



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* CAUSADORAS DE PODRIDÃO-DA-UVA-MADURA NA REGIÃO DE TUPI PAULISTA.

Ana Carolina Firmino¹, Marcela Pagoti Bergamini-Lopes¹, Larissa Escalfi Tristão¹, Izabela Ponso Magalhães¹, Hugo Tozze Junior¹, .

¹UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena/SP; e-mail: anacarfir@gmail.com.

RESUMO - Nas uvas de mesa, diversas doenças são descritas em pós-colheita, sendo Podridão da uva madura causada por *Colletotrichum* sp., umas das que causam maiores perdas, pois depreciam o produto final. A região de Tupi Paulista é uma das maiores produtoras de uva na região de São Paulo, e vem tendo grandes prejuízos com a ocorrência desta doença no ano de 2017. De acordo com relatos e visitas aos produtores da região, os fungicidas comumente usados para controle desta doença já não estão mais sendo efetivos. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo identificar molecularmente espécies de *Colletotrichum* associadas a podridão da uva madura na região de Tupi Paulista, Estado de São Paulo. Todos os isolados tiveram seu DNA extraído, e em seguida foi realizada a amplificação da região ITS-5.8S rDNA. A partir da edição dos fragmentos previamente seqüenciados foi realizada a similaridade dessas sequências no NCBI. Das 20 amostras obtidas, 12 foram sequenciadas. Com base na região ITS foram encontradas as seguintes espécies *C. siamense*, *C. asianum* e *C. gloeosporioides*, sendo esta última a que predominou.

Palavras-chave: *Vitis* sp., pós-colheita, caracterização.

INTRODUÇÃO

O cultivo de uva de mesa tem demonstrado grande importância e representatividade econômica na região da Nova Alta Paulista. Com o uso de irrigação, esta região produz dois ciclos anuais, um para a safra principal nos meses de julho a novembro, época de maior escassez no mercado, e outro ciclo para uma "safrinha" no primeiro semestre (MELO, 2015). Tupi Paulista possui maior área de plantio, com 83 mil pés e produção estimada em 581 mil caixas de sete quilos. Em seguida, vem as cidades de Santa Mercedes, com 14 mil pés e produção prevista de 42 mil caixas e Dracena, com 4.400 pés e produção de 11 mil caixas (IBGE, 2013).

Nas uvas de mesa, diversas doenças são descritas em pós-colheita, como a Podridão mole (*Rhizopus stolonifer*), Mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) e Podridão da uva madura (*Colletotrichum gloeosporioides*) (ROMA, 2013), sendo esta última a problemática das propriedades produtoras de Tupi Paulista. De acordo com relatos e visitas aos produtores da



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

região, os fungicidas comumente usados para controle desta doença já não estão mais sendo efetivos.

Sabe-se que a ocorrência de duas ou mais espécies de *Colletotrichum* parasitando um mesmo hospedeiro pode dificultar o controle da antracnose. Este fato se deve ao comportamento diferenciado entre espécies, como já foi verificada para a antracnose do pimentão no Brasil, doença causada por *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides*, as quais apresentam sensibilidade diferenciada aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (TOZZE JUNIOR, 2006; FIRMINO et al., 2014)

Apenas *Colletotrichum gloeosporioides* é citado como agente causal da podridão da uva madura (AMORIN et al., 2016). Entretanto, é comum que mais de uma espécie deste patógeno cause antracnose em um mesmo hospedeiro, a exemplo do que ocorre com o abacateiro, com o maracujazeiro, e com atemóia que, em alguns países, podem ser causadas por *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense* (GUERBER et al, 2003; ALMEIDA, COELHO, 2007; TOZZE JUNIOR, 2007, FIRMINO et al., 2014, TOZZE JUNIOR, 2011).

Com base nestas informações o presente trabalho teve como objetivo identificar molecularmente espécies de *Colletotrichum* associadas podridão da uva madura na região de Tupi Paulista, Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – SP.

As bagas de uva ‘Isabel’ infectadas pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foram obtidas nas propriedades visitadas em Tupi Paulista - SP. Fragmentos do material coletado foram desinfestados superficialmente com álcool 70%, NaClO a 2% e água esterilizada, para o isolamento do fungo e colocados em meio de cultura contendo 2% de ágar e as placas foram incubadas a 25±1°C em fotoperíodo 12 h. Dois dias após o aparecimento de hifas em torno dos fragmentos utilizados, estas foram transferidas para placas contendo meio BDA e incubadas nas



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

mesmas condições citadas anteriormente. Destas colônias foram obtidas colônias monospóricas conforme metodologia descrita por Tozze Junior (2006).

A extração de DNA dos isolados coletados foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (15). A região ITS-5.8S rDNA foi amplificada com os pares de oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 4 conforme a metodologia descrita por Firmino et al. (2014). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta. Para seqüenciamento dos fragmentos amplificados, 100 µL do produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®). As seqüências de DNA obtidas foram alinhadas e editadas no programa Bioedit. As árvores filogenéticas foram processadas com o programa Mega 5.05 utilizando o método "jukes-cantor" para a construção da matriz de distâncias, pelo método de Neighbor-Joining. Foi realizado um "bootstrap" com 10.000 replicações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram obtidos 20 isolados de 3 produtores diferentes. Estas amostras foram agrupadas por características culturais e morfológicas e assim foram sequenciadas 12 amostras representantes de cada grupo formado. Com base na região ITS foram encontradas as seguintes espécies *C. siamense* (Produtor 1), *C. asianum* (produtor 2) e *C. gloeosporioides* (produtores 1, 2 e 3), sendo esta ultima a que predominou (Tabela 1).

Esta é a primeira vez que *C. siamense* e *C. asianum* são relatados causando podridão em bagas de uva. Sabe-se da importância do sequenciamento de mais de uma região do DNA para confirmação da identidade destas espécies de fungo, porém, segundo Weir, Johnston e Damm (2012), análises filogenéticas com base nas seqüências de ITS das espécies pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* formam clados fortemente suportado. Neste caso as espécies de *Colletotrichum* encontradas fazem parte do complexo *C. gloeosporioides*.

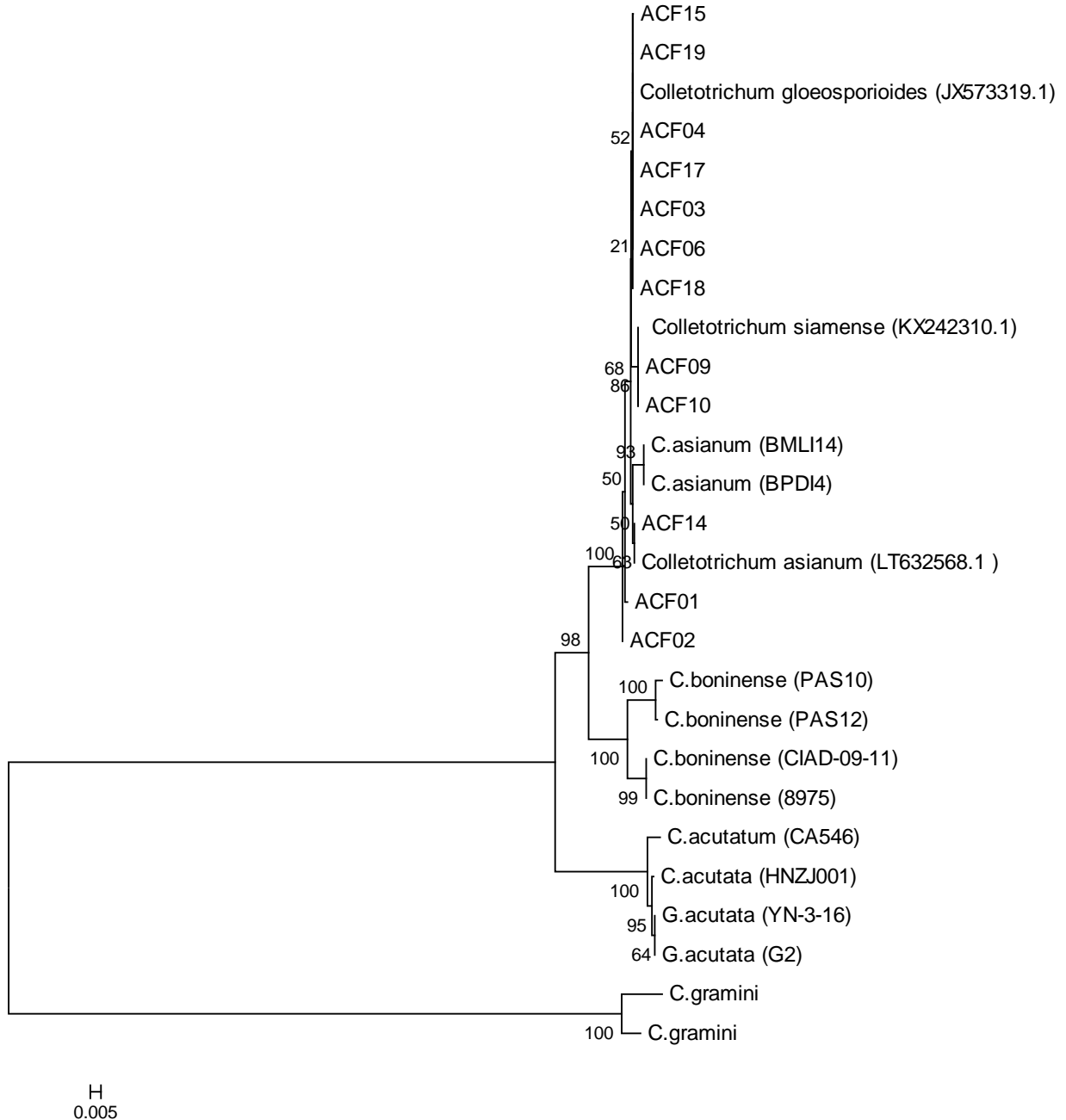
Estes resultados se mostram importantes do ponto de vista do manejo do patógeno no campo, já que uns dos principais problemas nesta região são os sucessivos relatos dos produtores de que os produtos químicos usados para controle da podridão da uva madura não são efetivos. Isso pode estar ligada a esta variabilidade genética, visto que há relatos de que há comportamento



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

diferenciado entre espécies em relação a sensibilidade diferenciada a alguns fungicidas (TOZZE JUNIOR, 2006).



CONCLUSÃO



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

Com base na região ITS foram encontradas as seguintes espécies *C. siamense* (Produtor 1), *C. asianum* (produtor 2) e *C. gloeosporioides* (produtores 1, 2 e 3), sendo esta última a que predominou

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.C.C.; COELHO, R.S.B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 32, n. 4, p. 318-328, 2007.
- CASTILLO et al. Antifungal efficacy of Aloe vera in vitro and its use a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.57, p.183-188, 2010.
- FIRMINO, et al . Identificação de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose em plantas de atemóia e colonização do fungo nos frutos. *Summa phytopathol.*, Botucatu , v. 40, n. 4, p. 323-328, 2014 .
- GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J.C.; JOHNSTON, P.R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, Lancaster, v. 95, n. 5, p. 872-895, 2003.
- IBGE : Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013) Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/comparamun/compara.php?lang=&coduf=35&idtema=136&codv=v174&search=sao-paulo|dracena|sintese-das-informacoes-2013>> acesso em jun. de 2016.
- LYON, G. D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease control compounds: the potential to immunize plants against infection. **Plant Pathology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 407-427, 1995.



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

- MELLO, L. M. R. (2015) Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015. Disponível em: <
<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-davitivinicultura-brasileira-em-2015>> acesso em jun. de 2016.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of highmolecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, Oxford, v.8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.
- OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; GURGEL, L. M. S. Indução de resistência em doenças pós-colheita em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 12, p. 343-371, 2004.
- ROMA, Rafaela Carolina Constantino. **Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva 'Itália' e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer***. 2013. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, 2013.
- TOZZE JÚNIOR, H.J.; FISCHER, I.H.; CÂMARA, M.P.S.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil. Australasian Plant Disease Notes, Orange, v. 5, p. 70-72, 2010.
- 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, 2006.
- WEIR, B. S., JOHNSTON, P. R., & DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180, 2012.