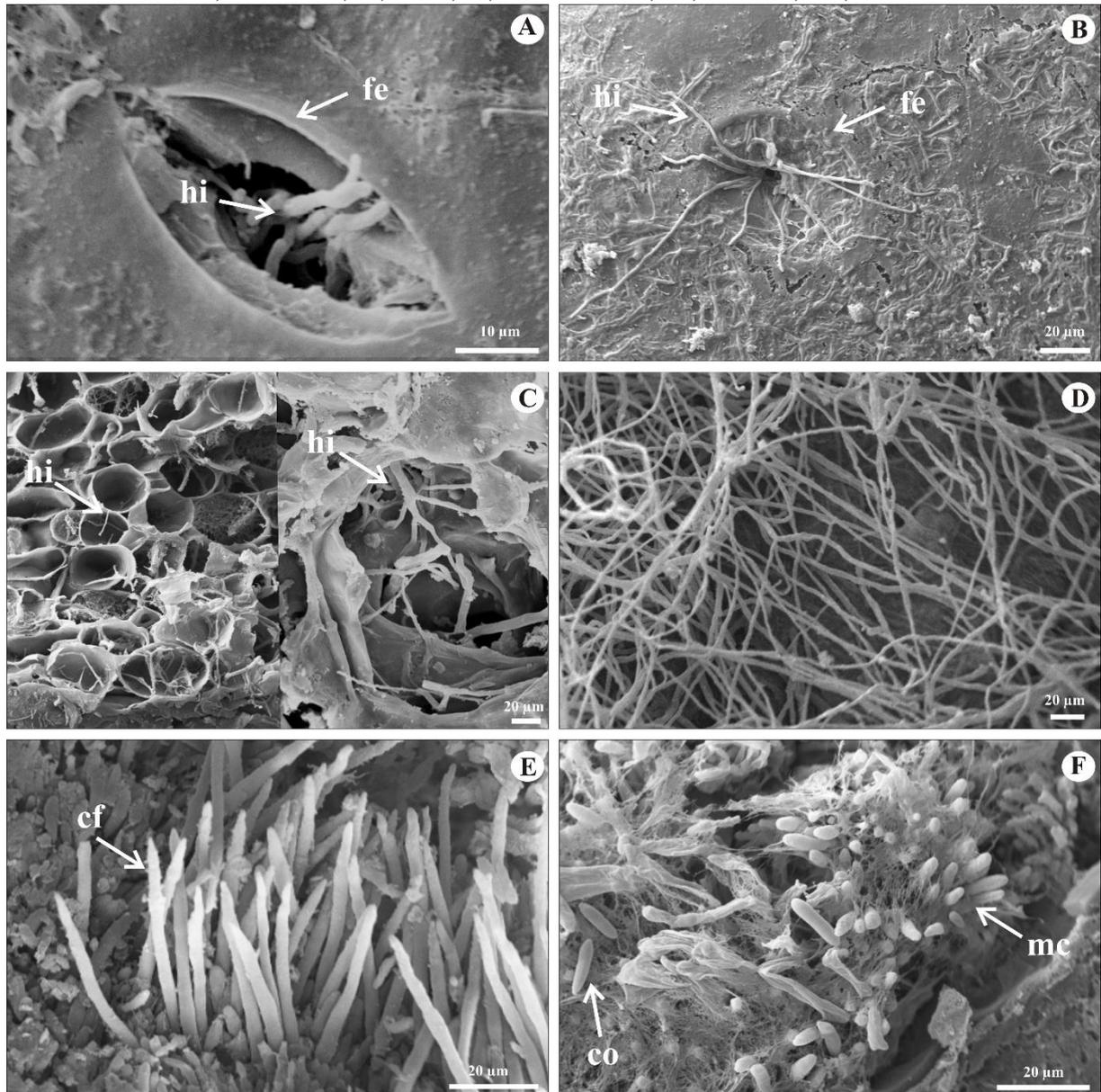
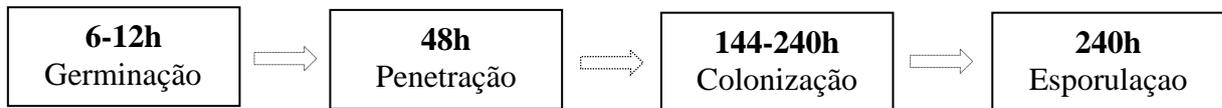


Fig. 4. Cronologia dos eventos na infecção, colonização e esporulação de *C. brendae* sp. nov. em abacate.



Discussão

Este trabalho mostra o primeiro relato do processo infeccioso de *C. brendae* sp. nov. em abacate por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que a germinação de conídios de *C. brendae* ocorreu entre 6 e 12 horas após a inoculação (hai). De acordo com Bailey e Jeger (1992), a germinação de conídios do gênero *Colletotrichum* é variável, iniciando-se entre 3 e 48 hai. Resultados semelhantes foram constatados por Moraes et al. (2013) e Ferreira et al. (2009), ao verificarem em goiabas e mangas inoculadas com *C. gloeosporioides* germinação às 6 hai. Em mamão, também, foi observado germinação de *Gilbertella persicaria* às 6 hai (Cruz-Lachica et al. 2018). Entretanto, em outros trabalhos foi observada germinação de conídios em diferentes hai. Muirhead e Deverall (1981), evidenciaram germinação de *C. musae* em frutos de bananeira às 24 hai. Prusky et al. (1991), relataram em abacate germinação de 97% dos conídios de *C. gloeosporioides* às 16 hai. Conídios de *C. acutatum* em folhas de morangueiro iniciaram a germinação às 4 hai (Arroyo et al., 2005). Conídios de *C. gloeosporioides* germinaram na superfície abaxial de folhas de amora, inicialmente, às 3 hai, sendo que 30 a 60% dos conídios germinaram entre 6 e 9 hai (Kumar et al. 2001).

Quanto a formação do tubo germinativo, Kumar et al. (2001) e Coates et al. (1993), também observaram em folhas de amoreira e frutos de abacateiro, emissão de apenas um tubo germinativo nos conídios de *C. gloeosporioides*. Um tubo germinativo também foi constatado em conídios de *C. gloeosporioides* obtidos de manga (Ferreira et al. 2009). A formação de vários tubos germinativos por conídio foi observada para *C. acutatum* em morango (Arroyo et al. 2005), *C. capsici* em algodão (Roberts e Snow, 1984), *Pseudocercospora macadamiae* em frutos de macadâmia (Miles et al. 2009) e *Ramularia aréola* em folhas de algodoeiro (Curvelo et al. 2010). Segundo Jacome et al. (1991) o maior número de tubos germinativos por conídios aumenta a probabilidade do patógeno penetrar. Contudo, neste estudo, foi verificado penetração do patógeno mesmo na presença de um tubo germinativo por conídio, culminando no aparecimento de sintomas e desenvolvimento da infecção.

Relatos na literatura mostraram que *Colletotrichum* spp. penetram nas células hospedeiras através de ferimentos, aberturas naturais ou diretamente (Moraes et al. 2013; Silva et al. 2017; Wharton e Dieguez-Uribeondo, 2004). Neste estudo, a penetração ocorreu por ferimentos 48 hai, além disso, houve formação de apressório entre 24 e 48 hai. Contudo, em frutos de abacateiro foi relatada penetração de *C. gloeosporioides* pela cutícula 48 e 72 hai (Coates et al. 1993; Prusky et al. 1991). Furio et al. (2019) verificaram penetração de *C. acutatum* por estômatos em frutos de morangueiro. O apressório é uma estrutura especializada na fixação do patógeno durante a penetração, assim, como espécies do gênero *Colletotrichum* penetram diretamente nos tecidos do hospedeiro, algumas espécies são dependentes desta estrutura (Araujo e Stadnik, 2013; Wharton e Dieguez-Uribeondo, 2004). Entretanto, mesmo o patógeno penetrando diretamente nas células epidérmicas, para algumas espécies de *Colletotrichum* a produção de apressório não é necessária (Moraes et al. 2013), como exemplo, Liao et al. (2012), evidenciaram em pimenta que a produção de estruturas ramificadas como hifas primárias ou vesículas facilitaram a penetração de *C. acutatum* na cutícula. No presente trabalho, a formação de apressório, garantiu a permanência do patógeno no hospedeiro e favoreceu a infecção do patógeno no local da penetração. Em estudos realizados anteriormente com espécies de *Colletotrichum*, também foi constatada formação de apressórios às 24 hai em frutos de morangueiro e macieira (Arroyo et al. 2005; Gonçalves et al. 2016). Porém, em frutos de mangueira apressórios foram produzidos entre 8 e 12 hai (Ferreira et al. 2009).

Neste trabalho, observou-se afastamento de tubos germinativos de aberturas naturais, como estômatos, possivelmente, preferência do patógeno por ferimentos. Ferimentos causam estresse ao hospedeiro que podem levar a perda de órgãos e facilitar a penetração de patógenos pós-colheita (Castro-Mercado et al. 2009; Senhor et al. 2008). Soares et al. (2017) verificaram aumento de infecção de *C. musae* em frutos de bananeira com a presença de ferimentos.

O provável mecanismo bioquímico de preferência do fungo por ferimentos está relacionado ao aumento da produção de enzimas no fruto na presença de ferimentos. Estudos investigaram a produção de enzimas em abacates feridos, e observaram acréscimo na atividade das enzimas peroxidase (POX) lipoxigenase (LOX) e poligalacturonase (PG), nos níveis de ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de decréscimo nos níveis de catalase e superóxido dismutase (SOD) (Castro-Mercado et al. 2009; Perkins et al. 2019). Contudo, fazem-se necessários mais estudos neste sentido pois ainda são limitados e contraditórios.

Após penetrar, *C. bredae* colonizou os tecidos de forma hemibiotrófica intracelular entre 144 e 240 hai. Resultados semelhantes de colonização hemibiotrófica foram evidenciados em pimenta e goiaba (Kim et al. 2004; Moraes et al. 2003). Porém, Coates et al. (1993), relataram colonização de hifas intercelular e subcuticular nas células da epiderme de abacate, mas, não informaram o momento da ocorrência. De acordo com Coates et al. (1993), em abacate os eventos associados à senescência, tais como degradação da parede e aumento da permeabilidade da membrana, auxiliam no desenvolvimento necrotrófico do fungo retirando nutrientes das membranas e resultando em morte. Neste estudo, também, foi observado que a senescência intensificou a fase necrotrófica do patógeno, degradando as paredes das células hospedeiras.

Outros tipos de colonização com patógenos que infectam frutos e plantas foram relatados. Garcia-Benitez et al. (2016) e Arroyo et al. (2005) verificaram colonização subcuticular intramural de *Monilinia fructicola* em frutos de nectarinas e *C. acutatum* em folhas de morangueiro. Às 144 hai *C. capsici* colonizou as células epidérmicas de algodoeiro de forma inter e intracelularmente (Roberts e Snow, 1984). Enquanto Miles et al. (2009) constataram colonização apenas intercelular de *Pseudocercospora macadamiae* em tecidos de frutos de macadâmia.

A esporulação de *C. bredae* sp. nov., ocorreu no epicarpo dos frutos às 240 hai. Da mesma forma, em algodoeiro foi verificado esporulação de *C. capsici* na superfície adaxial às 216 hai (Roberts e Snow, 1984). Porém, em outras frutíferas foi constatado esporulação em diferentes horários. Cruz-Lachica et al. (2018) constataram em mamão produção de estruturas de reprodução de *G. persicaria* às 48 hai. Em frutos de nectarinas, foi constatado esporulação de *M. fructicola* às 96 hai (Garcia-Benitez et al. 2016). Marques et al. (2013) observaram em flores de citros formação de acérvulos e conidióforo de *C. acutatum*, mas não informou o momento que ocorreu. Em frutos de mangueira não foi verificado formação de estruturas de reprodução de *C. gloeosporioides* (Ferreira et al. 2009; Lins et al. 2007). Trabalhos realizados anteriormente com abacate, utilizando Microscopia de luz e Microscopia eletrônica de transmissão não evidenciaram o evento da esporulação de *Colletotrichum*. Sendo, esta etapa crucial para implementação dos métodos de controle.

Considerando a importância da antracnose para o abacate e as informações sob o processo infeccioso de *C. bredae* sp. nov. os resultados deste estudo permitem compreender melhor o ciclo de vida do fungo e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo da doença.

Conclusão

1. *Colletotrichum breidae* germinou entre 6 e 12 horas após a inoculação (hai), penetrou às 48 hai por ferimentos, em 72 hai emitiu hifas primárias no local de infecção sem degradar as células e causar sintomas, às 144 hai colonizou células epidérmicas no epicarpo dos frutos e entre 168 e 240 hai colonizou tecidos do mesocarpo e degradou células da parede do pericarpo dos frutos, e finalmente em 240 hai esporulou formando massas de conídios.

Agradecimentos Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado para o primeiro autor e produtividade do segundo autor, e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de lavras (UFLA) pelo seu suporte técnico.

Referências

- Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2018. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 48 p
- Araujo L, Stadnik, MJ (2013). Múltiplos apressórios e tubos de anastomoses conidiais no processo infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira. *Bragantia* 72:180-183
- Arroyo FT, Moreno J, García-Herdugo G, Santos BD L, Barrau C, Porrás M, Blanco C, Romero F (2005) Ultrastructure of the early stages of *Colletotrichum acutatum* infection of strawberry tissues. *Canadian journal of botany* 83:491-500
- Bailey AJ, Jeger JM (1992) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Oxford: British Society for Plant Pathology, 388p.
- Castro-Mercado E, Martínez-Díaz Y, Roman-Tehandon N, García-Pineda E (2009). Biochemical analysis of reactive oxygen species production and antioxidative responses in unripe avocado (*Persea americana* Mill var Hass) fruits in response to wounding. *Protoplasma* 235:67-76
- Chau CF, Alvarez AM (1983) A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. *Phytopathology* 73:1113-1116
- Coates LM, Muirhead IF, Irwin JAG, Gowanlock DH (1993). Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. *Mycological Research*, 97:1363-1370
- Cruz-Lachica I, Marquez-Zequera I, Allende-Molar R, Leon-Felix J, Sañudo-Barajas J A, Ley-Lopez N, Garcia-Estrada RS (2018) Infection process of *Gilbertella persicaria* in papaya (*Carica papaya* L.) fruits. *Journal of General Plant Pathology* 84:339-342

- Curry KJ, Abril M, Avant JB, Smith BJ (2002). Strawberry anthracnose: Histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. *Phytopathology*, 92:1055-1063
- Curvelo, CR, Rodrigues, FA, Berger, PG, Rezende, DC (2010) Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. *Tropical Plant Pathology* 35:108-113
- Ferreira JB, Abreu MS, Alves E, Pereira IS (2009). Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiro e com sintomas de mancha manteigosa. *Ciência e Agrotecnologia* 33: 956-964.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO (2017). Produção de abacate. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 06 fev. 2019.
- Furio RN, Alborno PL, Coll Y, Zamora GM, Salazar SM, Martos G G, Ricci JD (2019) Effect of natural and synthetic Brassinosteroids on strawberry immune response against *Colletotrichum acutatum*. *European Journal of Plant Pathology* 153:227-241.
- Garcia-Benitez C, Melgarejo P, Cal A, Fontaniella B (2016) Microscopic analyses of latent and visible *Monilinia fructicola* infections in nectarines *PloS one* 11:e0160675
- Gonçalves AE, Velho AC, Stadnik MJ (2016) Formation of conidial anastomosis tubes and melanization of appressoria are antagonistic processes in *Colletotrichum* spp. from apple. *European journal of plant pathology* 146:497-506
- Jacome LH, Schuh W, Stevenson RE (1991) Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology* 81:1480–1485.
- Joshi RA (2018) Review on *Colletotrichum* spp. Virulence mechanism against host plant defensive factors. *Journal of Medicinal Plants* 6:64-67.
- Kim KH, Jae-Bok Y, Hyo-Guen P, Eun Woo, P, Young Ho K (2004) Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection *Phytopathology* 94:1295e1304
- Kimaru SK, Monda E, Cheruiyot RC, Mbaka J, Alakonya A (2018). Morphological and Molecular Identification of the Causal Agent of Anthracnose Disease of Avocado in Kenya. *International journal of microbiology* 1-10
- Kumar V, Gupta VP, Babu AM, Mishra RK, Thiagarajan V, Datta RK (2001) Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease *Journal of Phytopathology* 149:629-633
- Leandro, LFS, Gleason, ML, Nutter,FWJr, Wegulo SN, Dixon PM (2001) Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology* 91:659-664.

- Liao CY, Chen MY, Chen YK, Kuo KC, Chung KR, Lee MH (2012) Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. *Plant pathology* 61:262-270
- Lins SR, Abreu MS, Alves E (2007). Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32:488-495
- Marques JPR, Amorim L, Spósito MB, Appezzato-da-Glória B (2013) Histopathology of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* in citrus flowers. *European journal of plant pathology* 135:783-790
- Miles AK, Akinsanmi OA, Sutherland PW, Aitken EAB, Drenth A (2009) Infection, colonisation and sporulation by *Pseudocercospora macadamiae* on macadamia fruit. *Australasian Plant Pathology* 38:36-43.
- Moraes SRG, Tanaka FAO, Massola Júnior NS (2013). Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 35:657-664
- Muirhead IF, Deverall BJ (1981) Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. *Physiological Plant Pathology* 19:77-IN28
- Paula PVAA, Pozza EA, Santos, LA, Teixeira, OHS, Paula, JCA (2015) Formas de penetração do gênero *Cercospora*. *Nucleus* 12:271-280
- Pegg KG, Coates LM, Korsten L, Harding RM (2002) Foliar, fruit and soil diseases. in: Wiley, A.W.; Schaffer, B. Wolstenholme, B.N. (Ed.). *The avocado: botany, production and uses*. Wallingford: CAB International Press, 299-338
- Perkins ML, Joyce, DC, Coates, LM (2019) Possible contribution of impact injury at harvest to anthracnose expression in ripening avocado: A review. *Scientia Horticulturae*, 246: 785-790
- Pessoa WRLS, Oliveira, SD, Dantas SAF, Tavares SCCH, Santos AMG (2007). Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana. *Summa Phytopathologica* 33:147-151
- Prusky D, Plumbley RA, Kobiler I (1991) The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant pathology* 40:45-52
- Roberts RG, Snow JP (1984) Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. *Phytopathology* 74:390-397
- Senhor RF, Câmara MPS, Prichoa, LDF, Lima, MB, Sales JRR, Michereff SJ (2008) Influência do método de inoculação, intensidade do ferimento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em melão. *Summa Phytopathologica* 34:232-237
- Silva DD, Crous PW, Ades PK, Hyde KD, Taylor PW. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31:155-168

- Soares, MGO, Alves, E, Freitas, AS (2017). Influence of inoculation and watering in the development of *Colletotrichum musae* injuries in banana. *Agrotrópica* 29: 213-218
- Tremocoldi MA, Rosalen PL, Franchin M, Massarioli AP, Denny C, Daiuto ÉR, Paschoal JAR, Melo PS, Alencar SM (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PloS one* 13- e0192577.
- Wharton, PS, Dieguez-Uribeondo J (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. *An. del Jardín Botánico Madr* 61:3-22.

ARTIGO 3

Controle pós-colheita de antracnose em abacate com películas de fécula de mandioca e amido de milho

(Versão preliminar – em processo de submissão)

Elaborado em concordância com as normas do periódico “**Bragantia**”

Resumo

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito das películas de fécula de mandioca e amido de milho no controle da antracnose em abacate. Os frutos foram inoculados com suspensão 10^6 conídios mL^{-1} e em seguida imersos em soluções com fécula de mandioca e amido de milho nas concentrações 1, 2, 3 e 4% individuais e combinadas nos métodos curativo e preventivo. As variáveis analisadas foram área média lesionada, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e peso fresco dos frutos. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para verificar a ação das películas nos frutos. No método curativo, houve inibição da área média lesionada e AACPD nos frutos tratados com películas individuais de fécula de mandioca 1 e 4% e amido de milho 1%. No método preventivo, frutos tratados com amido de mandioca e milho 2% individuais proporcionaram menor área média lesionada e AACPD. As combinações de fécula + amido 2, 3 e 4% foram efetivas na inibição da área média lesionada e AACPD no controle curativo. No método preventivo as combinações fécula + amido 2 e 3% inibiram a AACPD, e a área média lesionada foi menor na combinação 3%. Nestes tratamentos também foram verificadas menores perdas de pesos nos frutos. Imagens em MEV revelaram camada protetora na superfície dos frutos pela ação das películas que retardaram o amadurecimento, inibiu a germinação de conídios de *C. breidae*, impedindo a penetração do patógeno e causando deformação de hifas. Estes resultados apontam alternativas de controle que venham substituir o uso de fungicidas, garantindo aos frutos maior tempo de prateleira.

Palavras-chaves: *Persea americana* Mill., Controle alternativo, *Colletotrichum*, Polissacarídeos.

INTRODUÇÃO

O abacateiro (*Persea americana* Mill.) nativo da América Central e México, é cultivado em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Seus frutos apresentam valor nutricional, pois são ricos em proteínas, fibras, minerais, vitaminas A e do complexo B, C e E, além disso, possuem altas concentrações de ácidos graxos insaturados (Daiuto et al. 2013; Tremocoldi et al., 2018).

Em 2017, o México foi o maior produtor e exportador mundial de abacate com produção de 2.029.886 toneladas. O Brasil destacou-se como sexto maior produtor com produção de 213.041 toneladas (Fao, 2019). No entanto, essa produção tem sido limitada por problemas fitossanitários, como as doenças pós-colheita. Dentre as doenças pós-colheita do abacate, a antracnose é considerada a principal. Esta doença reduz a qualidade dos frutos e afeta a aceitação do consumidor e o valor de mercado (Oliveira et al. 2017b; Sefu et al. 2015). O patógeno ataca folhas, flores e principalmente frutos. Os sintomas iniciam-se com pequenas pontuações marrons escuras, deprimidas e de formato circular. Com o progresso, as lesões evoluem para necrose podendo afetar o fruto por completo, tornando-o impróprio para consumo. Em estágio mais avançado da doença a polpa do fruto é atingida, e em presença de alta umidade, há formação de uma massa mucilaginosa de coloração salmão contendo estruturas reprodutivas do patógeno (Kimaru et al. 2018).

No Brasil, o agente causal da antracnose do abacate é mencionado como pertencente ao complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* (Tozze Júnior et al. 2015). No entanto, em países como México, espécies dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum boninense* também foram descritas associadas a esta doença (Silva-Roja e Avila-Quezada, 2011).

O controle da doença inicia-se no pomar, por meio da aplicação de fungicidas entre o florescimento e a frutificação (Fisher et al. 2011). Porém, no Brasil existem poucos fungicidas registrados para o abacateiro, parte deles são inorgânico, possuindo como ingredientes ativos oxiclureto de cobre, óxido cuproso e hidróxido de cobre. Além dos inorgânicos, utilizam-se tiabendazol, difenoconazol e mancozeb (Brasil, 2019). Embora a aplicação de fungicidas seja eficaz, essa prática eleva os custos de produção e pode causar a contaminação ambiental e humana. Produtos alternativos como películas biodegradáveis à base de amido se destacam como forma viável de controle pós-colheita para a substituição dos produtos químicos. Além disso, revestimentos comestíveis utilizados na pós-colheita possuem baixo custo e são desenvolvidos a partir de fontes renováveis, os quais visam manter a qualidade de vida útil

dos frutos, evitam a poluição ambiental e criam uma barreira resistente e transparente, dando aos frutos aspecto brilhante e atraente (Campos et al. 2010; Jiménez et al. 2012; Mardigan et al. 2014; Oliveira et al. 2017a).

O amido é um polissacarídeo com destaque na formação de revestimentos comestíveis, por ser abundante, de fácil uso e baixo custo (Vargas et al. 2012). É composto por cadeias de amilose e amilopectina com propriedades favoráveis decorrentes da segurança fisiológica e biodegradabilidade (Weber et al. 2009). Serve como reserva de energia em muitas plantas incluindo cereais, tubérculos, raízes, frutos e sementes, além de ser destinado em aplicações de produtos alimentícios como agentes adesivos, ligantes e formadores de filmes, e atuarem como gelificantes, espessantes, e retentores de umidade (Freitas et al. 2003; Zobel e Stephen 1995; Weber et al. 2009). Dentre os revestimentos de amido mais usados no controle de doenças pós-colheita estão a fécula de mandioca e o amido de milho.

Diversos trabalhos já comprovaram a eficácia da utilização de amido no controle de doenças pós-colheita e aumento da vida útil dos frutos em diversas frutas como manga, morango e mamão (Campos et al. 2011; Moreira et al. 2017; Oliveira et al. 2016; Santos et al. 2011). Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o controle da antracnose em frutos de abacateiro revestidos com películas de fécula de mandioca e amido de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras - MG. Abacates da cultivar Breda foram obtidos na fazenda Bonela localizada as margens da rodovia BR 381, Km 727, no município de Carmo da Cachoeira - MG. A fécula de mandioca e o amido de milho foram adquiridos em comércio local e o fungicida Tecto® SC cujo ingrediente ativo é o thiabendazol foi cedido pela empresa Syngenta.

Obtenção do isolado e da cultura monospórica

O isolado *Colletotrichum bredae* (CML 4027) previamente depositado na Coleção Micológica de Lavras, do Departamento de Fitopatologia, UFLA, foi utilizado na inoculação dos frutos de abacateiro. A cultura monospórica do isolado foi preparada com adição de 10 mL de água destilada esterilizada na placa contendo colônia, uma alíquota de 10 µL, foi extraída e depositada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio ágar-água e

espalhada com alça de Drigalski. As placas foram colocadas em estufa incubadora (BOD), a 25 °C, por 12 h sob luz fluorescente. Posteriormente, um conídio germinado foi transferido para novas placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA).

Patogenicidade

Para o teste de patogenicidade abacates da cultivar Breda foram previamente lavados em água corrente e desinfestados em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 3 minutos. Após esta etapa, foram realizados cinco furos de 2 mm de profundidade com multiagulhas esterilizadas onde foram aplicados em três diferentes pontos 20 µL de suspensão na concentração ajustada para 10^6 conídios mL⁻¹ (Soares et al. 2017). Os frutos foram envolvidos com sacos plásticos e incubados a 25 °C e 90% de umidade relativa. O isolado mostrou-se patogênico aos frutos de abacateiro causando lesões escuras deprimidas, delimitando todos os pontos inoculados na superfície externa dos frutos, comparado com o controle que não apresentou nenhum sintoma. Com oito dias após a inoculação, em estágio mais avançado da doença, as lesões apresentaram a presença de massas de conídios de cor salmão.

Avaliação *in vivo* dos revestimentos de amido para o controle preventivo e curativo

O efeito da fécula de mandioca e do amido de milho isoladamente e em combinação nas concentrações 1, 2, 3 e 4% foram avaliados em abacates cultivar Breda no controle curativo e preventivo.

Para o método de controle curativo, os frutos de abacateiro foram desinfestados com NaOCl a 2%, inoculados com suspensão de esporos na concentração 10^6 conídios mL⁻¹, e secos por 12h e em seguida imersos em soluções de fécula de mandioca e amido de milho sob diferentes concentrações de 1, 2, 3 e 4% individuais e combinadas. Para o método preventivo, os frutos já desinfestados foram inicialmente imersos nas soluções (Tab. 1), posteriormente secos por 12 h e submetidos à inoculação. Abacates foram inoculados em três pontos distintos da região mediana dos frutos pelo método cinco furos com suspensão de acordo com Soares et al. (2017). Com auxílio de pipeta automática, foram depositados em cada ponto 20 µL da suspensão ajustada na concentração 10^6 conídios mL⁻¹. Em seguida, os frutos foram envolvidos por sacos plásticos, formando câmara úmida a 25 °C e umidade de 90%, durante 48 h de molhamento. Após a retirada dos sacos plásticos, os abacates permaneceram em bancada por 12 h para secagem, a 26 ± 2 °C e umidade média relativa de $60 \pm 5\%$. Os

controles foram: a testemunha com frutos inoculados e imersos em água destilada; e frutos inoculados e tratados com o fungicida Tecto® SC. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com 14 tratamentos e quatro repetições, com um fruto por parcela (Tab.1).

Tabela 1. Tratamentos usados nos experimentos curativo e preventivo para o controle de antracnose em abacate cultivar Breda.

Tratamentos curativo e preventivo	
T1: controle (água destilada)	T8: Amido de milho (2%)
T2: Fungicida (Tecto® SC)	T9: Amido de milho (3%)
T3: Fécula de mandioca (1%)	T10: Amido de milho (4%)
T4: Fécula de mandioca (2%)	T11: Fécula (1%) + Amido (1%)
T5: Fécula de mandioca (3%)	T12: Fécula (2%) + Amido (2%)
T6: Fécula de mandioca (4%)	T13: Fécula (3%) + Amido (3%)
T7: Amido de milho (1%)	T14: Fécula (4%) + Amido (4%)

Preparo das soluções de revestimento e teste de iodo-amido

As soluções contendo fécula de mandioca e amido de milho nas concentrações individuais de 1, 2, 3 e 4 % e a combinação de fécula de mandioca e amido de milho nas concentrações 1, 2, 3 e 4 % foram preparadas para 1 L de água, aquecidas em micro-ondas a 90 °C para o amido de milho e 70 °C para a fécula de mandioca, e agitadas de 10 em 10 seg para obtenção de géis transparentes sem grânulos. Após o resfriamento dos géis em temperatura ambiente, abacates foram imersos nas soluções, durante 1 min, escorrimento e secagem por 3 min, sendo o processo repetido por três vezes (Oliveira et al. 2016). Posteriormente, os frutos foram colocados em suportes, e deixados sob a bancada no laboratório, visando reproduzir as condições de comercialização, com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade média relativa de 60 ± 5 %.

No final do experimento, os frutos foram imersos em solução contendo iodo 2% por 1 min para verificar a integridade das películas à base de amido, já que o iodo tingir o amido presente nas coberturas sem tingir o fruto.

Perda de peso fresco

A perda de matéria fresca foi obtida a partir da diferença entre o peso dos frutos no dia 0 (peso inicial) e o último dia de avaliação (peso final) usando a equação de Coelho et al. (2017).

$$PMF = [(P_i - P_f) / P_i] * 100$$

Onde PMF é a perda de matéria fresca (%), P_i é o peso inicial (g) e P_f é o peso final (g). Os frutos foram pesados em balança analítica com precisão de 0,01g e os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao peso inicial.

Avaliações das lesões de antracnose e análises estatísticas

As avaliações foram realizadas a cada dois dias, por meio de medições das lesões com paquímetro digital, medindo-se em dois sentidos perpendiculares. Em seguida, foi calculada a área média lesionada em cm^2 nos pontos inoculados. Utilizou-se a fórmula para cálculo da área do círculo adaptada por Soares et al. (2017).

$$A = \pi r^2$$

Onde A = área média lesionada; π = constante (3,1416) e r = raio médio da lesão.

Foi calculada também a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) utilizando a fórmula proposta por Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{(y_i + y_{i+1})}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

Onde y_i = valor da doença na i-ésima observação; t_i = tempo em dias na i-ésima observação; n = número total de observações.

O teste Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk 1965) foi aplicado aos dados (variáveis área média lesionada e AACPD) para avaliar a distribuição normal usando o software R (R Core Team 2014). Na ausência da normalidade, os dados foram transformados através da função \log_{10} . Em seguida, os dados foram analisados e submetidos à análise de variância utilizando o

software Sisvar (Ferreira 2008). As variáveis significativas no teste F ($p \leq 0,05$) para o controle com película de fécula de mandioca e amido de milho individual nas concentrações 1, 2, 3 e 4% foram comparadas por regressão e os demais tratamentos combinados tiveram as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Scott e Knott 1974). Os gráficos foram plotados utilizando o programa Sigma Plot® (Systat Software Inc 2006).

Análises da ação das películas utilizando a Microscopia eletrônica de Varredura

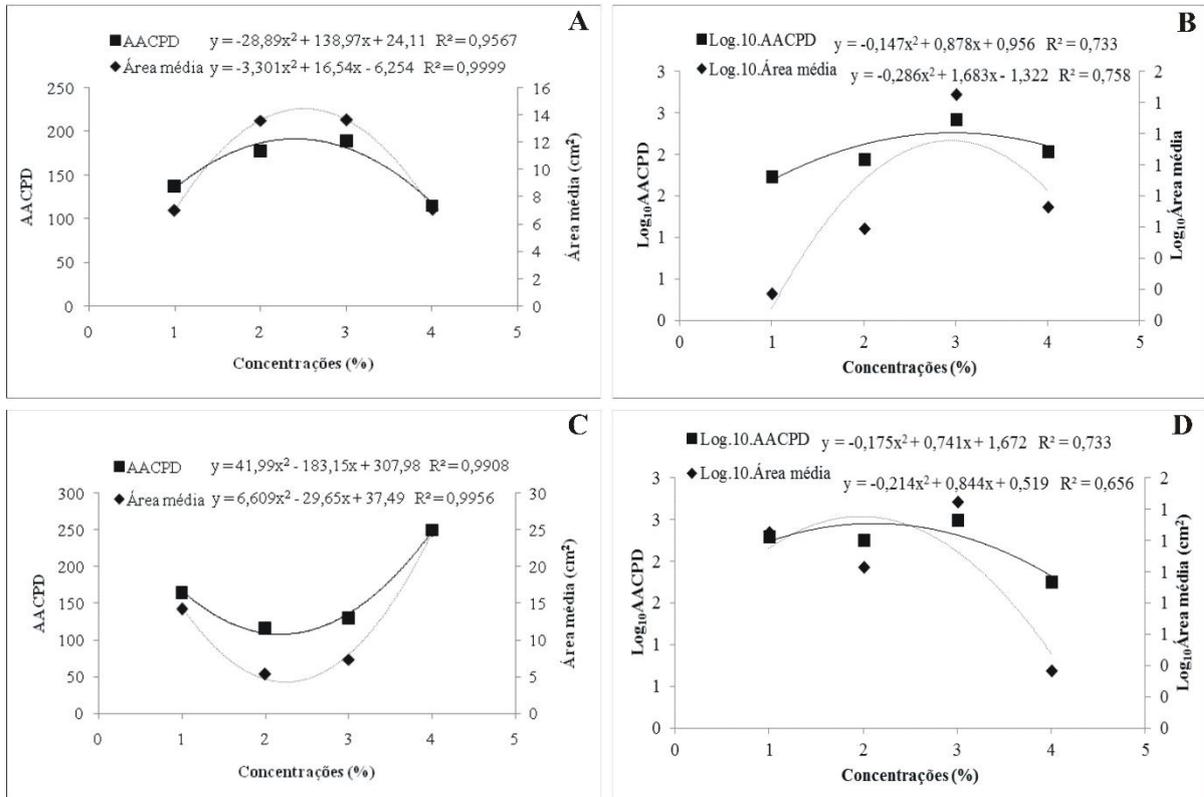
Ao final do experimento amostras de 5 mm de diâmetro dos frutos tratados com as películas foram coletadas e imersas em solução fixadora Karnovsky's, (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2 e 1% de CaCl_2 0,1 M) por um período mínimo de 24 h, em seguida as amostras foram lavadas três vezes de 10 min em tampão cacodilato de sódio a 0,02M e submetidas a desidratação em série crescente de acetona nas concentrações de 25, 50, 75, 90 e 100%. Após a desidratação, as amostras foram levadas ao ponto crítico BAL-TEC CPD 030 para a substituição da acetona por CO_2 . Os espécimes obtidos foram fixados em stubs metálicos com fita dupla-face de carbono, revestidos com papel alumínio, cobertos com ouro no evaporador BAL-TEC 050 e armazenados em dessecador contendo sílica gel para a observação em MEV LEO Evo 40 XVP. As imagens das amostras foram geradas e registradas de forma digital, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 10 mm e editadas utilizando o software Corel Draw 12.

RESULTADOS

Efeito individual da fécula de mandioca e amido de milho no controle de antracnose em abacate

Houve interação significativa entre as variáveis (AACPD e área média lesionada) com as concentrações de amido. Todos os revestimentos inibiram a área média lesionada e a AACPD da doença nos métodos curativo e preventivo (Fig. 1).

Figura 1. Área média lesionada por *Colletotrichum breidae* e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de abacateiro tratados para controle de antracnose: Forma curativa: fécula de mandioca (A) e amido de milho (B); Forma preventiva: fécula de mandioca (C) e amido de milho (D).



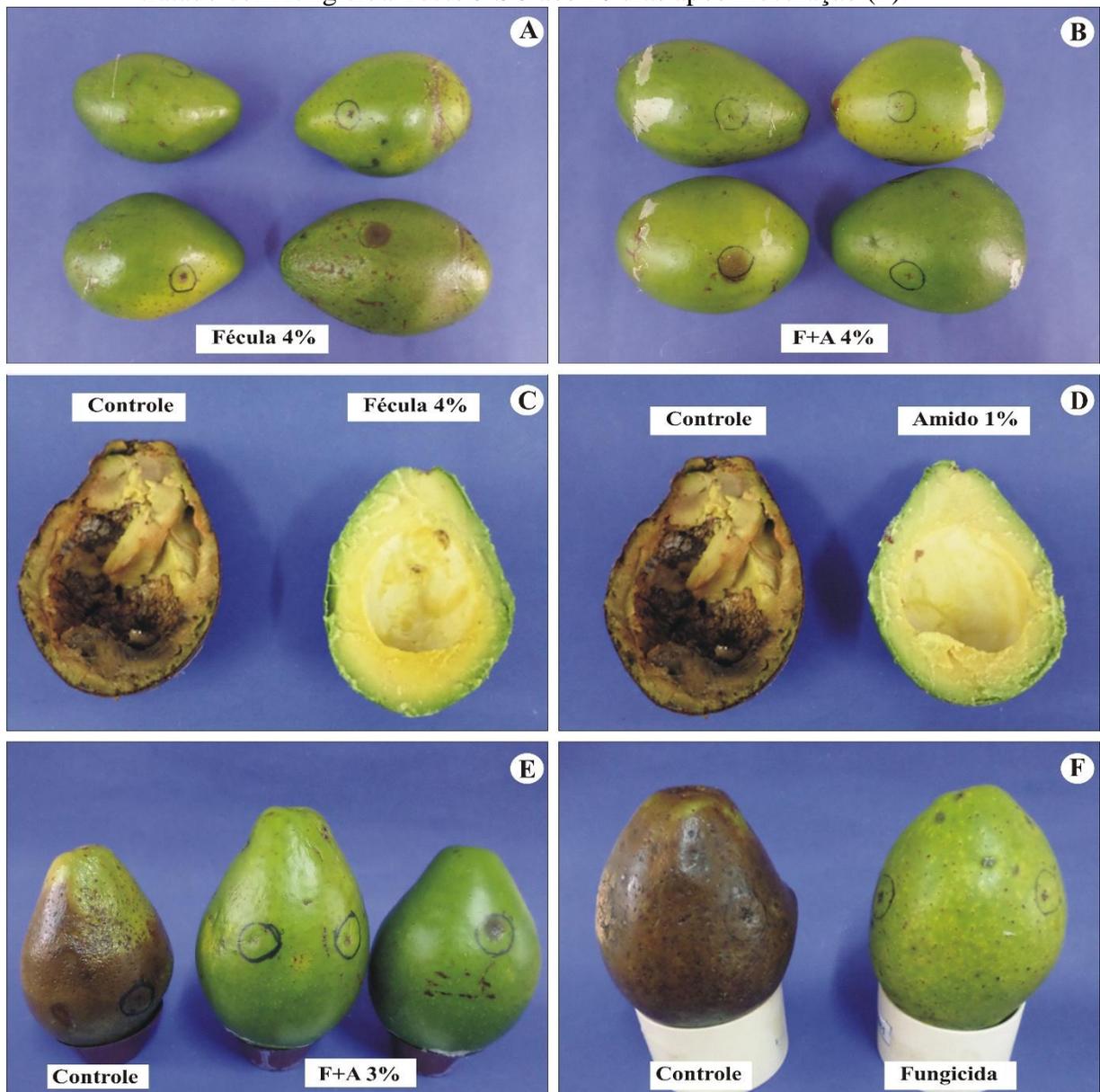
No método de controle curativo a AACPD e área média lesionada em abacates foram menores quando os frutos foram tratados com fécula de mandioca nas concentrações 1 e 4% (Fig. 1A). Com auxílio da derivada de primeira ordem do modelo de regressão ajustado, verificou-se, nas concentrações de 2,40 e 2,50% maiores valores de AACPD e área média lesionada, cujas médias foram de 190,71 e 14,46 cm², respectivamente (1A). Quando foi utilizado amido de milho a menor área média lesionada foi observada na concentração de 1% com valor de 0,075 cm² e AACPD de 1,68 (Fig. 1B). A concentração de 2,94% proporcionou maior valor de AACPD de 2,26 e área média lesionada de 1,15 cm² (1B).

No método de controle preventivo com o incremento das concentrações de 1 a 4% de fécula de mandioca houve aumento na AACPD de 166,82 para 247,22 e na área média lesionada de 14,45 cm² para 24,63 cm² (Fig. 1C). Sendo verificada através da derivada de primeira ordem do modelo de regressão ajustado, que a fécula de mandioca nas concentrações de 2,18 e 2,24%, proporcionaram menores valores de AACPD com média 108,26 e área média lesionada de 4,23 cm², respectivamente (Fig. 1C). Para o amido de milho observou-se

menores valores de AACPD e área média lesionada na concentração de 4% com médias de 1,84 e 0,47 cm² respectivamente (Fig. 1D).

Os revestimentos, além, de inibirem as lesões de antracnose em abacates (Fig. 2A e 2B), também mantiveram as polpas dos frutos intactas em relação ao controle. Nas Fig. 2C e 2D é possível observar polpas de abacates saudáveis tratados com película de fécula de mandioca 4% e amido de milho 1% individuais nos métodos curativo e preventivo, respectivamente, comparadas com o controle não tratado imerso, apenas com água destilada.

Figura 2. Fotografias de abacates cultivar Breda tratados para controle de antracnose de forma curativa com fécula de mandioca a 4% aos 16 dias após inoculação. (A-B) Frutos tratados de forma curativa com fécula 4% individual e combinando fécula + amido 4%, respectivamente; (C) Polpas de abacates tratados de forma curativa, controle e fécula de mandioca individual a 4%, e amido de milho 1% individual (D); Tratamento preventivo combinando fécula + amido 3% e o controle (E); Sintomas de antracnose em fruto inoculado e não tratado e fruto inoculado e tratado com fungicida Tecto® SC aos 16 dias após inoculação (F).

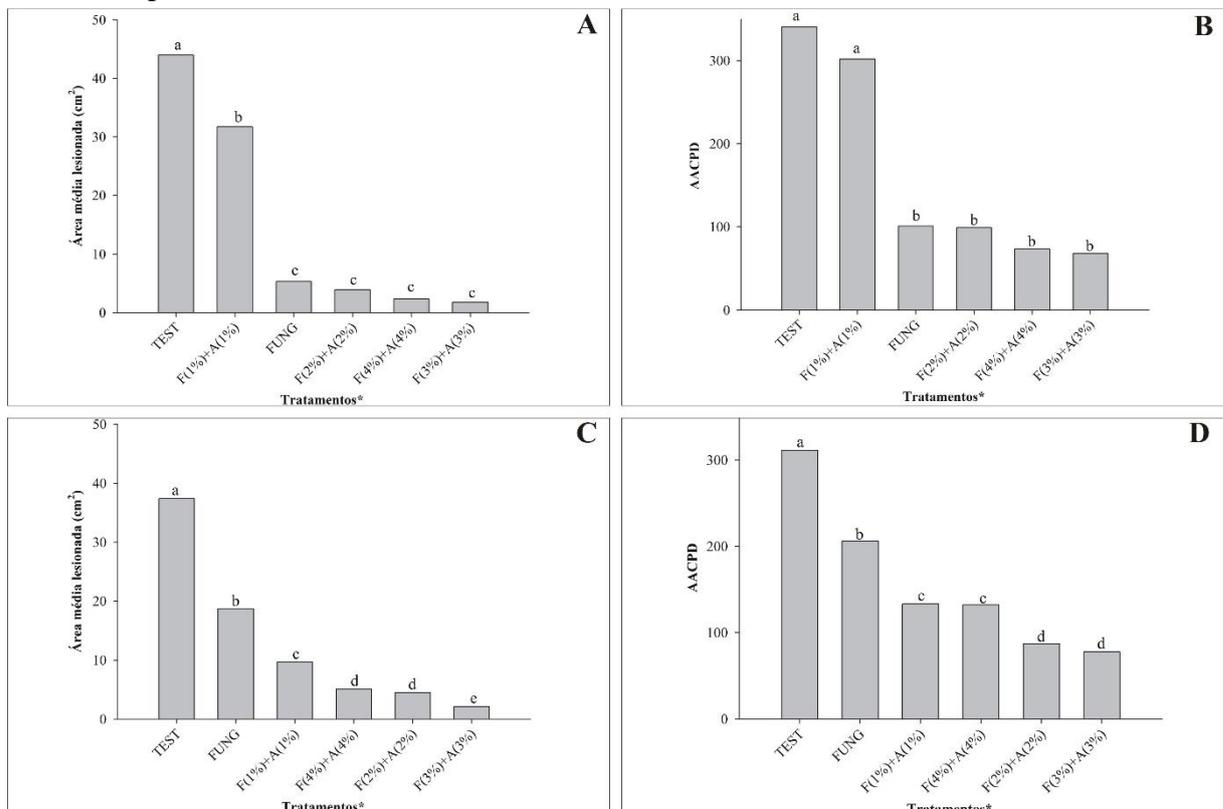


Efeito combinado da fécula de mandioca + amido de milho no controle de antracnose em abacate

A combinação da fécula de mandioca e amido de milho nas formas curativa e preventiva retardou o amadurecimento dos frutos e reduziram o aparecimento de lesões de

antracnose aos 16 dias mantidos em temperatura ambiente (Fig. 2E). A AACPD e o tamanho das lesões apresentaram o mesmo comportamento nos frutos tratados curativamente com a combinação de fécula + amido nas concentrações 2, 3 e 4%, não diferiram estatisticamente entre si (Fig. 3). As películas combinadas a 2, 3 e 4% proporcionaram inibição na área média lesionada em 3,93, 1,79 e 2,34 cm², e na AACPD em 99,00, 73,61 e 67,93, respectivamente, (Fig.3A e 3B), além disso, não diferiram do fungicida Tecto® SC, pois este inibiu as lesões de antracnose em 5,31cm², e AACPD em 101,11 (Fig. 3A e 3B), proporcionando aos frutos melhor aparência quando comparados aos frutos controle (Fig. 2F).

Figura 3. Área média lesionada em abacate na forma curativa (A) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (B), Área média lesionada em frutos de abacateiro na forma preventiva (C) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (D). TEST: testemunha; FUNG: fungicida Tecto® SC; F(1%)+A(1%): fécula de mandioca + amido de milho 1%; F(2%)+A(2%): fécula de mandioca + amido de milho 2%; F(3%)+A(3%): fécula de mandioca + amido de milho 3%; F(4%)+A(4%): fécula de mandioca + amido de milho 4%. *Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



No método de controle preventivo as combinações de fécula + amido a 2 e 3% foram mais eficiente no controle da antracnose, diferiram estatisticamente do fungicida Tecto® SC (400mL para cada 1 L de água), sendo que este não apresentou tanta eficiência, restringiu o

crescimento das lesões de antracnose apenas em 18,73 cm², e AACPD em 206,08 (Fig.3C e 3D).

Não foi verificada inibição da área média lesionada e da AACPD para o método curativo com a combinação de fécula + amido a 1% (Fig. 3A e 3B). Porém, na forma preventiva para este tratamento foi observada menores lesões de 9,70 cm² (Fig. 3C) e AACPD de 133,43 em relação ao controle (Fig. 3D).

Por meio do teste de imersão dos frutos em iodo a 2% verificou-se escurecimento gradativo nas concentrações 1, 2, 3 e 4% com as películas de fécula de mandioca e amido de milho. O escurecimento mais intenso foi verificado nos frutos revestidos com a combinação de fécula de mandioca e amido de milho 3 e 4%. Porém, houve desuniformidade de cores quando os frutos foram revestidos com película de fécula + amido de milho nas concentrações de 1 e 2%, mostrando pouca aderência da película no epicarpo dos frutos (Fig. 4A e 4B).

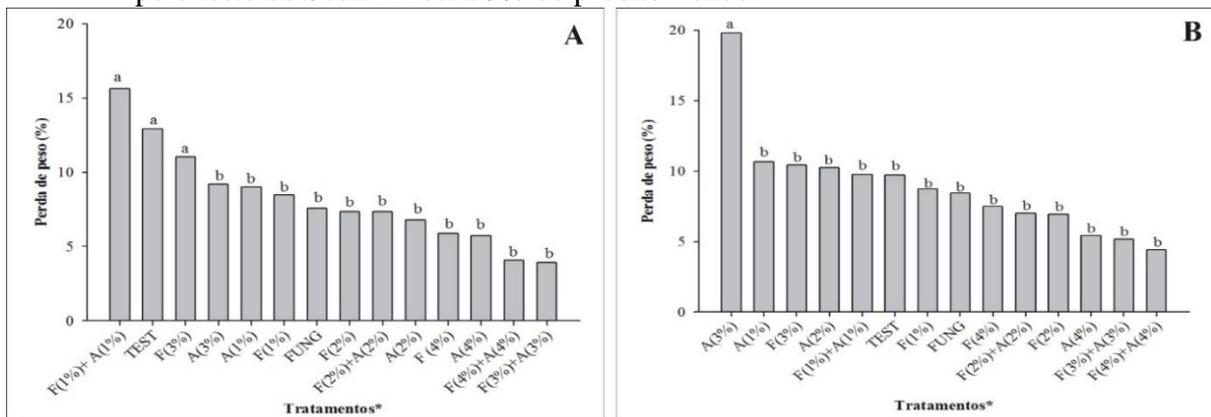
Figura 4. Fotografias mostrando a uniformidade na distribuição de revestimentos na superfície de abacate ao serem imersos em solução de iodo a 2% nas combinações de fécula + amido nas concentrações 1, 2, 3 e 4% de forma curativa (A); e na forma preventiva com as combinações da película de fécula + amido a 3 e 4% (B).



Perda de peso fresco

A perda de peso fresco foi influenciada pelos tipos de revestimentos (Fig. 5). No método curativo, os frutos cobertos com as películas de fécula de mandioca e amido de milho individuais e combinadas foram efetivos na redução da perda de peso fresco aos 16 dias de armazenamento, exceto nos tratamentos de fécula 3% individual e a combinação fécula + amido 1% foram constatados maiores perdas de peso de 11,04 e 15,63% respectivamente, não diferiram do controle no qual constatou-se 12,91% (Fig. 5A).

Figura 5. Perda de peso fresco em abacates tratados de forma curativa (A) e preventiva (B) aos 16 dias de armazenamento. TEST: Testemunha (água); FUNG: fungicida (Tecto® SC); F(1%): fécula 1%; F(2%): fécula 2%; F(3%): fécula 3%; F(4%): fécula 4%; A(1%): amido 1%; A(2%): amido 2%; A(3%): amido 3%; A(4%): amido 4%; F(1%)+A(1%): fécula 1% + amido 1%; F(2%)+A(2%): fécula 2% + amido 2%; F(3%)+A(3%): fécula 3% + amido 3%; F(4%)+A(4%): fécula 4% + amido 4%. *Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

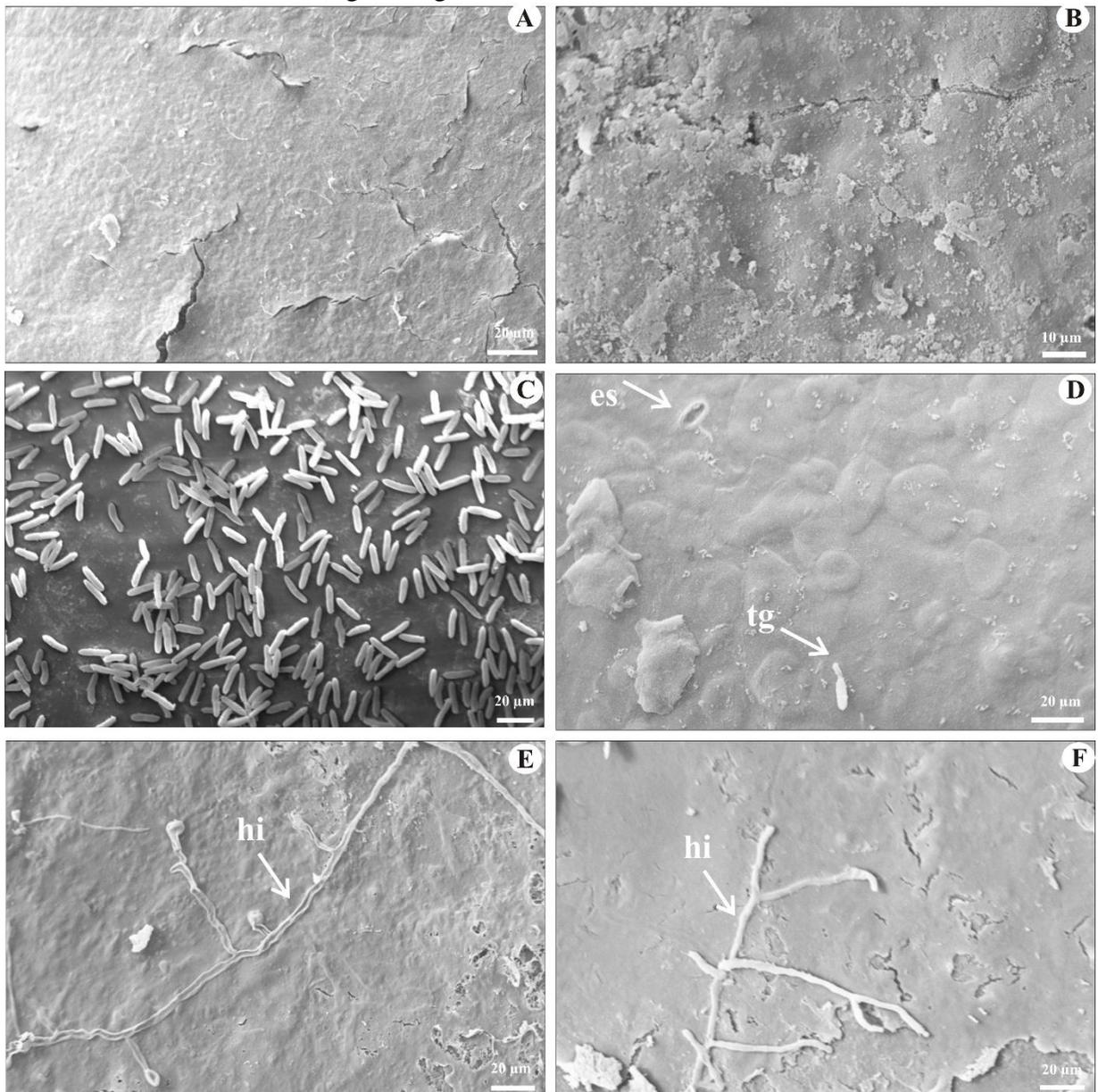


Os frutos tratados de forma preventiva apresentaram redução da perda de peso não diferindo da testemunha, na qual apresentou porcentagem na perda de peso de 9,74%. A perda mais acentuada foi verificada nos frutos tratados com amido de milho (3%) nos quais obtiveram perda de peso de 19,81% com diferença significativa dos demais revestimentos (Fig. 5B).

Ação das películas nos frutos utilizando MEV

Películas de amido de mandioca e milho nas concentrações 1 e 4% individuais e as combinações de fécula + amido de milho a 2, 3 e 4% utilizadas de forma curativa, bem como a aplicação preventiva individual de fécula de mandioca 2 e 3% e amido de milho 2% e 4%, além da combinação de fécula + amido de milho 2 e 3%, formaram uma camada protetora depositada na casca dos frutos (Fig. 6A e 6B) na qual recobriu os estômatos e ferimentos reduzindo as trocas gasosas e amadurecimento nos frutos, além de impedir a penetração do tubo germinativo do fungo. As películas ainda provocaram inibição na germinação dos conídios, deformação nas hifas promovendo atraso na colonização dos tecidos (Fig. 6 C-F).

Figura 6. Eletromicrografias de varredura de fragmentos da casca de abacate, infectadas com *Colletotrichum breidae* (A e B) camada protetora na superfície dos frutos promovida pelas películas individuais de F4% curativa e F3% preventiva, respectivamente; (C e D) conídios não germinados e crescimento lento de tubo germinativo na superfície do fruto tratado com a combinação F4% + A4% curativa; (E e F) hifas deformadas retardando a colonização resultantes da ação das películas individuais de F2% e F3%, respectivamente. F: (fécula de mandioca), A (amido de milho), hi: hifas, co: conídio, tg: tubo germinativo, es: estômato.



DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que os revestimentos em frutos de abacateiro com as películas de fécula de mandioca e amido de milho a 2, 3 e 4% combinadas no controle curativo, bem como a combinação preventiva de fécula de mandioca + amido de milho 2 e 3% foram efetivas contra a antracnose em abacate, além de manter a qualidade do fruto por até 16 dias.

Além dos revestimentos combinados terem sido eficientes no controle da antracnose, a utilização individual da fécula de mandioca 1 e 4% e amido de milho 1 e 2% também reduziram a área média lesionada dos frutos quando utilizados de forma curativa. Resultados semelhantes foram evidenciados na conservação de frutos pós-colheita como no pimentão quando tratado com fécula de mandioca 4% (Moreira et al. 2017), e frutos de mangueira com fécula de mandioca 2% e amido de milho 4% (Santos et al. 2011). Handayani et al. (2018), aplicaram revestimento de fécula de mandioca nas concentrações 3, 4 e 5% em abacate, e observaram boa aparência dos frutos, firmeza e pH, além de prolongar o tempo de prateleira. De forma preventiva as concentrações individuais 2 e 3% de fécula de mandioca, e amido de milho a 2 e 4% promoveram uma menor área média lesionada e AACPD. Da mesma forma, Oliveira et al. (2016) observaram controle da antracnose em frutos de mamoeiro tratados com fécula de mandioca na concentração 3%.

Quando o fungicida Tecto® SC foi aplicado de modo curativo verificou-se mais eficiência em relação ao modo preventivo, minimizou as lesões em frutos de abacateiro em comparação com a testemunha. Entretanto, a utilização da combinação fécula de mandioca + amido de milho a 2 e 3% aplicada de forma preventiva, foi mais eficiente que o fungicida no controle da doença.

Revestimentos de superfície podem diminuir a permeabilidade da casca de frutos, modificar a atmosfera interna, reduzir a perda de água, baixar a taxa de respiração do fruto, além de atrasar a senescência, a qual torna o fruto mais vulnerável à infecção patogênica resultando em perda da integridade celular ou do tecido (Bai et al. 2003; Tanada-Palmu e Grosso 2005). A fécula de mandioca forma um filme resistente, transparente e eficiente que reduz a perda de água mantendo a qualidade dos frutos e vegetais devido a conservação de suas características organolépticas e manutenção de uma boa apresentação visual (Vila 2004). O amido de milho não só prolonga a vida de prateleira, mas também preserva a qualidade durante o armazenamento fornecendo barreiras seletivas a transferência de umidade, absorção de oxigênio, perdas de aromas voláteis e agradável aspecto visual (Ghosh et al. 2015).

A combinação de mais de um revestimento seja ambos à base de polissacarídeos ou de polissacarídeos com um lipídeo ou proteína tem sido alvo de muitos estudos. Neste estudo as combinações 2 e 3% de fécula de mandioca + amido de milho foram eficientes em restringir o aumento da AACPD e lesões da antracnose em frutos tratados de forma curativa e preventiva. Diversos trabalhos também verificaram eficiência de produtos alternativos em manter a qualidade pós-colheita em diversos frutos. Praseptiangga et al. (2017) observaram eficiência no revestimento comestível de amido de mandioca incorporado com óleo essencial de erva-de-limão (1%) na qualidade de mamão. Ambarsari et al. (2017) verificaram que a incorporação de fécula de mandioca nas concentrações 1, 2 e 3% com ácido cítrico nas concentrações 0,5 e 1,0% prolongaram a qualidade e a vida útil dos frutos de tomateiro. O revestimento à base de amido de mandioca e quitosana a 50% inibiu o crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* e manteve a qualidade dos frutos de mangueira (Oliveira et al. 2017b).

Durante o período de 16 dias em que os frutos permaneceram em temperatura ambiente, houve crescente perda de peso nos tratamentos utilizados, sendo a menor perda de 5% observada nas combinações de fécula + amido 3 e 4% nas formas curativa e preventiva, respectivamente. Comportamentos semelhantes foram observados por Coelho et al. (2017) nos quais verificaram menor porcentagem de perda de peso em tratamentos que continham revestimento de fécula de mandioca 3% e a fécula combinada com antioxidantes. Da mesma forma, cobertura com fécula de mandioca a 4% condicionou menor perda de peso em pimentões apresentando perdas máximas de 8,90% (Moreira et al. 2017). Em frutos de mangueira foi evidenciada menor perda de peso quando os frutos foram tratados com amido de milho a 2, 4 e 6% e fécula de mandioca a 2, 4 e 6% (Santos et al. 2011). Menor perda de peso de 4,9% foi constatada em frutos de mangueira revestidos com combinação de fécula de mandioca e quitosana a 5% (Camarati et al. 2011). Segundo Chitarra e Chitarra (2005), filmes de amido podem aumentar a vida útil pós-colheita de frutos ao minimizar a perda de água por transpiração, devido possivelmente à alta natureza higroscópica do amido, além de que frutos revestidos com películas de polissacarídeos tendem a retardar a perda de peso em razão do gel aplicado no qual permite a perda da umidade antes que o fruto revestido seja secado (Bourtoom 2008). Por outro lado, revestimentos de amido têm boas propriedades mecânicas e boa linearidade das moléculas de amilose em solução, o que favorece boa orientação paralela para a formação de filmes resistentes e protetores (Mali et al. 2010).

Tratamentos que não foram eficientes em minimizar lesões em abacates também apresentaram maior perda de peso, como no caso da aplicação da fécula de mandioca 3%

individual e combinação de fécula + amido a 1% de forma curativa, e amido de milho 3% individual aplicado de forma preventiva. Resultados semelhantes foram verificados em frutos de goiabeira revestidos com película de fécula de mandioca a 2 e 6% aos 12 dias de armazenamento não apresentaram redução da perda de peso, sendo observada menor redução com aplicação de revestimentos de pectina a 2 e 4% (Quirino et al. 2018). Da mesma forma, Souza et al. (2009) verificaram maior perda de peso de 14,7% nos frutos tratados com filme de fécula de mandioca a 3%. Em cajás tratados com película de fécula de mandioca a 3% foi observada maior perda de peso de 10,76%, seguido do controle (Freitas et al. 2017).

A microscopia é uma ferramenta muito importante para explicar processos relacionados ao desenvolvimento das doenças no hospedeiro, bem como registrarem o modo de ação de produtos alternativos sobre as estruturas dos fitopatógenos (Pereira e Pereira, 2007). Trabalhos relataram barreiras formadas por revestimentos de amido nas quais recobrem os estômatos restringindo as trocas gasosas de CO₂ e O₂, o que poderia retardar o amadurecimentos dos frutos e impedir o desenvolvimento de *Colletotrichum breidae* (Assis 2009). Neste estudo os tratamentos eficientes em controlar as lesões de antracnose promoveram a formação da camada protetora em abacate, desenvolvendo algumas estrias e rachadura devido a perda de umidade. Oliveira et al. (2017), verificaram em frutos de mamoeiro revestidos com fécula de mandioca barreiras que impediram o amadurecimento dos frutos e desenvolvimento de *C. gloeosporioides*. Na película 3% os autores observaram uma camada protetora mais completa sem quebra do revestimento de gel de amido. Basiak et al. (2017) estudaram as propriedades de filmes de amido e verificaram maior espessura e rigidez em filmes com alto teor de amilose, além de formarem uma barreira maior ao teor de água e trocas gasosas.

Os revestimentos de amido influenciaram nas fases de germinação e colonização do patógeno razão esta que pode explicar a inibição nas lesões da antracnose em abacate. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos. Pereira et al. (2011) evidenciaram uma atividade direta na redução da germinação e no desenvolvimento micelial de *Cercospora coffeicola* pelo efeito fungitóxico dos óleos essenciais de citronela e canela. Afinamento da parede, redução do diâmetro das hifas em *Aspergillus niger* e ausência de conidióforos, foram promovidas pela ação do óleo essencial de laranja (Sharma e Tripathi 2006).

CONCLUSÃO

As aplicações de películas individuais de fécula de mandioca 1 e 4% e amido de milho 1%, e das combinações de fécula + amido de milho a 2, 3 e 4% no controle curativo, bem como as aplicações preventivas da fécula de mandioca 2% e amido de milho 4% individuais e das combinações de fécula + amido de milho a 2 e 3%, minimizam o tamanho das lesões de antracnose em abacate e aumentam a vida útil dos frutos, podendo ser indicadas aos produtores a fim de reduzir perdas na pós-colheita. O provável mecanismo de controle da doença fornecido pelos revestimentos está relacionado ao atraso no amadurecimento dos frutos, e a formação de uma camada protetora na superfície dos mesmos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado destinada ao primeiro autor e bolsa produtividade em pesquisa ao último autor. A fazenda de abacates localizada em Carmo da Cachoeira – MG, ao proprietário José Antônio Bonella, ao gerente Eduardo Facci e ao auxiliar Kayro por cederem os abacates para o experimento.

REFERÊNCIAS

- Ambarsari, I., Oktaningrum, G. N., Endrasari, R. (2017). Effectiveness of incorporating citric acid in cassava starch edible coatings to preserve quality of Martha tomatoes. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 102, 012073.
- Assis, O. B. G., Britto, D., Forato, L. A. (2009). O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas in natura e minimamente processadas. EMBRAPA Instrumentação Agropecuária 29 (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento), 23p.
- Bai, J., Victorine, A., Hagenmaier, R. D., Mattheis, J. P., Baldwin, E. A., (2003). Formulation of zein coatings for apples (*Malus domestica* Borkh). Postharvest Biol. Technol, 28, 259–268.
- Basiak, E., Lenart, A., Debeaufort, F. (2017). Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films. International journal of biological macromolecules. 98, 348-356.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. International Food Research Journal, 15, 237-248.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, Acesso em: 07 fev. 2019.

Camatari, F. O. D. S., et al. (2017). Impact of edible coatings based on cassava starch and chitosan on the post-harvest shelf life of mango (*Mangifera indica*) 'Tommy Atkins' fruits. Food Science and Technology, AHEAD, 0-0.

Campos, R. P., Kwiatkowski, A., Clemente, E. (2011). Conservação pós-colheita de morangos recobertos com fécula de mandioca e quitosana. Ceres, 58, 554-560.

Campos, C. A., Gerschenson, L. N., Flores, S. K. (2010). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. Food and Bioprocess Technology, 4, 849-875.

Chitarra, M. L. F., Chitarra, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças - Fisiologia e Manuseio. Lavras: UFLA, 2005.785p.

Coelho, D. G., Andrade, M. T. D., Neto, M., Ferreira-silva, S. L., Simões, A., Nascimento, D. (2017). Application of antioxidants and edible starch coating to reduce browning of minimally-processed cassava. Revista Caatinga, 30, 503-512.

Daiuto, É. R., Vieites, R. L., Tremocoldi, M. A., Carvalho, L. R. D., Fumes, J. G. F. (2013). Postharvest of 'Hass' avocados submitted to UV-C radiation. Revista Colombiana de Ciências Hortícolas, 7, 149-160.

Ferreira, D. F. (2008). Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium, 6, 36-41.

Fischer, H. I., Tozze Júnior, H. J., dArruda, M. C., Massola Júnior, N. S. (2011). Pós-colheita de abacates 'Fuerte' e 'Hass': características físicas e químicas, danos e controle de doenças. Semina: Ciências Agrárias, 32, 209-220.

Freitas, R. A., Gorinb, P. A. J., Nevesa, J., Sierakowski, M. R. (2003). A rheological description of mixtures of a galactoxiloglucan with high amylose and waxy corn starches. Carbohydrate polymers, 51, 25-32.

Food and agriculture organization of the United Nations (2016). Produção de abacate. Disponível em: <http://www.fao.org/>. Acesso em: 06 fev. 2019.

Freitas, R. V. S., Souza, P. A., Coelho, E. L., Souza, F. X., Beserra, H. N. B. R. (2017). Storage of mombin fruits coated with cassava starch and pvc film. Revista Caatinga, 30, 244-249.

Ghosh, A., Dey K., Bhowmick N. (2015). Effect of corn starch coating on storage life and quality of Assam lemon (*Citrus limon* Burn.) Journal Crop and Weed, 11,101-107.

Handayani, M. N., Karlina, S., Sugiarti, Y., Cakrawati, D. (2018). Application of edible coating from cassava peel-bay leaf on avocado. In: Journal of Physics: Conference Series, 1013, 1-8.

Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2058-2076.

Kimaru, S. K., Monda, E., Cheruiyot, R. C., Mbaka, J., Alakonya, A. (2018). Morphological and Molecular Identification of the Causal Agent of Anthracnose Disease of Avocado in Kenya. *International journal of microbiology*, 2018, 1-10.

Mali, S., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F. (2010). Starch films: production, properties and potential of utilization. *Semina-Ciencias Agrárias*, 31, 137-55.

Mardigan, L., Kwiatkowski, A., Castro, J., Clemente, E. (2014). Application of Biofilms on Fruits of Avocado (*Persea Americana* Miller) in Postharvest. *International Journal of Sciences*, 3, 35-45.

Moreira, E. G. S., Sanches, A. G., Silva, M. B., Macedo, J., Cordeiro, C. A. M., Costa, S. S. C. (2017). Use of edible film in the postharvest conservation of 'Magali' sweet pepper. *Scientia Agraria Paranaensis*, 16, 120-126.

Oliveira, B. F., Cruz, A. F., Alves, E. (2016). Cassava starch coatings for postharvest control of papaya anthracnose. *Phytopathologia Mediterranea*, 55, 276.

Oliveira, T. A., Paiva, C. A., Silva, A. C., Costa, T. L. E., Nascimento, L. V., Lima leite, R. H., Aroucha, E. M. M. (2017). Tommy Atkins mango (*Mangifera indica* L.) postharvest quality with cassava starch, chitosan and pectin based coatings. *African Journal of Biotechnology*, 16, 1596-1610a.

Oliveira, K. Á. R., Berger, L. R. R., Araújo, S. A., Câmara, M. P. S., Souza, E. L. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food microbiology*, 66, 96-103b.

Pereira, O. L., Pereira, J. F. Microscopia e suas aplicações no estudo das interações fungo-planta. In: Alfenas, A. C., Mafia, R. G. (Ed.). *Métodos em fitopatologia*. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 221-252.

Pereira, R. B., Lucas, G. C., Perina, F. J., Resende, M. L. V. D., Alves, E. (2011). Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia*, 35,115-123.

Praseptiangga, D., Utami, R., Khasanah, L. U., Evirananda, I. P. (2017). Effect of cassava starch-based edible coating incorporated with lemongrass essential oil on the quality of papaya MJ9. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 176, 012054.

Quirino, A. K. R., Souza Costa, J. D., Neto, A. F., Sousa Costa, M., Sánchez-Sáenz, C. M. (2018). Conservation of " Paluma " guavas coated with cassava starch and pectin. *Dyna*, 85, 344-351.

- R Core Team, (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. Accessed 03 nov. 2014.
- Santos, A. E., Assis, J. A., Berbert, P. A., Santos, O. O., Batista, P. F., Gravina, G. A. (2011). Influência de biofilmes de fécula de mandioca e amido de milho na qualidade pós-colheita de mangas 'Tommy Atkins'. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6, 508-513.
- Scott, A. J., Knott, M. (1974). A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30, 507-512.
- Sefu, G., Satheesh, N., Berecha, G. (2015). Effect of essential oils treatment on anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease development, quality and shelf life of mango fruits (*Mangifera indica* L). *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci*, 15, 2160-2169.
- Shaner, G., Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildew resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67, 1051-1056.
- Shapiro, S. S., Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Sharma, N., Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 587-593.
- Silva-Rojas, H. V., Ávila-Quezada, G. D. (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60, 899-908.
- Soares, M. G. O., Alves, E., Freitas, A. S. (2017). Influência da inoculação e do molhamento no desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana, *Agrotrópica*, 29,14-18.
- Souza, P. A., Aroucha, E. M. M., Souza, A. E., Costa, A. R., Ferreira, G. S., Bezerra Neto, F. (2009). Conservação pós-colheita de berinjela com revestimentos de fécula de mandioca ou filme de PVC. *Horticultura brasileira*, 27, 235-239.
- Systat Software I. (2006) SigmaPlot for Windows Version 10.0 In, 10.0 edn. Systat Software Inc.
- Tanada-Palmu, P. S., Grosso, C. R. F. (2005). Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Postha. Biol.Tech*, 36, 199-208.
- Tozze Júnior, H. J., Firmino, A. C., Fischer, I. H., Furtado, E. L., Massola Júnior, N.S. (2015). Characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo. *Summa Phytopathologica*, 41:270-280.
- Tremocoldi, M. A., Rosalen, P. L., Franchin, M. Massarioli., AP, Denny, C., Daiuto, É. R., Paschoal, J. A. R., Melo, P. S., Alencar, S. M. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PloS one*, 13: e0192577.

Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., Gonzalez-Martinez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48:496-511.

Vila, M. T. R. Qualidade de goiaba 'Pedro Sato' armazenados sob refrigeração e atmosfera modificada por biofilme de fécula de mandioca. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal Lavras, Lavras, 2004.

Weber, F. H., Collares-queiroz, F. P., Chang, K. Y. (2009). Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29,748-753.

Zobel, H. F., Stephen, A. M. Starch: structure, analysis, and application. Zobel, H. F., Stephen, A. M. Starch: structure, analysis and application. (1995) In: Stephen, A. M. Food polysaccharides and their application. New York: Marcel Dekker,19-66.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies *C. karstii*, *C. dianesei*, *C. communis* e *C. bredae* sp. nov. pertencentes aos complexos *Colletotrichum boninense* e *Colletotrichum siamense* estão associadas a antracnose do abacate no Brasil. Esta informação é considerada o primeiro relato no país, sendo de extrema importância o conhecimento do agente etiológico da doença para melhor aplicar as medidas de controle e prolongar a vida útil dos frutos.

C. bredae sp. nov. germinou entre 6 e 12 hai e penetrou por meio de ferimentos 48 hai. Entretanto, a inoculação foi realizada apenas por meio de ferimentos, assim, futuro estudo deve ser realizado fazendo inoculação diretamente na superfície do fruto e esclarecer o mecanismo bioquímico da preferência do patógeno por tal via de penetração.

As aplicações de películas à base de amido individuais e combinadas podem minimizar o tamanho de lesões de antracnose em abacate nas formas preventiva e curativa, além de substituir o uso de fungicidas. Contudo, trabalhos complementares fazem-se necessários para melhor investigar o mecanismo de ação de películas em frutos de abacateiro que o fungo já se encontra presente desde o campo.