



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**Identificação da espécie de *Colletotrichum* causadora da
antracnose em jiló e avaliação do controle da doença com
quitosana em pós-colheita.**

BRUNO FERREIRA DE OLIVEIRA

Brasília – DF

2017

BRUNO FERREIRA DE OLIVEIRA

Identificação da espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose em jiló e avaliação do controle da doença com quitosana em pós-colheita

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Ailton Reis, Dr.

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL - BRASIL

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Bruno Ferreira

Identificação da espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose em jiló e avaliação do controle da doença com quitosana em pós-colheita. / Bruno Ferreira de Oliveira.

Brasília, 2017.

81p.: il.

Tese de Doutorado. Programa de Pós - Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Solanum aethiopicum* - *Colletotrichum tamarilloi*.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Identificação da espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose em jiló e avaliação do controle da doença com quitosana em pós-colheita.

Aos meus pais Sinaldo Bento de Oliveira e Eronilde dos Santos Ferreira de Oliveira, às minhas irmãs Bruna e Brunela e, aos meus sobrinhos Vinícius e Vítor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade de Brasília (UnB) pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças CNPH - Embrapa Hortaliças onde foram conduzidos todos os experimentos.

Ao meu orientador Ailton Reis por todos os ensinamentos, pelos incentivos constantes e pela confiança que tem depositado em mim.

À Dra. Lucimeire Pilon pela contribuição e por permitir o uso do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CNPH - Embrapa Hortaliças.

Ao estatístico do CNPH Antônio Moita pela ajuda nas análises.

Às Dras. Stela Dalva Vieira Midlej Silva e Edna Dora Martins Newman Luz por me apoiarem e me ajudarem a trilhar o caminho da ciência.

À Christiane Almeida e Flávia Nery pelas companhias e por me ajudarem nas análises do trabalho sem medir esforços.

Aos funcionários Fabiana, Luana e Wagner do Laboratório de Fitopatologia do CNPH - Embrapa Hortaliças pelos ensinamentos e harmonioso convívio.

Aos funcionários Ricardo, Deusânio e João do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CNPH - Embrapa Hortaliças por também contribuírem para aumentar o meu aprendizado e pelo harmonioso convívio.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia e de outros laboratórios do CNPH - Embrapa Hortaliças: Cléia Cabral, Déborah Cristina, Elenice Barboza, Grecy Mirian, Luiz Henrique,

Pedro Henrique e Rafaela Borges pelos momentos de alegria, pelos incentivos e, por vezes, terem me ajudado.

Aos funcionários e colegas de outros setores do CNPH - Embrapa Hortaliças e da pós-graduação dos Departamentos de Fitopatologia, Agronomia e Biologia Molecular da UnB pelos serviços prestados e companheirismo.

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Dr. Ailton Reis**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE *Colletotrichum* CAUSADORA DA ANTRACNOSE EM JILÓ E AVALIAÇÃO DO CONTROLE DA DOENÇA COM QUITOSANA EM PÓS-COLHEITA.

BRUNO FERREIRA DE OLIVEIRA

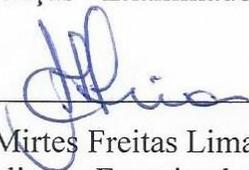
TESE APROVADA em 31/10/2017 por:



Dr. Robert Neil Gerard Miller
Universidade de Brasília - Examinador interno



Dr. Carlos Alberto Lopes
Embrapa Hortaliças - Examinador externo



Dra. Mirtes Freitas Lima
Embrapa Hortaliças - Examinadora externa



Dr. Ailton Reis
Embrapa Hortaliças - Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL

2017

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Olericultura.....	4
2. <i>Solanaceae</i>	4
3. <i>Solanum aethiopicum</i> L.....	5
4. Principais doenças do jiloeiro.....	6
5. Antracnose do jiló.....	7
6. <i>Colletotrichum</i>	8
7. Controle da antracnose do jiló.....	12
8. Revestimentos comestíveis.....	13
9. Quitina e quitosana.....	14
10. LITERATURA CITADA.....	15
CAPÍTULO II: ESTABELECIMENTO DE MÉTODO DE INOCULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> OBTIDOS DE JILÓ	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Local de condução dos experimentos.....	29
2.2. Obtenção e assepsia dos jilós para inoculação.....	29
2.3. Metodologia de inoculação de <i>Colletotrichum</i> sp. em jiló.....	29
2.3.1. Preparo de inóculo.....	29
2.3.2. Inoculação.....	29
2.3.3. Delineamento experimental.....	30
2.3.4. Avaliação.....	30
2.3.5. Análise estatística.....	31
2.4. Virulência de isolados de <i>Colletotrichum</i> em jiló (cv. Tinguá).....	31
2.4.1. Obtenção dos isolados.....	31
2.4.2. Preparo de inóculo.....	32
2.4.3. Inoculação.....	32
2.4.4. Delineamento experimental.....	32
2.4.5. Avaliação.....	33
2.4.6. Análise estatística.....	33
2.5. Identificação molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> que causam antracnose em jiló.....	33
2.5.1. Seleção dos isolados.....	33
2.5.2. Extração do DNA.....	33
2.5.3. Amplificação e sequenciamento do produto amplificado.....	34
2.5.4. Análise filogenética.....	35
3. RESULTADOS	36
3.1. Metodologia de inoculação de <i>Colletotrichum</i> em jiló.....	36

3.2. Virulência de isolados de <i>Colletotrichum</i> em jiló (cv. Tinguá).....	37
3.3. Identificação molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> que causam antracnose em jiló.....	40
4. DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÕES.....	47
6. LITERATURA CITADA.....	47
CAPÍTULO III: QUITOSANA NO CONTROLE PÓS-COLHEITA DA ANTRACNOSE DO JILÓ.....	52
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Local de condução do experimento.....	56
2.2. Obtenção de quitosana e de ácido cítrico.....	56
2.3. Crescimento micelial de <i>Colletotrichum tamarilloi</i> com quitosana.....	56
2.3.1. Preparação de diferentes concentrações de quitosana.....	56
2.3.2. Preparação de quitosana com meio de cultura BDA em placa de Petri.....	56
2.3.3. Deposição de <i>Colletotrichum tamarilloi</i> em placa de Petri contendo quitosana.....	57
2.3.4. Delineamento experimental.....	57
2.3.5. Avaliação.....	57
2.3.6. Análise estatística.....	58
2.4. Controle pós-colheita da antracnose do jiló com revestimento de quitosana.....	58
2.4.1. Obtenção, seleção e assepsia de frutos para revestimento.....	58
2.4.2. Preparação de diferentes concentrações de quitosana para revestimento em jiló.....	59
2.4.3. Preparação de inóculo.....	59
2.4.4. Inoculação.....	59
2.4.5. Revestimento de jilós com gel de quitosana.....	60
2.4.6. Delineamento experimental.....	60
2.4.7. Avaliação.....	61
2.4.8. Análise estatística.....	61
3. RESULTADOS.....	61
3.1. Crescimento micelial de <i>Colletotrichum tamarilloi</i> com quitosana.....	61
3.2. Controle pós-colheita da antracnose do jiló com revestimento de quitosana.....	65
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÕES.....	70
6. LITERATURA CITADA.....	70
CONCLUSÕES GERAIS.....	76
ANEXOS.....	78

RESUMO GERAL

Oliveira, B.F. **Identificação da espécie de *Colletotrichum* causadora da antracnose em jiló e avaliação do controle da doença com quitosana em pós-colheita.** 2017. (81 p). Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A antracnose, uma das principais doenças de pós-colheita em jiló (*Solanum aethiopicum* L.), tem sido pouco investigada em vários aspectos, principalmente no que se refere a etiologia e controle que foram os objetivos desse trabalho. Para que estes estudos fossem conduzidos nas referidas áreas foi necessário que se dispusesse, inicialmente, de uma metodologia adequada que permitisse a reprodução dos sintomas da doença em condições de laboratório. Estabeleceu-se, portanto, um método de inoculação utilizando o isolado Coll-265 dentre os quatro procedimentos: 1) fermento no fruto com um furo utilizando uma agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de 15 µL do inóculo (M1); 2) apenas deposição de 15 µL do inóculo sobre o epicarpo do fruto sem fermento (M2); 3) fermento no fruto com um furo utilizando uma agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo (M3) e 4) apenas deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo sobre o epicarpo do fruto (M4). A concentração estimada do inóculo foi de 2×10^5 conídios/mL. Nas testemunhas foram depositadas água destilada esterilizada e disco de BDA sem cultivo do fungo. Avaliou-se a incidência e o diâmetro médio da lesão por tratamento. Os dados de diâmetro da lesão foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. Após, quinze isolados de *Colletotrichum* obtidos de antracnose em jiló foram testados quanto à virulência em frutos da cultivar Tinguá. Avaliou-se incidência de antracnose, diâmetro médio da lesão, períodos de incubação e latência. Os dados de diâmetro médio da lesão foram submetidos à ANOVA e testes de média Tukey e Dunnet ao nível de 5 % de significância. Em seguida, um isolado, dentre os mais virulentos, foi identificado com base em sequências de regiões genômicas gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), actina (ACT) e beta-tubulina (TUB2), enquanto que os demais isolados virulentos foram identificados com base apenas na região genômica GAPDH. Duas árvores filogenéticas foram geradas por ‘Máxima Verossimilhança’, uma para análise multigene utilizando as sequências concatenadas e outra para GAPDH. *In vitro* foi observado o crescimento micelial do isolado Coll-265 em meio com quitosana nas seguintes condições: 1) batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,1 %; 2) batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,2 %; 3) batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,3 % e 4) batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,4 %. Como testemunha, apenas batata-dextrose-ágar. Todas as placas foram armazenadas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Iniciou-se a avaliação 48 h após a implantação do experimento pela medição do crescimento radial do fungo em dois sentidos opostos, repetindo-se a medição a cada 48 h até completar 10 dias. A taxa de crescimento micelial e a porcentagem de inibição do crescimento micelial foram calculadas. Repetiu-se uma vez o experimento adotando as mesmas condições. Para análise estatística, fez-se ANOVA, teste F e regressão. Para controle *in vivo*, jilós foram submetidos aos tratamentos: T1 – não revestidos e não inoculados; T2 – não revestidos e inoculados; T3 – revestidos com quitosana a 0,1 % e inoculados; T4 – revestidos com quitosana a 0,2 % e inoculados e T5 – revestidos com quitosana a 0,3 % e inoculados. Os tratamentos T1 e T2 serviram como testemunhas. Analisou-se perda de massa fresca; incidência média da doença e severidade da doença. Repetiu-se uma vez o experimento adotando as mesmas condições. Os valores de severidade da doença de cada tratamento foram utilizados para o cálculo da AACPD. Para análise estatística, fez-se ANOVA, teste F e regressão. Utilizou-se DIC para todos os

experimentos. Concluiu-se que M1 foi o mais efetivo para reprodução de sintomas de antracnose em laboratório sendo utilizado nos experimentos posteriores, quando necessário. Os isolados Coll-182, Coll-265, Coll-266, Coll-297, Coll-586 e Coll-588 foram os mais virulentos, com destaque para Coll-265 e Coll-266 que apresentaram as maiores médias de diâmetro da lesão e 100 % de incidência de antracnose. Todos os isolados virulentos foram identificados molecularmente como *Colletotrichum tamarilloi*. *In vitro*, a quitosana em todas as concentrações testadas inibiu o crescimento micelial do fungo. *In vivo*, o revestimento de quitosana a 0,2 % (T4) reduziu a severidade da antracnose em jiló pós-colheita, mas não impediu a sua incidência.

Palavras-chave: *Colletotrichum tamarilloi*, hortaliça, revestimento, *Solanum aethiopicum*.

GENERAL ABSTRACT

Oliveira, B.F. **Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose in scarlet eggplant and assessment of anthracnose control with chitosan in post-harvest.** 2017. (81 p). Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Anthracnose, a major post-harvest disease in scarlet eggplant fruit (*Solanum aethiopicum* L.), has been little investigated in several aspects, mainly regarding etiology and control, which were the objectives of this work. For these studies to be conducted it was necessary initially to have an adequate methodology that would allow the reproduction of the symptoms of the disease under laboratory conditions. A method of inoculation using the Coll-265 isolate was therefore established among the four procedures: 1) injury in the fruit with a metal needle bore of 1.25 mm diameter + deposition of 15 μ L of the inoculum (M1); 2) only deposition of 15 μ L of the inoculum on the epicarp of the uninjured fruit (M2); 3) injury in the fruit with a metal needle hole of 1.25 mm diameter + deposition of a 0.5 cm diameter BDA disc with fungus culture (M3) and 4) only deposition of a 0.5 cm diameter BDA disc with fungus culture on the epicarp of the fruit (M4). The estimated concentration of the inoculum was 2×10^5 conidia/ mL. Sterilized distilled water and BDA disc without culture of the fungus were deposited in the controls. The incidence and mean diameter of the lesion in each treatment were evaluated. The data of mean diameter of the lesion were submitted to ANOVA and Tukey's test at 0.05 probability. Fifteen isolates of *Colletotrichum* obtained from anthracnose in scarlet eggplant fruit were tested for virulence in Tinguá fruits. The incidence of anthracnose, mean lesion diameter, incubation and latency period were evaluated. The data of mean diameter of the lesion were submitted to ANOVA and Tukey's and Dunnet's mean tests at the 5% level of significance. The most virulent isolates were identified based on genomic sequences of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), actin (ACT) and beta-tubulin (TUB2), whereas the other virulent isolates were identified based only on the GAPDH genomic region. Two phylogenetic trees were generated by 'Maximum Likelihood', one for multigene analysis using the concatenated sequences and another for GAPDH. *In vitro*, the mycelial growth of the Coll-265 isolate in chitosan medium was observed under the following conditions: 1) potato-dextrose-agar with 0.1% chitosan; 2) potato-dextrose-agar with 0.2% chitosan; 3) potato-dextrose-agar with 0.3% chitosan and 4) potato-dextrose-agar with 0.4% chitosan. As a control, only potato-dextrose-agar. All plates were stored in BOD at 25°C and photoperiod of 12 h. The evaluation was initiated 48 h after the implantation of the experiment by measuring radial growth of the fungus in two opposite directions, repeating the measurement every 48 h until completing 10 days. The mycelial growth rate and percent inhibition of mycelial growth were calculated. The experiment was repeated once under the same conditions. For statistical analysis, we performed ANOVA, F test and regression. For the *in vivo* control test, scarlet eggplant fruits were submitted to treatments: T1 - uncoated and uninoculated; T2 - uncoated and inoculated; T3 - coated with 0.1% chitosan and inoculated; T4 - coated with 0.2% chitosan and inoculated and T5 - coated with 0.3% chitosan and inoculated. The T1 and T2 treatments served as controls. Loss of fruit fresh mass was analyzed; mean incidence of disease and severity of the disease. The experiment was repeated once under the same conditions. The disease severity values of each treatment were used to calculate AACPD. For statistical analysis, we performed ANOVA, F test and regression. DIC was used for all experiments. It was concluded that M1 was the most effective for reproduction of anthracnose symptoms in the laboratory and, therefore, it was used in later experiments when necessary. Coll-265, Coll-266, Coll-266, Coll-297, Coll-586 and Coll-588 isolates were the most virulent, with Coll-265 and

Coll-266 showing the highest lesion diameter means and 100% incidence of anthracnose. All virulent isolates were molecularly identified as *Colletotrichum tamarilloi*. *In vitro*, chitosan at all concentrations tested inhibited fungal mycelial growth. *In vivo*, the 0.2% chitosan coating (T4) reduced the severity of anthracnose in post-harvest jelly but did not prevent its incidence.

Keywords: *Colletotrichum tamarilloi*, vegetable, coating, *Solanum aethiopicum*.

INTRODUÇÃO GERAL

O jiloeiro (*Solanum aethiopicum* L.) é uma das 60 hortaliças mais cultivadas no Centro-Sul do Brasil (Filgueira, 2007) sendo a região sudeste a principal produtora de jiló com destaque para o estado do Rio de Janeiro, responsável por cerca de 30% da produção nacional (Pinheiro *et al.*, 2015). Devido à resistência a altas temperaturas e rusticidade, o jiloeiro tem potencial de expansão para outras regiões do Brasil aumentando, com isso, o consumo e, conseqüentemente, a produção. Em uma perspectiva maior de mercado, Mangan *et al.* (2008) observaram um aumento nas importações de produtos étnicos (produtos comuns em seu país de origem) pelos EUA, inclusive do jiló, devido ao crescente número de migrantes brasileiros nesse país, o que desperta ainda mais o interesse dos produtores.

Mesmo *S. aethiopicum* sendo considerada uma das espécies mais rústicas da família *Solanaceae*, algumas doenças, em especial as podridões, podem causar perdas consideráveis ou comprometer a qualidade do produto (Pinheiro *et al.*, 2015). Dentre estas, a antracnose, causada por espécie (s) de *Colletotrichum*, é a doença pós-colheita que ocorre com maior frequência no jiló (Henz, 2006; Pavan *et al.*, 2016), possivelmente pelo número de espécies do fungo envolvidas e da eficiência dos mecanismos de penetração do patógeno. Portanto, a identificação da espécie ou espécies de *Colletotrichum*, responsável (is) por antracnose em jiló, é fundamental para o desenvolvimento e implantação de métodos eficientes no controle desta doença.

Fungicidas inorgânicos são os mais indicados para controlar a antracnose do jiló (Mapa, 2017b) e os revestimentos ou coberturas são uma alternativa para auxiliar na conservação de alimentos podendo, inclusive, aumentar sua aceitação por meio da melhoria da aparência e retenção de suas propriedades de sabor e textura (Azeredo, 2003) sem agredir o ambiente e a saúde humana.

Dentre os revestimentos comestíveis para controle de doenças em frutos, o uso de quitosana tem trazido resultados satisfatórios (Ali *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Chevalier *et al.*, 2016;). Por ser uma alternativa ecológica de controle aos microrganismos patogênicos de frutos, os produtores e exportadores podem se beneficiar desta alternativa não tóxica.

OBJETIVO GERAL

Identificar o agente patogênico da antracnose do jiló e controlar, pós-colheita, a antracnose com uso de revestimento à base de quitosana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um método de inoculação do agente patogênico da antracnose do jiló em frutos;
- Testar a virulência de isolados da coleção micológica do CNPH - Embrapa Hortaliças em jiló;
- Identificar molecularmente isolados de *Colletotrichum* obtidos de antracnose em jiló;
- Avaliar *in vitro* o controle do agente patogênico da antracnose do jiló com diferentes concentrações de quitosana;
- Controlar *in vivo* a antracnose do jiló com revestimento de quitosana em diferentes concentrações para aumentar a vida de prateleira do fruto sem perder as suas propriedades organolépticas.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Olericultura

Na América do Sul a agricultura se desenvolveu de diferentes formas em várias sociedades ameríndias (Alves, 2001; Piperno, 2011; Clement & Queiróz, 2015). Muitas de suas culturas contribuíram para a dieta alimentar de todo mundo, legando para nós, o hábito de produzir e consumir vários produtos agrícolas, inclusive, as hortaliças. Com a invasão dos europeus, posterior tráfico de africanos e migrações asiáticas, diversas espécies de hortaliças foram introduzidas no continente (Madeira *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2016).

A cultura de hortaliças é também definida como olericultura, termo técnico-científico, derivado do latim (*oleris* = hortaliça), usado para referir-se apenas à produção de plantas que apresentam, em sua maioria, consistência tenra, não lenhosa; ciclo biológico curto; tratos culturais intensivos; cultivos em áreas menores e utilização na alimentação humana, sem exigir preparo industrial (Filgueira, 2007). Esta difere da horticultura que é mais abrangente, compreendendo a produção de uma grande diversidade de culturas inclusive de hortaliças.

A olericultura é uma alternativa para os pequenos agricultores por não necessitar de grandes áreas e a maioria das culturas demanda cuidados permanentes e diários, contribuindo para evitar o êxodo rural.

2. *Solanaceae*

As hortaliças ou olerícolas são importantes para o bom funcionamento do organismo fornecendo vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes, além de auxiliar na hidratação do corpo (Rodrigues, 2012). Consideradas, portanto, alimentos funcionais, essas têm sido amplamente recomendadas na alimentação humana e dentre as hortaliças mais consumidas estão as espécies da família *Solanaceae*. Esta é uma das maiores e mais complexas famílias dentre as Angiospermas e tem a América do Sul como um dos principais centros de origem (Bebeli & Mazzucato, 2008). Em Samuels (2015) foi apresentado um inventário de espécies alimentares da subfamília *Solanoideae* (família *Solanaceae*), onde quinze gêneros fornecem espécies que são utilizadas para alimentos em todo o mundo (*Capsicum*, *Lycianthes*, *Markea*, *Lycium*, *Acnistus*, *Iochroma*, *Vassobia*, *Chamaesaracha*, *Physalis*, *Quincula*, *Witheringia*, *Withania*, *Salpichroa*, *Jaltomata* e *Solanum*) e destes, apenas quatro gêneros contêm espécies de culturas economicamente significativas (*Solanum*, *Capsicum*, *Jaltomata* e *Physalis*). Além do interesse econômico, os gêneros *Solanum* e *Capsicum* desta família produzem fruto comercial em cultivos de grande interesse social e cultural no Brasil e no mundo (Tofoli *et al.*, 2015).

3. *Solanum aethiopicum* L.

Dentre as solanáceas de fruto comercial do gênero *Solanum*, *S. aethiopicum* é uma das que se destacam quando o assunto é interesse econômico e principalmente sócio-cultural. Esta espécie é ainda agrupada em diferentes ecótipos que são: Aculeatum, Gilo, Kumba e Shum, como revelado por semelhanças na caracterização genotípica, embora existam fenótipos variados (Sharmin *et al.*, 2011; Adeniji *et al.*, 2012). Por outro lado, alguns autores argumentaram que os quatro grupos em *S. aethiopicum* seriam tratados como espécies diferentes, pois todos exibiam fenótipos e genótipos variados usando uma combinação de marcadores moleculares (Sifau *et al.*, 2014; Aguoru *et al.*, 2015a; Aguoru *et al.*, 2015b). Portanto, o nome científico *S. aethiopicum* refere-se a um grupo de plantas nativas da África identificadas como jiloeiro (Sekara *et al.*, 2007), sendo que, muitas espécies do gênero *Solanum* também são nativas e estão amplamente distribuídas pela África tropical subsaariana e desempenham um papel importante na tradição e cultura de seus moradores (Novo *et al.*, 2008; Chinedu *et al.*, 2011; Danquah & Ofori, 2012). Foi do continente africano, no período escravagista, que a espécie *S. aethiopicum* ecótipo Gilo foi introduzida no Brasil (Melo *et al.*, 2016).

O fruto, conhecido como jiló, apresenta sabor amargo, mesmo depois de cozido, e no Brasil é colhido, comercializado e comumente consumido verde. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (Taco, 2011) o jiló cru possui 91,6 % de água; 1,4 % de proteína; 6,2 % de carboidratos e 4,8 % de fibra. Além disso, contém minerais como potássio, fósforo, cálcio, magnésio, manganês, ferro, zinco e cobre como também vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e C (ácido ascórbico), sendo que esta última possui efeito antioxidante, é importante na cicatrização de feridas e estimula a transcrição do gene do colágeno em humanos (Manela-Azulay *et al.*, 2003).

Segundo Odetola *et al.*, (2004) o jiló pode ser útil para tratamento profilático e terapêutico de estados clínicos associados a hiperlipidemia (nível elevado de lipídios no sangue) tal como aterosclerose (condição em que ocorre a formação de ateromas ou acúmulo de placas de lipídios e outras substâncias nas paredes das artérias, o que restringe o fluxo sanguíneo). Em seus estudos com coelhos brancos hipercolesterolêmicos (com alta concentração de colesterol no sangue) da Nova Zelândia, Odetola *et al.* (2004) observaram que *S. aethiopicum* e *S. melongena* (berinjela) reduziram significativamente o colesterol total sérico, triglicerídios e colesterol LDL, e que, juntamente com exame histopatológico do fígado e aorta, demonstraram

que essas duas espécies de *Solanum* tem efeito hipolipidêmico (que causa diminuição da concentração de lipídios contidos no sangue) com resposta positiva mais pronunciada em coelhos tratados com *S. aethiopicum*. Daí a importância de *S. aethiopicum* e de outras espécies de *Solanum* para consumo, por serem alimentos nutracêuticos, já que doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de mortalidade no Brasil (Santos *et al.*, 2008; Mansur & Favarato, 2012) e muitos brasileiros preocupados com uma vida mais saudável recorrem a produtos naturais.

4. Principais doenças do jiloeiro

O jiloeiro é afetado por várias doenças causadas por diferentes agentes patogênicos como vírus, nematoide, bactéria, chromista e fungo. Mais recentemente foi relatado *Tomato chlorosis virus* (ToCV) causando amarelecimento interneval em folhas mais velhas de jiloeiro no Brasil tendo a mosca branca “*Bemisia tabaci*” como seu vetor (Fonseca *et al.*, 2016).

O nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) segundo Pinheiro *et al.* (2013; 2015) ocorre com frequência se apresentando em campo na forma de reboleiras irregulares com plantas raquíticas, murchas e amarelecidas. As principais espécies de *Meloidogyne* que infectam o jiloeiro são *M. javanica* e *M. incógnita* (Carneiro *et al.*, 2008).

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* não causa no jiloeiro tantos danos como causa em outras espécies de *Solanum*: *S. lycopersicum* e *S. tuberosum* (Prereira *et al.*, 2012), porém não se pode desprezar sua incidência em jiló no norte do Brasil (Coelho Netto *et al.*, 2004). Por outro lado, a murcha causada por *Verticillium dahliae* é uma doença que causa sério problema para o cultivo de hortaliças no Brasil inclusive para jiloeiro (Reis & Boiteux, 2006). O fungo, *V. dahliae*, por ser polífago pode permanecer no solo por anos fazendo com que o produtor abandone áreas infestadas (Pavan *et al.*, 2016). Em geral, os fungos ocorrem com maior frequência principalmente em regiões que apresentam elevadas temperaturas e umidades relativas. Além de *V. dahliae*, outros fungos como *Ascochyta phaseolorum* (secados-ramos) e *Stemphylium solani* (mancha-de-estenfílio), a depender da época do ano e das condições ambientais do local de cultivo, podem causar perdas consideráveis (Pinheiro *et al.*, 2015).

Em frutos, doenças como a antracnose e outras podridões causadas por *Phytophthora* (Carvalho *et al.*, 2005; Laurenão & Reis, 2006; Reis *et al.*, 2007), *Sclerotium* e *Pectobacterium* (Pereira *et al.*, 2012) comprometem a qualidade do produto, reduzem a produção e encarecem sua comercialização.

5. Antracnose do jiló

A antracnose é a doença mais importante do jiló no Brasil e se manifesta comumente após a colheita em forma de depressão circular de diâmetro variável (Pavan *et al.*, 2016) que, conseguinte, a depender das condições do ambiente, ocorre a formação de uma massa gelatinosa de coloração alaranjada (Henz, 2006) ou rosada (Pinheiro *et al.*, 2015) (Figura 1). Sintoma e sinal, por vezes, aparecem ou intensificam-se durante o transporte e a comercialização dos frutos (Fernandes *et al.*, 2001).



Figura 1 – Sintomas de antracnose em frutos de jiloeiro (Foto: Ailton Reis).

As cultivares comerciais de jiló atualmente disponíveis não são resistentes à infecção dos frutos por *Colletotrichum*, agente causal da antracnose, tornando a doença um dos fatores limitantes ao cultivo na estação chuvosa (Reis *et al.*, 2009).

No Brasil existem 21 cultivares registradas de *S. aethiopicum* ecótipo Gilo conforme exposto no Registro Nacional de Cultivares (RNC) publicado no site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa, 2017a). Entretanto, no mercado de sementes predomina tipos Verde-claro comprido e o Verde-escuro redondo sendo que a cultivar Tinguá Verde-claro comprido é a mais plantada no Brasil por ser tolerante a antracnose (Pereira *et al.* 2012; Pinheiro *et al.*, 2015).

6. *Colletotrichum*

Colletotrichum é um gênero importante de patógenos de plantas com estratégias de infecção ou de interação bem-sucedidas descritas como necrotrófica subcuticular-intramural e hemibiotrófica intracelular (Perfect *et al.*, 1999; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Estes patógenos fúngicos, na fase hemibiotrófica intracelular, são submetidos a um período de imobilidade, definido como quiescência, permanecendo, como biótrofas, durante o crescimento e a colheita dos frutos, mas ativando o seu desenvolvimento e transformando-se em necrótrofas durante a maturação e a senescência (Prusky & Lichter, 2007). Como verificado em Prusky *et al.* (2013), considera-se que a ativação do estágio quiescente é o resultado de: (a) acessibilidade induzida de substratos de células removíveis durante o amolecimento dos frutos e indução de etileno; (b) um declínio nos compostos antifúngicos pré-formados, tais como polifenóis, fitoalexinas e outras substâncias fungitóxicas; (c) condições de pH no hospedeiro; e (d) declínio das respostas indutíveis de defesa do hospedeiro (Figura 2).

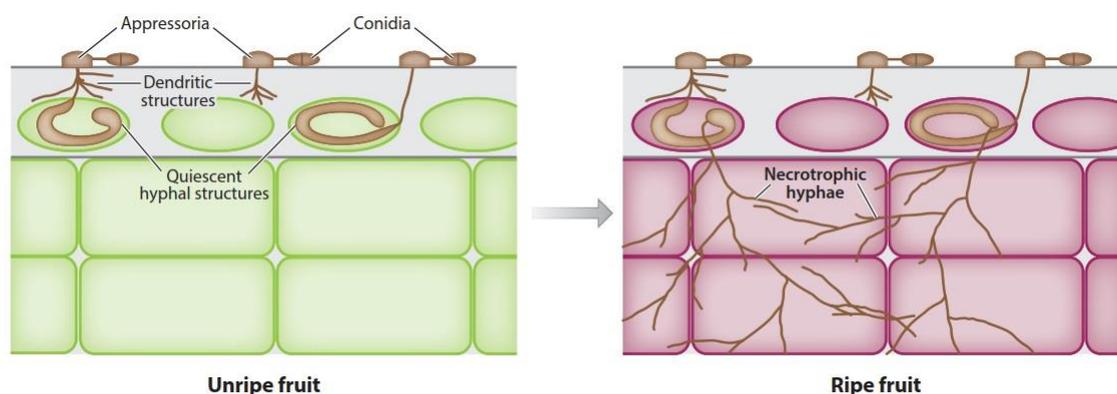


Figura 2 - *Colletotrichum gloeosporioides*: esquema de colonização em frutos. Quando os conídios de *C. gloeosporioides* pousam em frutos não maduros, germinam dentro de algumas horas e diferenciam o apressório em 19 horas. O peg de penetração se ramifica na cutícula do fruto para produzir uma estrutura dendrítica que penetra células da epiderme do fruto para formar uma estrutura de hifas inchadas. Estas estruturas permanecem quiescentes até a maturação do fruto e depois se diferenciam em hifas necrotróficas finas e longas

Os elicitores (sinais que são percebidos pelas células da planta e induzem respostas de defesa) são designados Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) quando isolados de agentes infecciosos, mas também podem corresponder a sinais derivados de hospedeiros endógenos de plantas resultantes da ação do agente patogênico chamado DAMPs “*Damage-Associated Molecular Patterns*” e a sinais não patogênicos de microrganismos aqui

referidos como MAMPs “*Microbe-Associate Molecular Patterns*” ou a produtos químicos (Henry *et al.*, 2012).

O reconhecimento de padrões (PAMPs/DAMPs) levanta o alarme de perigo e resulta na síndrome de resposta imune (Mengiste, 2012), que provavelmente afeta a quiescência.

Na fase necrotrófica subcuticular-intramural, a colonização do hospedeiro é inicialmente por hifas subcuticular intramural e a fase biotrófica é muito curta ou não ocorre como representado por Wharton & Diéguez-Uribeondo (2004) na Figura 3.

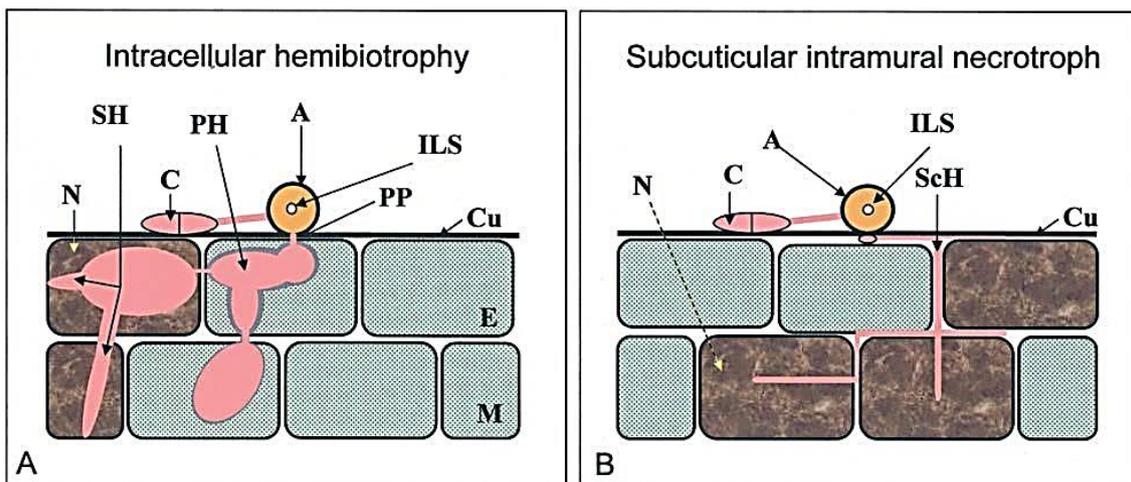


Figura 3 - Estratégias de infecção adotadas por espécies de *Colletotrichum*. As fases iniciais de diferenciação são as mesmas para ambas as estratégias. Um conídio (C) germina e forma apressório (A). O apressório produz um poro e peg de penetração (PP), que penetra a cutícula (Cu) do hospedeiro e, como resultado um ponto de luz interna (ILS) pode ser visto no apressório. **A**) Em hemibiotrófico intracelular o peg de penetração penetra na célula epidérmica e incha para produzir uma vesícula de infecção e hifa extensa, chamada hifa primária (PH), que pode colonizar células epidérmicas adjacentes (E) e as células do mesofilo (M). Durante as fases iniciais deste tipo de colonização, a interação entre o hospedeiro e o patógeno é biotrófica (célula viva representada em verde). A interação necrotrófica subsequente (N) (representado em marron) é caracterizada pela formação de hifas secundárias finas (SH). Estas hifas secundárias crescem intracelular e extracelularmente enquanto a parede das células secreta enzimas degradantes e matam as células do hospedeiro. **B**) Em necrotrófico intramural subcuticular, a colonização do hospedeiro é inicialmente por hifa subcuticular (ScH) e hifa intramural, a fase biotrófica é muito curta ou não ocorre. O fungo se espalha rapidamente por todo o tecido e cresce tanto inter como intracelular. (Fonte: Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004)

Muitos aspectos da biologia de *Colletotrichum* precisam ser elucidados assim como sua taxonomia, considerada confusa (Hyde *et al.*, 2009a). Por ser um gênero fúngico que se encontra na forma assexuada, *Colletotrichum* foi incluído nas classificações morfológicas do Ascomycota como seu teleomorfo classificado *Glomerella* (Cannon *et al.*, 2012).

Atualmente 190 espécies de *Colletotrichum* são aceitas, que, além de fitopatogênicas podem ter estilos de vida endofíticos ou saprobianos e, estão incluídas em onze complexos (acutatum, boninense, caudatum, dematium, destructivum, gigasporum, gloeosporioides, graminicola, orbiculare, spaethianum e truncatum) exceto 23 espécies (Jayawardena *et al.*, 2016).

Baseando-se apenas em caracteres morfológicos, espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose de jiló no Brasil são relatadas como *C. gloeosporioides* (Fernandes *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2002; Bonett *et al.*, 2010) e *C. acutatum* (Tozze Júnior *et al.*, 2006; Castilho *et al.*, 2007). Recentemente, *C. tamarilloi* (Alexandre *et al.*, 2014) foi mencionado em jiló no Brasil, porém, não há estudos avançados publicados que comprovem que todas essas espécies infectam *Solanum aethiopicum* no país. Porém, dentro do gênero *Solanum*, várias espécies de *Colletotrichum* foram reportadas como patogênicas e identificadas com base em análise molecular como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – *Colletotrichum* spp. que infectam *Solanum* spp.

<i>Solanum</i> spp.	<i>Colletotrichum</i> spp.	complexo	Referências
<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. fioriniae</i>	acutatum	Damm <i>et al.</i> , 2012a
<i>S. betaceum</i>	<i>C. godetiae</i>	acutatum	Damm <i>et al.</i> , 2012a
<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. johnstonii</i>	acutatum	Damm <i>et al.</i> , 2012a
<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. salicis</i>	acutatum	Damm <i>et al.</i> , 2012a
<i>S. betaceum</i>	<i>C. tamarilloi</i>	acutatum	Damm <i>et al.</i> , 2012a
<i>S. betaceum</i>	<i>C. boninense</i>	boninense	Damm <i>et al.</i> , 2012b
<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. boninense</i>	boninense	Damm <i>et al.</i> , 2012b
<i>S. betaceum</i>	<i>C. constrictum</i>	boninense	Damm <i>et al.</i> , 2012b
<i>S. betaceum</i>	<i>C. karstii</i>	boninense	Damm <i>et al.</i> , 2012b
<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. karstii</i>	boninense	Damm <i>et al.</i> , 2012b
<i>S. melongena</i>	<i>C. torulosum</i>	boninense	Damm <i>et al.</i> , 2012b
<i>S. tuberosum</i>	<i>C. coccodes</i>	-	Yang <i>et al.</i> , 2009
<i>S. betaceum</i>	<i>C. gigasporum</i>	gigasporum	Liu <i>et al.</i> , 2014
<i>S. tuberosum</i>	<i>C. dematium</i>	dematium	Damm <i>et al.</i> , 2009

A diferenciação entre espécies com base no círculo de hospedeiras ou hospedeira de origem também não é um critério confiável. É frequente a ocorrência de uma única espécie de *Colletotrichum* atacando múltiplas hospedeiras e mais de uma espécie associada a uma mesma

hospedeira (Freeman *et al.*,1998), como no caso de cultivares de mamão (*Carica papaya* L.) encontradas em Trinidad, onde 79 % foram *C. gloeosporioides* e 21 % foram *C. truncatum* (Rampersad, 2011). Entretanto, no trabalho de Phoulivong *et al.* (2010), por meio de análise filogenética utilizando 25 isolados de *Colletotrichum* spp. de oito espécies de frutos tropicais de Laos e Tailândia, incluindo o mamão, mostrou que nenhuma dessas espécies atacava mamão e sim *C. fructicola*. A análise filogenética, no entanto, mostrou que a maioria dos isolados estudados pertence a um complexo chamado de ‘gloeosporioides’.

Técnicas moleculares tem sido ferramentas úteis para discriminação e identificação de espécies de *Colletotrichum*. Maharaj & Rampersad (2012), por análise de RFLP dos produtos de PCR usando a região 5.8S-ITS de rDNA de 48 isolados de *Colletotrichum* de mamão e pimentão, demonstraram através de agrupamento de dados de sequência que todos os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. truncatum* se agrupavam separadamente em clados específicos, independentemente da espécie botânica hospedeira. Pelo mesmo método de análise, Tapia-Tussell *et al.* (2008) revelaram a existência de duas espécies de *Colletotrichum* causando antracnose em frutos de mamoeiro no México, *C. gloeosporioides* e *C. capsici*.

Lima *et al.* (2013) identificaram cinco espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de frutos de mangueira (*Mangifera indica* L.) apenas na região Nordeste do Brasil através de análises de sequência de multilocus juntamente com exame de caracteres fenotípicos, sendo que duas espécies já tinham sido notificadas para manga (*C. asianum* e *C. karstii*), outras duas relatadas pela primeira vez (*C. fructicola* e *C. tropicale*) e *C. dianesei* descrita como nova espécie.

Situação parecida ocorreu na China onde Yan *et al.* (2015), por análises de múltiplos genes e morfologia, identificaram três espécies de *Colletotrichum* associadas com a antracnose em frutos de videira (*Vitis* spp.), a saber: *C. viniferum* (isolado de *V. vinifera* e *V. labruscana*), *C. aenigma* (como primeiro relato em *V. vinifera*) e *C. hebeiense* (como espécie nova em *V. vinifera*).

As análises de múltiplos genes ou combinações de marcadores genéticos podem resolver as posições filogenéticas da maioria das espécies no gênero *Colletotrichum*. Hyde *et al.* (2014) recomendaram oito regiões gênicas (Tabela 2) sendo que o ITS (*Internal transcribed spacer*) pode separar *taxa* para complexos de espécies; GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e T (β -tubulina) resolve a nível de espécie; ACT (Actina), CHS-1 (Quitina sintase), GS (Glutamina sintetase) e HIS3 (Histona 3) coloca dentro do gênero e pode também delinear a nível de espécie, enquanto que, ApMat (região intergênica entre Apn2 e MAT-1-2-1) resolve espécies dentro do *C.* complexo *gloeosporioides*.

Tabela 2 – Marcadores genéticos recomendadas por Hyde *et al.* (2014) para estudo filogenético de *Colletotrichum* spp.

Região gênica	Iniciador	Sentido	Sequência (5' - 3')	Referência
ITS	ITS1-F	Forward	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes & Bruns (1993)
	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. (1990)
GAPDH	GDF	Forward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	Templeton <i>et al.</i> (1992)
	GDR	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT	
CHS-1	CHS-79F	Forward	TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG	Carbone and Kohn (1999)
	CHS-354R	Reverse	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG	
HIS3	CYLH3F	Forward	AGG TCC ACT GGT GGC AAG	Crous <i>et al.</i> (2004)
	CYLH3R	Reverse	AGC TGG ATG TCC TTG GAC TG	
ACT	ACT-512F	Forward	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Carbone & Kohn (1999)
	ACT783R	Reverse	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	
β- tubulin	T1	Forward	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	T2	Reverse	TAG TGA CCC TTG GCC CAG TTG	
GS	GSF1	Forward	ATG GCC GAG TAC ATC TGG	Stephenson <i>et al.</i> (1997)
	GSR1	Reverse	GAA CCG TCG AAG TTC CAG	
ApMat	AM-F	Forward	TCATTCTACGTATGTGCCCCG	Silva <i>et al.</i> (2012)
	AM-R	Reverse	CCAGAAATACACCGAACTTGC	

Devido à sua importância científica e econômica, o gênero *Colletotrichum* foi eleito o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos de plantas no mundo causando mancha e queimadura da parte aérea além de podridão pós-colheita (Dean *et al.*, 2012). Portanto, a identificação precisa de suas espécies responsáveis por danos em determinada espécie botânica é fundamental para o planejamento e implantação de estratégias eficientes de controle.

7. Controle da antracnose do jiló

Para a antracnose do jiló assim como de outras solanáceas, as medidas de controle recomendadas são preventivas. Segundo Tofoli *et al.* (2015) o manejo da antracnose deve ser baseado em programas multidisciplinares, que integrem diferentes estratégias, com os objetivos de otimizar o controle, reduzir os custos e promover a sustentabilidade da produção. De acordo com as recomendações de Pereira *et al.* (2012) e Pinheiro *et al.*, (2015), as medidas de controle para antracnose do jiló devem ser realizadas antes da colheita e consistem no uso de sementes saudáveis; plantio de cultivares tolerantes a doença (ex. cultivar Tinguá); plantio em áreas distantes a outras solanáceas hospedeiras, de preferência áreas mais altas e de menor umidade; realização do raleio da cultura a fim de permitir melhor arejamento das plantas; eliminação de frutos

doentes ou partes infectadas da planta; destruição de restos da cultura; rotação de culturas e tratamento com fungicidas inorgânicos.

Os fungicidas inorgânicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil para controle da antracnose em jiló são em sua maioria cúpricos de pouco a moderadamente tóxicos e perigosos ao ambiente (Mapa, 2017b).

Comparado aos outros métodos, o controle químico é relativamente fácil e frequentemente propicia resultados efetivos. Contudo, o agrotóxico tem sido considerado um problema devido a não observância de dosagens, ao desrespeito ao período de carência e ao uso de princípios ativos não registrados para a cultura oferecendo risco a saúde humana e danos irreparáveis ao ambiente.

Por mais que medidas pré-colheita sejam importantes, ainda sim a cultura não se encontra imune às infecções pelo *Colletotrichum*, e, o problema é que os sintomas da antracnose, em frutos infectados, na maioria das vezes, manifestam-se após a colheita e as condições de transporte e armazenamento inadequados facilitam o desenvolvimento da doença e de futuras infecções pelo patógeno (Dantas *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2011).

Para isso, o controle alternativo, como o uso de revestimentos comestíveis em frutos pós-colheita, pode ser uma opção que traga bons resultados em se tratando de custo/benefício pois, além de impedir o desenvolvimento de patógenos quiescentes (Oliveira *et al.*, 2016) e de formar uma barreira protetora contra a invasão de novos microrganismos patogênicos (Alves *et al.*, 2011; Maqbool *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011), sua matéria prima é de baixo custo podendo, com isso, reduzir o uso indiscriminado de agrotóxicos.

8. Revestimentos comestíveis

Revestimento ou cobertura comestível é definido por Bourtoom (2008) como uma fina camada de material que pode ser consumida e que proporciona uma barreira à umidade, ao oxigênio e ao movimento de soluto para o alimento.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) não descreve uma legislação específica para revestimentos comestíveis, portanto, de acordo com Luvielmo & Lamas (2012) os revestimentos são considerados ingredientes, quando melhoram a qualidade nutricional do produto, ou aditivos, quando não incrementam o seu valor nutricional. Tais ingredientes ou aditivos, a depender da sua utilidade, são à base de biopolímeros que são completamente

biodegradados (Bardi & Rosa, 2007) e que podem ter origem animal ou vegetal, ou formarem um composto com a combinação de ambos.

Os biopolímeros empregados na elaboração de revestimentos comestíveis são polissacarídeos (amido e quitina), lipídeos (ceras e óleos) e proteínas (colágeno e glúten) extraídos de diversas fontes renováveis (Viladiego *et al.*, 2005; Luvielmo & Lamas, 2012).

Os revestimentos à base de polissacarídeos são os mais abundantes na natureza e estão disponíveis em todo o mundo, por isso, talvez sejam os mais viáveis economicamente. No entanto, é importante ressaltar que a escolha do biopolímero depende fundamentalmente das características do produto a ser revestido e do objetivo a ser almejado com o revestimento aplicado (Assis & Brito, 2014).

9. Quitina e quitosana

Dentre os polissacarídeos estudados e usados para o preparo de revestimentos comestíveis, a quitina e a quitosana merecem destaque pois além de preservarem o aspecto hidratado em frutos, mantendo por mais tempo sua superfície brilhante (Assis & Brito 2014), também apresentam propriedades antimicrobianas (Liu *et al.*, 2004; Verkaik *et al.*, 2011; Tavarina *et al.*, 2013).

A quitina é o segundo polissacarídeo natural mais abundante do planeta perdendo apenas para a celulose (Dutta *et al.*, 2004). Estruturalmente a quitina e a celulose são similares (Alvarenga, 2011; Badwan *et al.*, 2015) (Figura 4) porém a quitina e a quitosana são heteropolímeros (apresentam grupos amina e hidroxila), enquanto a celulose é um homopolímero (apenas grupamento de hidroxila).

Na sua forma bruta extraída, a quitina tem uma estrutura cristalina altamente ordenada, é translúcida e bastante resistente. Tem, no entanto, pouca solubilidade e baixa reatividade (Goy *et al.*, 2009). A quitosana, por sua vez, devido à carga positiva no C-2 do monômero de glucosamina abaixo de pH 6, é mais solúvel e tem uma melhor atividade antimicrobiana (Chen *et al.*, 1998; Shahidi *et al.*, 1999; Vodnar *et al.*, 2015) com um amplo espectro ao qual bactérias gram-negativas, gram-positivas e fungos são altamente suscetíveis (Goy *et al.*, 2009).

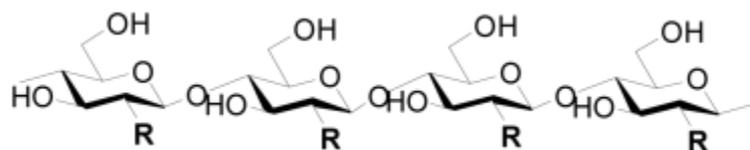


Figura 4 – Estrutura química da celulose (R = OH), quitina (R = NHCOCH₃), e quitosana (R = NH₂). (Fonte: Badwan *et al.*, 2015)

Para evitar perdas econômicas causadas pela deterioração por *Rhizopus stolonifer* e doenças graves que ameaçam a vida humana por *Escherichia coli*, Ramos-García *et al.* (2012) recomendaram a aplicação do revestimento comestível à base de quitosana contendo cera de abelha e óleo essencial de limão em tomate. Por sua vez Zhu *et al.* (2008) sugeriram que a aplicação do revestimento de quitosana pode apresentar um potencial para retardar o amadurecimento e reduzir a decomposição microbiana de manga durante o armazenamento.

O uso de revestimento comestível a base de quitosana, aplicado em frutas, é uma tecnologia economicamente interessante, uma vez que esta é utilizada em pequenas quantidades e possui baixo valor comercial se comparado aos prejuízos acarretados por doenças, falta de boas práticas de armazenamento e transporte inadequado. E o grande desafio é, justamente, produzir com qualidade, sem infringir os planos de políticas públicas que garantam a segurança de alimentos.

10. LITERATURA CITADA

ADENIJI, O.T.; KUSOLWA, P.M. & REUBEN, S.O.W.M. 2012 Genetic diversity among accessions of *Solanum aethiopicum* L. groups based on morpho-agronomic traits. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 10:177-185.

AGUORU, C.U.; OMOIGUI, L.O. & OLASAN, J.O. 2015a. Molecular characterization of *Solanum* species (*Solanum aethiopicum* complex; *Solanum macrocarpon* and *Solanum anguivi*) using multiplex RAPD primers. *Journal of Plant Studies* 4:27-34.

AGUORU, C.U.; OMOIGUI, L.O. & OLASAN, J.O. 2015b. Population genetic study of eggplants (*Solanum*) species in Nigeria, tropical west Africa, using molecular markers. *International Journal of Plant Research* 5:7-12.

ALEXANDRE, E.R.; HERCULANO, L.M.; SILVA, J.M. & OLIVEIRA S.M.A. 2014. Fosfitos no manejo da antracnose do jiló. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 49:930-938.

- ALI, A.; MUHAMMAD, M.T.M. & SIJAM, K. 2010. Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. *International Journal of Food Science and Technology* 45:2134–2140.
- ALVARENGA, E.S. 2011. Characterization and properties of chitosan. *In: Elnashar, M. Biotechnology of biopolymers*. 1ª ed. InTech. Croácia. p. 91-108.
- ALVES, A.I.; SARAIVA, S.H.; LUCIA, S.M.D.; TEIXEIRA, L.J.Q. & JUNQUEIRA, M.S. 2011. Qualidade de morangos envolvidos com revestimento comestível antimicrobiano à base de diferentes fontes de amido. *Enciclopédia Biosfera* 7:1519-1526.
- ALVES, R.N.B. 2001. Características da agricultura indígena e sua influência na produção familiar da Amazônia. Documentos 105. Embrapa Amazônia Oriental. Belém.
- ASSIS, O.B.G. & BRITO, D. 2014. Coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. *Brazilian Journal Food Technology* 17:87-97.
- AZEREDO, H.M.C. 2003. Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial da aplicação. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 21:267-278.
- BADWAN, A.A.; RASHID, I.; OMARI, M.M.H. & DARRAS, F.H. 2015. Chitin and chitosan as direct compression excipients in pharmaceutical applications. *Marine Drugs* 13:1519-1547.
- BARDI, M.A.G. & ROSA, D.S. 2007. Avaliação da biodegradação em solo simulado de poli (ϵ -caprolactona), acetato de celulose e suas blendas. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo* 26:43-47.
- BEBELI, P.J. & MAZZUCATO, A. 2008. The *Solanaceae* – a review of recent research on genetic resources and advances in the breeding of tomato, pepper and eggplant. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2:3-30.
- BONETT, L.P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R.G.A.; AQUINO, T.F. & BERNARDI-WENZEL, J. 2010. Caracterização morfofocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. *Ambiência* 6:451-463.
- BOURTOOM, T. 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15:237-248.
- CAMPOS, R.P.; KWIATKOWSKI, A. & CLEMENTE, E. 2011. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. *Revista Ceres* 58:554-560.
- CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R. & WEIR, B.S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213.
- CARBONE, I. & KOHN, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.

- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIRA, M.R.A.; MARTINS, I.; SOUZA, J.F.; PIRES, A.Q. & TIGANO, M.S. 2008. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. e fungos nematófagos em hortaliças no Distrito Federal, Brasil.
- CARVALHO, A.O.; SOARES, D.J.; BARRETO, R.W. & CARMO, M.G.F. 2005. Podridão de frutos de jiló causada por *Phytophthora capsici*. Fitopatologia Brasileira 30:435.
- CASTILHO, L.B.; REIS, A. & HENZ, G.P. 2007. Identificação morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose em solanáceas. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1ª ed. Embrapa Hortaliças: Brasília. 19p.
- CHEN, C; LIAU, W.Y. & TSAI, G.J. 1998. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. Journal Food Protection 61:1124-1128.
- CHEVALIER, R.C.; SILVA, G.F.A.; SILAV, D.M.; PIZATO, S. & CORTEZ-VEGA, W.R. 2016. Utilização de revestimento comestível à base de quitosana para aumentar a vida útil de melão minimamente processado. Journal of Bioenergy and Food Science 3:130-138.
- CHINEDU, S.N.; OLASUMBO, A.C.; EBOJI, O.K.; EMILOJU, O.C.; ARINOLA, O.K. & DANIA, D.I. 2011. Proximate and phytochemical analyses of *Solanum aethiopicum* L. and *Solanum macrocarpon* L. fruits. Research Journal of Chemical Sciences 1:63-71.
- CLEMENT, C.R. & QUEIRÓZ, M.A. 2015. As origens da agricultura na América do Sul. In: Veiga, R.F.A. e Queiróz, M.A. (eds.). Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil. 1ª ed. Editora da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. p. 30-38.
- COELHO NETTO, R.A.; PEREIRA, B.G.; NODA, H. & BOHER, B. 2004. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. Fitopatologia Brasileira 29:21-27.
- CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISEDE, J.M. & HYWEL-JONES, N.L. 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. Studies in Mycology 50:415-430.
- DAMM, U.; CANNON, P.F; WOUDEBERG, J.H.C & CROUS, P.W. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. Studies in Mycology 73:37-113.
- DAMM, U.; CANNON, P.F; WOUDEBERG, J.H.C; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G. & CROUS, P.W. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies in Mycology 73:1-36.
- DANQUAH, J.A. & OFORI, K. 2012. Variation and correlation among agronomic traits in 10 accessions of garden egg plant (*Solanum gilo* Raddi) in Ghana. International Journal of Science and Nature 3:373-379.
- DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; MICHEREFF, S.J.; NASCIMENTO, L.C.; GURGEL, L.M.S. & PESSOA, W.R.L.S. 2003. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. Fitopatologia Brasileira 28:528-533.

- DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J. & FOSTER, G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology *Molecular Plant Pathology* 13:414-430.
- DUTTA, P.K.; DUTTA, J. & TRIPATHI, V.S. 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research* 63:20-31.
- FERNANDES, M.C.A.; SANTOS, A.S. & RIBEIRO, R.L.D. 2001. Sensibilidade ao fungicida benomyl in vitro de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela. *Arquivos do Instituto Biológico* 68:89-95.
- FERNANDES, M.C.A.; SANTOS, A.S. & RIBEIRO, R.L.D. 2002. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. *Summa Phytopathologica* 28:325-330.
- FILGUEIRA, F.A.R. 2007. Introdução à olericultura. *In: Filgueira, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.* 3ª ed. Editora da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. p. 13-21.
- FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A.M.; ARRUDA, M.C.; BERTANI, R.M.A.; GARCIA, M. J.M. & AMORIM, L. 2011. Danos em pós-colheita de goiabas na região do centro-oeste paulista. *Bragantia* 70:570-576.
- FISCHER, I.H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S. & AMORIM, L. 2007. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de “packinghouse”. *Fitopatologia Brasileira* 32:304-310.
- FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; LIMA, M.F.; MENDONÇA, J.F.; COSTA, A.F.; FONTES, M.G.; COSTA, H. & GONZÁLEZ-ARCOS, M. 2016. First report of Tomato Chlorosis Virus infecting eggplant and scarlet eggplant in Brazil. *Plant Disease* 100:867.
- FREEMAN, S.; KATAN, T. & SHABI, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605.
- GARDES, M. & BRUNS, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.
- GOY, R.C.; BRITTO, D. & ASSIS, O.B.G. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 19:241-247.
- HENZ, G.P. 2006. Doenças das hortaliças. *In: Oliveira, S.M.A. et al. Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais.* 1ª ed. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília. p.631-673.
- HENRY, G.; THONART, P. & ONGENA, M. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16:257-268.

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

HYDE, K.D.; CAI, L.; MCKENZIE, E.H.C.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. & PRIHASTUTI, H. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39:1-17.

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

JAYAWARDENA, R.S.; HYDE, K.D.; DAMM U.; CAI, L.; LIU, M.; LI, X.H.; ZHANG W.; ZHAO, W.S. & YAN, J.Y. 2016. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7:1192-1260.

LAURENAO, I.B. & REIS, A. Caracterização de isolados de *Phytophthora nicotianae* obtidos de tomate, berinjela e jiló. 2006. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 20. 19ª ed. Embrapa Hortaliças. Brasília.

LIMA, N.B.; BATISTA, M.V.A; MORAIS JR, M.A; BARBOSA, M.A.G; MICHEREFF, S.J. HYDE, K.D. & CÂMARA, M.P.S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61:75-88.

LIMA, L.M.; MORAIS, P.L.D.; MEDEIROS, E.V.; MENDONÇA, V.; XAVIER, I.F. & LEITE, G.A. 2009. Qualidade pós-colheita do mamão formosa ‘Tainung 01’ comercializado em diferentes estabelecimentos no município de Mossoró-RN. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31:902-906.

LIU, H.; DU, Y.; YANG, J. & ZHU, H. 2004. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex. *Carbohydrate Polymers* 55:291-297.

LIU, F.; CAI, L.; CROUS, P.W. & DAMM, U. 2014. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. *Persoonia* 33:83-97.

LUVIELMO, M.M. & LAMAS, S.V. 2012. Revestimentos comestíveis em frutas. *Estudos Tecnológicos em Engenharia* 8:8-15.

MADEIRA, N.R.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. & GIORDANO, L.B. 2008. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. *Horticultura Brasileira* 26:428-432.

MAHARAJ, A. & RAMPERSAD, S.N. 2012. Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.) Based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. *Molecular Biotechnology* 50:237-249.

MANELA-AZULAY, M.; LACERDA, C.A.M.; PEREZ, M.A.; FILGUEIRA, A.L. & CUZZI, T. 2003. Vitamina C. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78:265-274.

MANGAN, F.X.; MENDONÇA, R.U.; NUNES, S.V.; FINGER, F.L.; BARROS, Z.J.; GALVÃO, H.; ALMEIDA, G.C.; SILVA, R.A.N.; ANDERSON, M.D. 2008. Production and marketing of vegetables for the ethnic markets in the United States. *Horticultura Brasileira* 26:6-14.

MANSUR, A.P. & FAVARATO, D. 2012. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 99:755-761.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2017a. Registro nacional de cultivares - RNC. http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Consultado em: 12.11.2017.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2017b. Sistema de agrotóxico fitossanitário - Agrofit. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Consultado em: 12.11.2017.

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ANDERSON, P.G.; MOHAMED, M.T.M.; SIDDIQUI, Y. & ZAHID, N. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 62:71-76.

MELO, P.C.T.; MELO, A.M.T. & ARAGÃO, F.A.S. 2016. Melhoramento de hortaliças no Brasil. *In*: Nick, C. & Borém, A. Melhoramento de hortaliças. 1ª ed. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 9-60.

MENGISTE, T. 2012. Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology* 50:267-294.

NOVO, M.C.S.S.; TRANI, P.E.; ROLIM, G.S. & BERNACCI, L.C. 2008. Desempenho de cultivares de jiló em casa de vegetação. *Bragantia* 67:693-700.

ODETOLA, A.A.; IRANLOYE, Y.O. & AKINLOYE, O. 2004. Hypolipidaemic potentials of *Solanum melongena* and *Solanum gilo* on hypercholesterolemic rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition* 3:180-187.

O'DONNELL, K. & CIGELNIK, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:103-116.

- OLIVEIRA, B.F.; CRUZ, A.F. & ALVES, E. 2016. Cassava starch coatings for postharvest control of papaya anthracnose. *Phytopathologia Mediterranea* 55:276-284.
- PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; MOURA, M.F. & KUROZAWA, C. 2016. Doenças das solanáceas. *In: Amorum, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia. 5ª ed. Editora Agronômica Ceres Ltda. Ouro Fino. p.677-686.*
- PEREIRA, R.B.; PINHEIRO, J. B.; ANDERSON, J. & REIS, A. 2012. Doenças e pragas do jiloeiro. Circular técnica 106, ed. 1. Embrapa Hortaliças: Brasília, DF. 13p.
- PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J. & GREEN, J.R. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.
- PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E. & HYDE, K.D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44:33-43.
- PINHEIRO, J.B.; PEREIRA, R.B.; CARVALHO, A.D.F.; AGUIAR, F.M. 2013. Ocorrência e manejo de nematoides na cultura do jiló e berinjela. Circular técnica 125, ed. 1. Embrapa Hortaliças. Brasília.
- PINHEIRO, J.B.; PEREIRA, R.B.; FREITAS, R.A. & MELO, R.A.C. 2015. A cultura do jiló. Coleção plantar 75. 1ª ed. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília.
- PIPERNO, D.R. 2011. The origins of plant cultivation and domestication in the new world tropics. *Chicago Journals* 52:453-470.
- PRUSKY, D. & LICHTER, A. 2007. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters* 268:1-8.
- PRUSKY, D.; ALKAN, N.; MENGISTE, T. & FLUHR, R. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology* 51:155-176.
- RAMOS-GARCÍA, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; HERNÁNDEZ-ROMANO, J.; ZAVALA-PADILLA, G.; TERRÉS-ROJAS, E.; ALIA-TEJACAL, I.; BARRERA-NECHA, L.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. & BAUTISTA-BAÑOS, S. 2012. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomatoes. *Crop Protection* 38:1-62.
- RAMPERSAD, S.N. 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Disease* 95:1244-1254.
- REIS, A. & BOITEUX, L.S. 2006. Murcha-de-verticillium: um sério problema para o cultivo de hortaliças no Brasil. Circular técnica 40. 1ª ed. Embrapa Hortaliças. Brasília.

REIS, A.; CAFÉ FILHO, A.C.; HENZ, G.P. 2007. *Phytophthora capsici*: patógeno agressivo e comum às solanáceas e cucurbitáceas. Circular técnica 55. 1ª ed. Embrapa Hortaliças. Brasília.

REIS, A.; BOITEUX, L.S. & HENZ, G.P. 2009. Antracnose em hortaliças da família *Solanacea*. Circular técnica 79. 1ª ed. Embrapa Hortaliças. Brasília.

RODRIGUES, P. 2012. A importância nutricional das hortaliças. Hortaliças em Revista, Embrapa Hortaliças, Brasília 1:6-9.

SAMUELS, J. 2015. Biodiversity of food species of the *solanaceae* family: a preliminary taxonomic inventory of subfamily *Solanoideae*. Resources 4: 277-322.

SANTOS, M.G.; PEGORARO, M.; SANDRINI, F. & MACUCO, E.C. 2008. Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 90:301-308.

SEKARA, A.; CEBULA, S. & KUNICKI, E. 2007. Cultivated eggplants – origin, breeding objectives and genetic resources, a review 19:97-114.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V. & JEON, Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science and Technology 10:37-51.

SHARMIN, D.; KHALIL, M.I.; BEGUM, S.N. & MEAH, M.B. 2011. Molecular Characterization of eggplant crosses by using RAPD analysis. International Journal of Sustainability and Crop Production 6:22-28.

SIFAU, M.T., OGUNKANMI, L.A., ADEKOYA, K.O., OBOH, B.O., & OGUNDIPE, O.T. 2014. Partitioning and distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among eggplant *Solanum* L. in Southwest Nigeria. International Journal of Genetics and Molecular Biology 6:1-7.

SILVA, D.N.; TALHINAS, P.; VÁRZEA, V.; CAI, L.; PAULO, O.S. & BATISTA, D. 2012. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. Mycologia 104:396-409.

SOARES, N.F.F.; SILVA, D.F.P.; CAMILLOTO, G.P.; OLIVEIRA, C.P.; PINHEIRO, N.M. & MEDEIROS, E.A.A. 2011. Antimicrobial edible coating in post-harvest conservation of guava. Revista Brasileira de Fruticultura (volume especial):281-289.

STEPHENSON, S.A.; GREEN, J.R.; MANNERS, J.M. & MACLEAN, D.J. 1997. Cloning and characterisation of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*. Current Genetics 31:447-454.

TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos). 2011. Campinas: NEPA-UNICAMP. 4ª ed. Campinas.

TAPIA-TUSSELL, R.; QUIJANO-RAMAYO, A.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; LAPPE, P.; LARQUE-SAAVEDRA, A. & PEREZ-BRITO, D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum*

capsici causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan peninsula. *Molecular Biotechnology* 40:293-298.

TAVARIA, F.K.; COSTA, E.M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M.F. & PINTADO, M. M. 2013. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. *Research on Biomedical Engineering* 29:110-120.

TEMPLETON, M.D.; RIKKERINK, E.H.A.; SOLON, S.L. & CROWHURST, R.N. 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.

TOFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J. & FERRARI, J.T. 2015. Antracnose em solanáceas: etiologia, características e controle. *Biológico* 77:73-79.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B. & MASSOLA JÚNIOR, M.S. 2006. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathologica* 32:77-79.

VERKAIK, M.J.; BUSSCHER, H.; JAGER, D.; SLOMP, A. M.; ABBAS, F. & VAN DER MEI, H. 2011. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *Journal of Dentistry* 39:218-224.

VILADIEGO, A.M.D.; SOARES, N.F.F.; ANDRADE, N.J.; PUSCHMANN, R.; MINIM, V.P.R. & CRUZ, R. 2005. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. *Revista Ceres* 52:221-244.

VODNAR, D.; POP, O.L.; DULF, F.V. & SOCACIU, C. 2015. Antimicrobial efficiency of edible films in food industry. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 43:302-312.

WHARTON, P.S. & DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61:3-22.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, Y.J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic. San Diego. p. 315-322.

YAN, J.; JAYAWARDENA, M.M.R.S.; GOONASEKARA, I. D.; WANG, Y.; ZHANG, W.; LIU, M.; HUANG, J.B.; WANG, Z. Y.; SHANG, J.J.; PENG, Y.L.; BAHKALI, A.; HYDE, K.D. & LI, X.H. 2015. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. *Fungal Diversity* 71:233-246.

YANG, L.Y.; Liu, Z.Y.; Cai, L.; Hyde, K.D.; Yu, Z.N. & McKenzie, E.H.C. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. *Fungal Diversity* 39:123-146.

YANG, L.Y.; ZHANG, J.L.; BASSETT, C.L. & MENG, X.H. 2012 Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit. *LWT - Food Science and Technology* 46:254-259.

ZHU, X.; WANG, Q.; CAO, J. & JIANG, W. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation* 32:770-784.

CAPÍTULO 2

**ESTABELECIMENTO DE MÉTODO DE INOCULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
ISOLADOS DE *Colletotrichum* OBTIDOS DE JILÓ**

ESTABELECIMENTO DE MÉTODO DE INOCULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* OBTIDOS DE JILÓ

RESUMO

Pesquisas sobre a etiologia da antracnose do jiló (*Solanum aetiopicum* L.) ainda são incipientes. Diante disso, objetivou-se neste trabalho identificar isolados de *Colletotrichum* obtidos de antracnose em jiló de diferentes regiões do país. Inicialmente, estabeleceu-se um método de inoculação com o isolado Coll-265 em quatro procedimentos em jiló da cultivar Tinguá: 1) ferimento no fruto com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de 15 µL do inóculo (M1); 2) apenas deposição de 15 µL do inóculo sobre o epicarpo do fruto sem ferimento (M2); 3) ferimento no fruto com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo (M3) e 4) apenas deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo sobre o epicarpo do fruto (M4). A concentração estimada do inóculo foi de 2×10^5 conídios/mL. Nas testemunhas foram realizados os mesmos métodos com deposição de água destilada esterilizada para os tratamentos M5 e M6, correspondentes aos métodos M1 e M2 respectivamente, e deposição de um disco de BDA sem cultivo do fungo para os tratamentos M7 e M8, correspondentes aos métodos 3 e 4. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e cinco repetições, sendo um fruto a unidade experimental. Iniciou-se a avaliação após o surgimento das lesões. O diâmetro da lesão foi obtido pela média de duas medidas perpendiculares. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5 % de significância. Após, realizou-se o teste de virulência com 15 isolados de *Colletotrichum* obtidos de antracnose de jiló. A inoculação nos frutos foi por procedimento M1 numa concentração estimada de 2×10^5 conídios/mL. Na testemunha foi depositada água destilada esterilizada. Em seguida, os frutos foram acondicionados em câmara úmida por sete dias sob avaliação diária. O delineamento foi inteiramente casualizado com 16 tratamentos e 6 repetições, sendo um fruto a unidade experimental. Avaliou-se diâmetro médio da lesão, período de incubação, período de latência e incidência de antracnose. Para análise estatística, os dados de diâmetro da lesão foram submetidos à análise de variância e teste de médias Tukey e Dunnett ao nível de significância de 5%. Considerando-se a virulência, selecionou-se isolados para identificação molecular. Para extração de DNA de cada isolado seguiu protocolo Dellaporta modificado por Boiteux. Procedeu-se PCR para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) dos DNAs de todos os isolados. Para o isolado Coll-265, amplificou-se também regiões gênicas actina (ACT) e beta-tubulina (TUB2). Após purificação, os produtos amplificados foram sequenciados. Duas árvores filogenéticas foram geradas por 'Máxima Verossimilhança', uma para análise multigene utilizando as sequências concatenadas e outra para GAPDH. O método de inoculação M1 foi o mais indicado para reprodução de sintomas de antracnose em laboratório. Os isolados Coll-182, Coll-265, Coll-266, Coll-297, Coll-586 e Coll-588 foram os mais virulentos, com destaque para Coll-265 e Coll-266 que apresentaram os maiores diâmetros médio de lesão e 100% de incidência em jiló. Todos os isolados virulentos foram identificados como *Colletotrichum tamarilloi*.

Palavras-chave: antracnose, filogenia, inoculação artificial, patogenicidade

ESTABLISHMENT OF INOCULATION METHOD AND IDENTIFICATION OF ISOLATES OF *Colletotrichum* OBTAINED OF SCARLET EGGPLANT FRUIT

ABSTRACT

Research on the etiology of anthracnose of scarlet eggplant (*Solanum aetiopicum* L.) is still incipient. The objective of this study was to identify isolates of *Colletotrichum* obtained from anthracnose in jiló from different regions of the country. Initially, a method of inoculation with the Coll-265 isolate was established in four procedures in scarlet eggplant fruit of cultivar Tinguá: 1) injury in the fruit with a hole using metal needle of 1.25 mm of diameter + deposition of 15 µL of the inoculum (M1); 2) only deposition of 15 µL of the inoculum on the epicarp of the uninjured fruit (M2); 3) injury in the fruit with a hole using a metal needle of 1.25 mm diameter + deposition of a 0.5 cm diameter disc of BDA with fungus culture (M3) and 4) only deposition of a disc of 0,5 cm diameter of BDA with cultivation of the fungus on the epicarp of the fruit (M4). The estimated concentration of the inoculum was 2×10^5 conidia / mL. The same methods were used in the experiments with the deposition of sterilized distilled water for the treatments M5 and M6, corresponding to methods M1 and M2 respectively, and deposition of a BDA disc without culture of the fungus for treatments M7 and M8 corresponding to methods 3 and 4. The experimental design was completely randomized with eight treatments and five replicates, one being the experimental unit. The evaluation was initiated after the emergence of the lesions. The diameter of the lesion was obtained by the mean of two perpendicular measurements. Data were submitted to analysis of variance and Tukey's test at 5% of significance. After, the virulence test was performed with 15 isolates of *Colletotrichum* obtained from anthracnose of scarlet eggplant fruit. Fruit inoculations were by M1 procedure at an estimated concentration of 2×10^5 conidia/ mL. Sterilized distilled water was deposited in the control. The fruits were then conditioned in a humid chamber for seven days under daily evaluation. The experimental design was completely randomized with 16 treatments and 6 replicates. Mean lesion diameter, incubation period, latency period and incidence of anthracnose were evaluated. For statistical analysis, lesion diameter data were submitted to analysis of variance and Tukey and Dunnett averages test at a significance level of 5%. Considering virulence, isolates were selected for molecular identification. For extraction of DNA from each isolate followed Boiteux modified Dellaporta protocol. PCR for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was performed on the DNAs of all isolates. For the Coll-265 isolate, actin (ACT) and beta-tubulin (TUB2) gene regions were also amplified. After purification, the amplicons were sequenced. Two phylogenetic trees were generated by 'Maximum Likelihood', one for multigene analysis using the concatenated sequences and another for GAPDH. The M1 inoculation method was the most suitable for reproduction of laboratory anthracnose symptoms. Coll-265, Coll-266, Coll-297, Coll-586 and Coll-588 isolates were the most virulent, with Coll-265 and Coll-266 showing the highest mean lesion diameters and 100 % incidence in jiló. All virulent isolates were identified as *Colletotrichum tamarilloi*.

Keywords: anthracnose, phylogeny, artificial inoculation, pathogenicity

1. INTRODUÇÃO

Colletotrichum é um dos principais gêneros de fungo causadores de doenças de plantas. Por ser descrito como a forma assexuada do gênero *Glomerella*, *Colletotrichum* foi classificado como Ascomycota (Cannon *et al.*, 2012) pertencendo a classe *Sordariomycetes* (Maharachchikumbura *et al.*, 2016), ordem *Glomerellales* (Réblová *et al.*, 2011) e família *Glomerellaceae* (Zhang *et al.*, 2006).

As espécies do gênero *Colletotricum* têm poucos caracteres morfológicos distintivos e os estágios teleomórficos raramente são formados ou são desconhecidos, o que dificulta a identificação (Hyde *et al.*, 2009). Por outro lado, tal gênero é notoriamente variável em relação à patogenicidade (Serra *et al.*, 2011). Portanto a ocorrência de populações de espécies de *Colletotrichum* com comportamento patogênico diferenciado pode determinar variações na expressão da doença (Freeman *et al.*, 1998).

As dificuldades encontradas na identificação clássica das espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas também à influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais (Sutton, 1992; Freeman *et al.*, 1998). Em jiló, por exemplo, várias espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose foram relatadas em diferentes regiões do Brasil (Fernandes *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2002; Tozze Júnior *et al.*, 2006; Castilho *et al.*, 2007; Bonett *et al.*, 2010; Alexandre *et al.*, 2014), porém não se tem certeza se todas as espécies descritas realmente infectam o jiló no país ou se todas elas, na realidade, são a mesma espécie.

Métodos tradicionais de identificação de patógenos de plantas podem ser lentos e inconclusivos e, para isso, técnicas moleculares estão colaborando para uma diagnose mais aprofundada de doenças de plantas e identificação correta de seus agentes causais (Ward *et al.*, 2004).

Embora confusa, devido à ampla variabilidade morfofisiológica e patogênica, a identificação precisa da (s) espécie (s) de *Colletotrichum*, responsável (is) pela antracnose em jiló é essencial desde para pesquisas fundamentais sobre a biologia do (s) agente (s) patogênico (s) até o controle efetivo da doença por meio de estratégias de manejo adequadas.

Diante do exposto, os propósitos deste capítulo foram: 1) estabelecer um método de inoculação simples e eficiente para reprodução da antracnose em jiló, testar a virulência de isolados de *Colletotrichum* em jiló (cv. Tinguá) e identificar os isolados de *Colletotrichum* cuja virulência foi confirmada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPH) da Embrapa Hortaliças, em Brasília-DF.

2.2. Obtenção e assepsia dos jilós para inoculação

Jilós da cultivar Tinguá, ecótipo Gilo, tipo Verde-claro comprido e tolerante a antracnose (Pereira *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2015) foram comprados na Feira do Produtor Rural e Atacadista de Ceilândia e transportados para o laboratório.

Os frutos verdes sem sintomas de doenças e sem qualquer dano mecânico foram selecionados. Para a assepsia, os frutos foram submetidos a lavagem em água corrente com detergente neutro, imersão em sanitizante hortifrutícola Mikro Chlor (ECOLAB Química Ltda, Barueri, SP, Brasil) a 0,1 % por 10 minutos enxaguando a seguir em água destilada e secagem ao ar livre sobre papel toalha.

2.3. Metodologia de inoculação de *Colletotrichum* sp. em jiló

2.3.1. Preparo de inóculo

Isolado fúngico obtido de jiló, identificado morfológicamente apenas pelo gênero como *Colletotrichum* e codificado como Coll-265 pela Coleção Micológica do CNPH-Embrapa Hortaliças, foi cultivado em placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo batata-dextrose-ágar (BDA) a 25°C e 12 h de luz. Aos oito dias de cultivo e esporulado, colocou-se 20 mL de água destilada esterilizada na placa e, com uma alça de Drigalski de vidro, espalhou-se a água por toda a colônia para desprender as estruturas do fungo. Após, a suspensão foi filtrada em gaze dobrada em quatro vezes sobre um becker autoclavado para obter somente conídios.

A contagem de esporos foi feita em hemacitômetro (câmara de Neubauer) e a concentração foi ajustada para $2,0 \times 10^5$ conídios/mL.

2.3.2. Inoculação

Os frutos foram submetidas a quatro métodos de inoculação na região central por uma única vez: 1– ferimento com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de 15 µL do inóculo (M1); 2 – deposição de 15 µL do inóculo sobre o epicarpo do

fruto sem ferimento (M2); 3 – ferimento com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo (M3) e 4 – deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo sobre o epicarpo do fruto (M4).

A agulha de metal utilizada para ferir os frutos foi esterilizada em autoclave e a cada mudança de tratamento era flambada. A profundidade dos ferimentos foi de 4 mm atingindo a parte superior do mesocarpo.

O inóculo de 15 μ L foi depositado com uma micropipeta automática e ponteira esterilizada nos tratamentos com ferimento. Os discos de BDA com cultura do fungo nos métodos de inoculação 3 e 4 foram retirados da borda da colônia com oito dias de cultivo com perfurador de 0,5 cm de diâmetro esterilizado.

Nas testemunhas foram feitos os mesmos métodos com deposição de água destilada esterilizada para os procedimentos 1 e 2, designados como tratamentos M5 e M6 respectivamente e, deposição de um disco de BDA sem cultivo do fungo para os procedimentos 3 e 4, designados como tratamentos M7 e M8 respectivamente.

Após identificados, os frutos foram acondicionados em bandejas de isopor, previamente lavadas com detergente neutro e desinfetadas com álcool a 70 %, dispostas sobre a bancada do laboratório em temperatura e umidade ambiente (próximos de 24°C e 63%, respectivamente) por sete dias.

A esterilização de todos os utensílios foi feita em autoclave a 121°C por 15 minutos.

2.3.3. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 8 tratamentos, dos quais quatro foram testemunhas (M5, M6, M7 e M8), com 5 repetições por tratamento sendo um fruto a unidade experimental.

2.3.4. Avaliação

Diariamente os frutos foram vistoriados e, após o surgimento das lesões, iniciou-se as medições, que foram repetidas a cada 24 horas. O diâmetro da lesão foi obtido pela média de duas medidas perpendiculares com auxílio de paquímetro digital. Ao final de sete dias foi avaliada a incidência de antracnose por tratamento através da contagem de frutos com lesão.

2.3.5. Análise estatística

Os dados de cada tratamento foram submetidos à análise de variância e, quando o teste F foi significativo, aplicou-se o teste de comparação múltipla de Tukey com nível de significância de 5 %. As análises foram feitas com o software SAS 9.4 (Sas Institute Inc, 2013)

2.4. Virulência de isolados de *Colletotrichum* em jiló (cv. Tinguá)

Após assepsia, os frutos foram colocados dentro de bandejas de plástico, previamente lavadas e desinfetadas com álcool a 70 %, que se encontravam sobre bancada para posterior inoculação.

2.4.1. Obtenção dos isolados

Isolados oriundos de lesões de antracnose de frutos de jiloeiro naturalmente infectados e mantidos na Coleção Micológica do CNPH foram reativados. Quinze isolados preservados em método de água estéril (Castellani, 1939), previamente identificados morfológicamente como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, foram selecionados de acordo com a região geográfica do Brasil (Quadro 1). Discos de BDA contendo micélio de cada isolado selecionado e preservado foram transferidos para placa de Petri contendo meio BDA. As placas foram identificadas de acordo com seu respectivo isolado e mantidas em incubadora tipo BOD sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h.

Quadro 1 - Isolados fúngicos de podridão pós-colheita de jiló, pertencentes à coleção micológica do CNPH-Embrapa Hortaliças do Distrito Federal.

Códigos	Cidade/Local de Origem	Estado	Região
Coll-182	Carandaí	MG	Sudeste
Coll-265	São Joaquim de Bicas	MG	
Coll-266	São Joaquim de Bicas	MG	
Coll-586	Santa Maria de Jetibá	ES	
Coll-588	Santa Maria de Jetibá	ES	
Coll-691	Venda Nova do Imigrante	ES	
Coll-297	Santo Antônio do Descoberto	GO	Centro Oeste
Coll-375	Núcleo Bandeirante	DF	
Coll-418	Padre Bernardo	GO	

Coll-276	Taguatinga	DF	
Coll-635	Chã Grande	PE	Nordeste
Coll-636	Chã Grande	PE	
Coll-637	Chã Grande	PE	
Coll-682	Jaguaquara	BA	
Coll-282	Londrina	PR	Sul

2.4.2. Preparo de inóculo

Com oito dias de cultivo e esporulado, adicionou-se 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa com seu respectivo isolado e, com uma alça de Drigalski de vidro, espalhou-se a água por toda a colônia para desprender as estruturas fúngicas. Em seguida, a suspensão foi filtrada em gaze dobrada em quatro vezes para obter somente conídios.

A contagem de esporos foi feita em hemacitômetro e a concentração ajustada para $2,0 \times 10^5$ conídios/mL para todos os 15 isolados selecionados.

2.4.3. Inoculação

Os frutos foram separados em grupos de seis sobre a bancada do laboratório previamente desinfestada com álcool a 70 % e identificados individualmente com código do isolado a ser inoculado. Posteriormente, os frutos foram inoculados pelo M1 (método de inoculação descrito no experimento anterior deste capítulo) na região central do epicarpo por uma vez.

Os frutos foram acondicionados dentro de caixa plástica gerbox de 250 mL sem tampa e de forma aleatória. Estas caixas gerbox contendo os frutos foram colocadas dentro de bandejas de plástico revestidas com papel toalha umedecido com água esterilizada e envolvidas em saco plástico formando assim uma câmara úmida, onde permaneceram por sete dias sob avaliação diária. A temperatura e umidade dentro da câmara úmida foram mensuradas com “*data logger*” (registrador de dados) HOBO® U-12 a cada 2 h.

As testemunhas, compostas por frutos tratados com água destilada esterilizada ao invés do inóculo, também foram acondicionados de forma aleatória na câmara úmida pelo mesmo período de tempo.

2.4.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 16 tratamentos e seis repetições, sendo um fruto a unidade experimental.

2.4.5. Avaliação

Avaliou-se a incidência de antracnose, o tamanho da lesão, o período de incubação (tempo entre a inoculação e aparecimento de sintomas) e o período de latência (tempo entre a inoculação e o aparecimento de sinais) diariamente durante uma semana. A incidência de antracnose foi calculada pela contagem das lesões provocadas pela inoculação artificial no fruto. Dos frutos lesionados, obteve-se o diâmetro da lesão pela média de duas medidas perpendiculares com auxílio de paquímetro digital.

2.4.6. Análise estatística

Os dados de diâmetro da lesão foram submetidos à análise de variância e, quando o teste F foi significativo, aplicou-se o teste de médias de Tukey, para comparar os tratamentos entre si, e o teste de Dunnett, para comparar os tratamentos com a testemunha. Ambos testes foram realizados com um nível de significância de 5 %. As análises foram feitas com software SAS 9.4 (Sas Institute Inc, 2013).

2.5. Identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* que causam antracnose em jiló

2.5.1. Seleção dos isolados

Os isolados fúngicos codificados como Coll-182, Coll-265, Coll-266, Coll-276, Coll-282, Coll-297, Coll-418, Coll-586, Coll-588 e Coll-635 da Coleção Micológica do CNPH-Embrapa Hortaliças foram selecionados a partir dos resultados do teste de virulência.

Todos os dez isolados estavam previamente identificados apenas pelo gênero *Colletotrichum* com base em caracteres morfológicos antes de serem depositados na Coleção Micológica do CNPH.

Para uma posterior avaliação de controle da doença, fez-se necessário identificar os patógenos com base em dados moleculares.

2.5.2. Extração do DNA

Os isolados foram cultivados por oito dias em placas de Petri contendo BDA e mantidos em incubadora tipo BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Micélio mais esporos foram retirados da superfície da colônia dos isolados selecionados e depositadas em tubos de micro centrífuga de 2 mL para extração de DNA genômico de acordo com o protocolo de extração

preconizado por Dellaporta (1983) e modificado por Boiteux (1999). Após extração, ressuspendeu-se o DNA genômico em 100 µL de TE (Tris EDTA pH 8) mais RNase (TE+RNase) e armazenou-se em microtubo de 1,5 mL a -20°C. Para verificação da qualidade e estimativa da quantidade do DNA genômico extraído, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE. A esse gel foi aplicada uma mistura da amostra (5 µL da solução de DNA extraído mais 5 µL de corante azul de bromofenol). A quantificação de DNA se deu por comparação da intensidade do brilho das bandas de quantidade conhecida de DNA padrão que foi o DNA lambda (λ) nas concentrações de 20, 50, 100 e 200 ng/mL. Após aproximadamente 50 minutos em eletroforese a 90 volts, o gel foi imerso em brometo de etídeo (150 µL. L⁻¹ EtBr/ H₂O destilada) por 15 minutos para corar os DNAs genômico e lambda. Logo em seguida os DNAs em gel foram visualizados em um aparelho transluminador com luz ultravioleta (UV).

2.5.3. Amplificação e sequenciamento do produto amplificado

Para todos os isolados (Coll-182, Coll-265, Coll-266, Coll-276, Coll-282, Coll-297, Coll-418, Coll-586, Coll-588 e Coll-635), procedeu-se uma reação de polimerase em cadeia (PCR) para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) do DNA extraído, o qual foi amplificado utilizando-se oligonucleotídeos GDF1 (*forward*: 5'-GCCGTCACGACCCCTTCATTGA-3') e GDR1 (*reverse*: 5'-GGGTGGAGTCGTA CTTGAGCATGT-3') (Templeton *et al.*, 1992). Para o isolado Coll-265, por ter sido selecionado para uso em experimentos posteriores de avaliação de controle, também foram realizadas amplificações por PCR para as regiões genômicas actina (ACT) e beta-tubulina (TUB2). Para a actina, utilizou-se oligonucleotídeos ACT512F (*forward*: 5'-ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC-3') e ACT783R (*reverse*: 5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT-3') (Carbone & Kohn 1999). Para beta-tubulina foram Bt2a (*forward*: 5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') e Bt2b (*reverse*: 5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass & Donaldson, 1995).

Utilizou-se para realização da PCR: água ultrapura Milli-Q (13,6 µL); *tampão 10x PCR buffer (2,6 µL); *dNTPs (2,6 µL); oligonucleotídeos: senso e antisenso (1,4 µL); *MgCl₂ (1,6 µL); DMSO (0,8 µL); *Taq DNA polimerase (0,2 µL) (*Invitrogen™) e 0,8 µL de DNA amostra para um volume total de 25 µL.

A PCR foi realizada em termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad) sob as seguintes condições para GAPDH: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60,2°C por 30 segundos e

extensão a 72°C por 45 segundos. Para completar a reação um único passo a 72°C por 7 minutos foi realizado após os ciclos para extensão final das fitas de DNA. Para ACT e TUB2 as condições para PCR foram as mesmas com apenas diferença de temperatura na etapa de anelamento que foi a 62,1°C.

Os produtos amplificados (amplicons) foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE. Incluiu-se no gel um marcador molecular de DNA 1kb (Invitrogen). Após aproximadamente 40 minutos em eletroforese a 90 volts, o gel foi corado em brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

Para purificação dos produtos amplificados, utilizou-se Promega kit (Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System) seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante. Os amplicons purificados foram armazenados a 20°C negativos em tubo de 0,6 mL até o envio para sequenciamento. Os sequenciamentos dos amplicons foram realizados pela Macrogen Inc. em Seoul, Korea.

2.5.4. Análise filogenética

Após sequenciamento dos amplicons, sequências *forward* e *reverse* foram montadas usando o pacote Staden “*Staden Package*” (Staden *et al.*, 1998). As sequências recém geradas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI “*National Center for Biotechnology Information*” usando o algoritmo BLAST “*Basic Local Alignment Search Tool*” (Altschul *et al.*, 1990).

Após identificação preliminar das novas sequências a partir do BLAST, sequências tipo e de referência das espécies de *Colletotrichum* do complexo ‘*acutatum*’ (Damm *et al.*, 2012), de cada região genômica analisada, foram baixadas do ‘GenBank’ e comparadas por porcentagem de similaridade com as sequências recém-geradas. Alinhamentos de sequências múltiplas para cada gene independente foram realizados usando o servidor MAFFT v.7 (Katoh & Toh, 2013). O ajuste foi feito através do MEGA 7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016), quando necessário. O alinhamento de cada região genômica com o isolado Coll-265 foi carregado em SequenceMatrix v.1.8 (Vaidya *et al.*, 2011) para construir a matriz concatenada.

A filogenia para o gene GAPDH e para a matriz concatenada (GAPDH, ACT e TUB2) foram inferidas sob o critério de máxima verossimilhança “*maximum likelihood*” (ML). As análises ML foram feitas em RAxML - HPC2 (Stamatakis, 2014) implementado no portal CIPRES “*Science Gateway*” (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). As buscas de árvores ML foram realizadas sob o modelo GTRGAMMA com 1000 replicatas.

3. RESULTADOS

3.1. Metodologia de inoculação de *Colletotrichum* em jiló

Apenas pelos métodos de inoculação M1 (ferimento com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de 15 µL do inóculo) e M3 (ferimento com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo) foi possível observar lesões de antracnose em jilós provocadas por *Colletotrichum* (Coll-265) com 16,34 mm e 10,67 mm de diâmetro médio, respectivamente e, que não diferiram entre si pelo teste de Tukey (ao nível de significância de 0,05 de probabilidade). Estes diferiram dos demais métodos de inoculação e das testemunhas. A incidência ocorreu no terceiro dia após a inoculação, iniciando-se, portanto, a avaliação a partir daí. No M3, observou-se incidência de antracnose no primeiro dia de avaliação (20 %), enquanto que, no M1 a incidência de lesão apareceu no segundo dia de avaliação de forma mais severa (60 %) e atingiu a incidência de 100 % já na 5ª avaliação, ao passo que, o M3 atingiu a sua incidência máxima na 4ª avaliação (60 %) permanecendo constante ao longo das avaliações (Tabela 3).

Os outros métodos de inoculação não proporcionaram a ocorrência de antracnose até o término do experimento.

Tabela 3 - Incidência de antracnose causada pelo isolado Coll-265 de *Colletotrichum* inoculado artificialmente por diferentes métodos.

Tratamentos	Avaliações/Incidência (dia/%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
M1*	-	60	80	80	100	100	100	100	100
M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	20	40	40	60	60	60	60	60	60
M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* M1 = Método de inoculação 1 - ferimento com um furo utilizando agulha de metal de 1,25mm de diâmetro + deposição de 15 µL do inóculo; M2 = Método de inoculação 2 - apenas deposição de 15 µL do inóculo sobre o epicarpo do fruto sem ferimento; M3 = Método de inoculação 3 - ferimento com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA com cultivo do fungo; M4 = Método de inoculação 4 -

apenas deposição de 0,5 cm de diâmetro de um disco de BDA com cultivo do fungo sobre o epicarpo do fruto; M5 = Método de inoculação 5 - fermento utilizando um furo com agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + 15 µL de água destilada esterilizada; M6 = Método de inoculação 6 - apenas deposição de 15 µL de água destilada esterilizada sobre o epicarpo do fruto sem fermento; M7 = Método de inoculação 7 - fermento com um furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro + deposição de um disco de BDA sem cultivo do fungo; M8 = Método de inoculação 8 - apenas deposição de um disco de BDA sem cultivo do fungo sobre o epicarpo do fruto.

3.2. Virulência de isolados de *Colletotrichum* em jiló (cv. Tinguá)

A temperatura e umidade relativa dentro da câmara úmida variaram entre 22,1°C a 25,2°C e 65,9 % a 99,4 %, respectivamente, durante os sete dias de armazenamento (Anexo 1).

No terceiro dia após a inoculação, apenas frutos inoculados com o isolado Coll-182 apresentaram pequena lesão circular levemente deprimida enquanto que frutos inoculados com os isolados Coll-265, Coll-266, Coll-297, Coll-586 e Coll-588 apresentaram o mesmo sintoma no dia posterior. Os frutos inoculados com o isolado Coll-635 manifestaram sintoma inicial de antracnose aos cinco dias após inoculados. O isolado Coll-282 teve o período de incubação mais tardio com manifestação de sintoma nos frutos ao final do experimento (Figura 5).

A esporulação de cada isolado virulento ocorreu no dia subsequente após o relato do sintoma inicial nos frutos. Portanto, o isolado Coll-182 apresentou período de latência mais curto e o Coll-635 apresentou período de latência mais longo, enquanto que a maioria dos isolados virulentos apresentaram período de latência de cinco dias. O isolado Coll-282 não apresentou esporulação devido aos frutos apresentarem sintoma no último dia de avaliação (Figura 5).

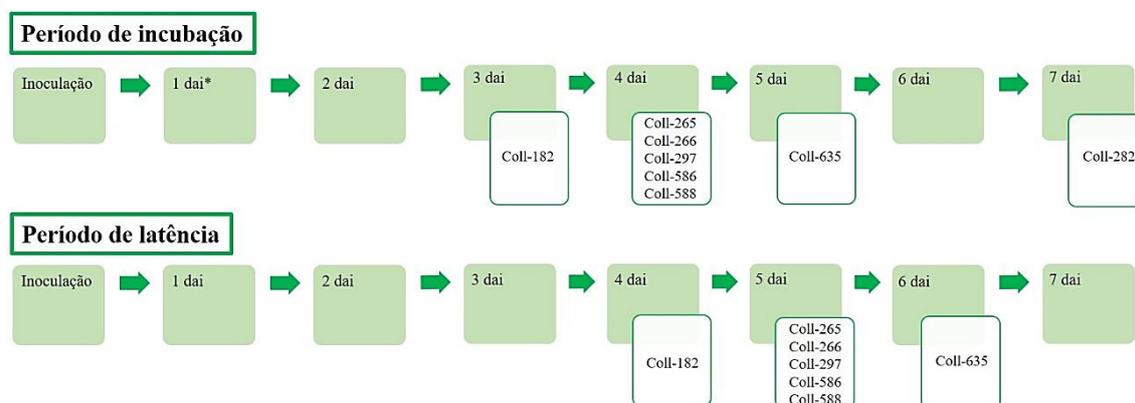


Figura 5 – Período de incubação e latência dos isolados virulentos de *Colletotrichum* pertencentes à Coleção Micológica do CNPH/Embrapa Hortalças. *dai = dias após inoculação.

Os isolados Coll-375, Coll-636, Coll-637, Coll-682 e Coll-691 não causaram doença e juntamente com os isolados Coll-282 e Coll-276, embora virulentos, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 % por apresentarem pequeno diâmetro médio da lesão (Tabela 4).

Os isolados Coll-265 e Coll-266 se destacaram por causarem as maiores lesões nos frutos com diâmetros médio de aproximadamente 13 mm e 11 mm, respectivamente.

Entre os tratamentos com isolados virulentos, o Coll-265 que apresentou o maior diâmetro médio da lesão não diferiu estatisticamente do Coll-182, Coll-266, Coll-297, Coll-586 e Coll-588 (Tabela 4).

Tabela 4 – Diâmetro médio da lesão de isolados de *Colletotrichum* e incidência de antracnose em jiló aos sete dias após inoculação dos isolados de *Colletotrichum* da Coleção Micológica do CNPH.

Isolados	Diâmetro médio da lesão (mm)	Incidência de antracnose (%)
Coll-182	9,833 ^{abc*}	100
Coll-265	13,042 ^a	100
Coll-266	11,125 ^{ab}	100
Coll-276	5,042 ^{cde}	100
Coll-282	0,542 ^{de}	16,67
Coll-297	8,375 ^{abc}	100
Coll-375	0,0 ^e	0
Coll-418	5,542 ^{cd}	66,67
Coll-586	8,708 ^{abc}	100
Coll-588	9,5 ^{abc}	100
Coll-635	7,0 ^{bc}	100
Coll-636	0,0 ^e	0
Coll-637	0,0 ^e	0
Coll-682	0,0 ^e	0
Coll-691	0,0 ^e	0
Testemunha	0,0 ^e	0
CV = 51,17 %		

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 de probabilidade).

Todos os tratamentos com isolados virulentos (Coll-182, Coll-265, Coll-266, Coll-276, Coll-297, Coll-418, Coll-586, Coll-588 e Coll-635), com exceção do Coll-282, foram significativamente diferentes da testemunha pelo teste de Dunnet ao nível de significância de 5 %.

Ao final do experimento, todos os isolados virulentos causaram 100 % de incidência de antracnose nos frutos, com exceção dos isolados Coll-282 (16,67 %) e Coll-418 (66,67 %) de

acordo com a Tabela 4 e a Figura 6. Além de ter causado menos incidência de antracnose, o isolado Coll-282 também apresentou o menor diâmetro médio da lesão com aproximadamente 0,5 mm, não diferindo significativamente da testemunha tanto pelo teste de Tukey a 5 % como pelo teste de Dunnet a 5 %.

Todos os tratamentos com isolados virulentos tiveram frutos com lesão necrótica em formato circular, extremidades ligeiramente elevadas de coloração marrom-escura e tecido deprimido no centro onde é produzido massa conidial de cor laranja que conforme se aproxima dos bordos se torna mais clara (Figura 6). Essas tonalidades de laranja são devidas ao acúmulo de conídios e sua produção que foi mais expressiva no local ferido onde o inóculo foi depositado e que, portanto, foi mais visível a olho nú. De acordo com o gráfico de cores micológica preparado por Rayner (1970), a massa de esporos supracitada pode ser classificada como Salmon (41).

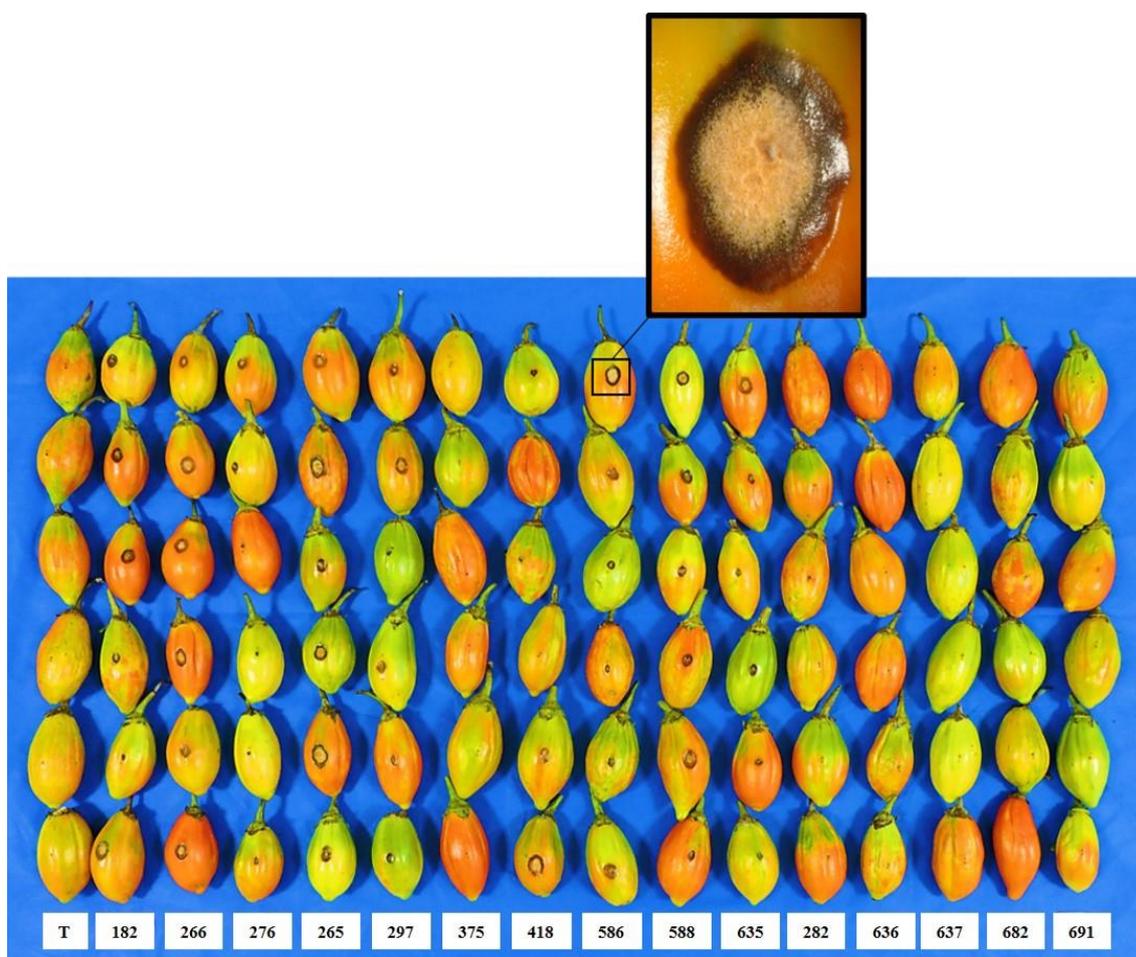


Figura 6 - Antracnose em frutos de jiloeiro aos sete dias após inoculação com isolados de *Colletotrichum* da Coleção Micológica do CNPH-Embrapa Hortaliças. O sintoma causado pelo isolado 586, destacado em tamanho maior, foi fotografado em microscópio estereoscópico.

3.3. Identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* que causam antracnose em jiló

Todas as espécies tipo do complexo *C. acutatum* (Anexo 3) foram utilizadas para análise de multigene do isolado Coll-265 e de GAPDH dos demais isolados virulentos (Coll-182, Coll-266, Coll-282, Coll-276, Coll-297, Coll-418, Coll-586, Coll-588 e Coll-635).

Sequência de GAPDH de todos os isolados virulentos de *Colletotrichum* obtidos de jiló das quatro regiões do Brasil apresentaram alto grau de homologia (96 %) com sequência de espécie tipo de *C. tamarilloi* depositada no 'GenBank' (Figura 7).

Pela análise multigênica, o Coll 265 se agrupou com os isolados de *C. tamarilloi* depositados no 'GenBank' com similaridade de 100 % indicando ser da mesma espécie (Figura 8).

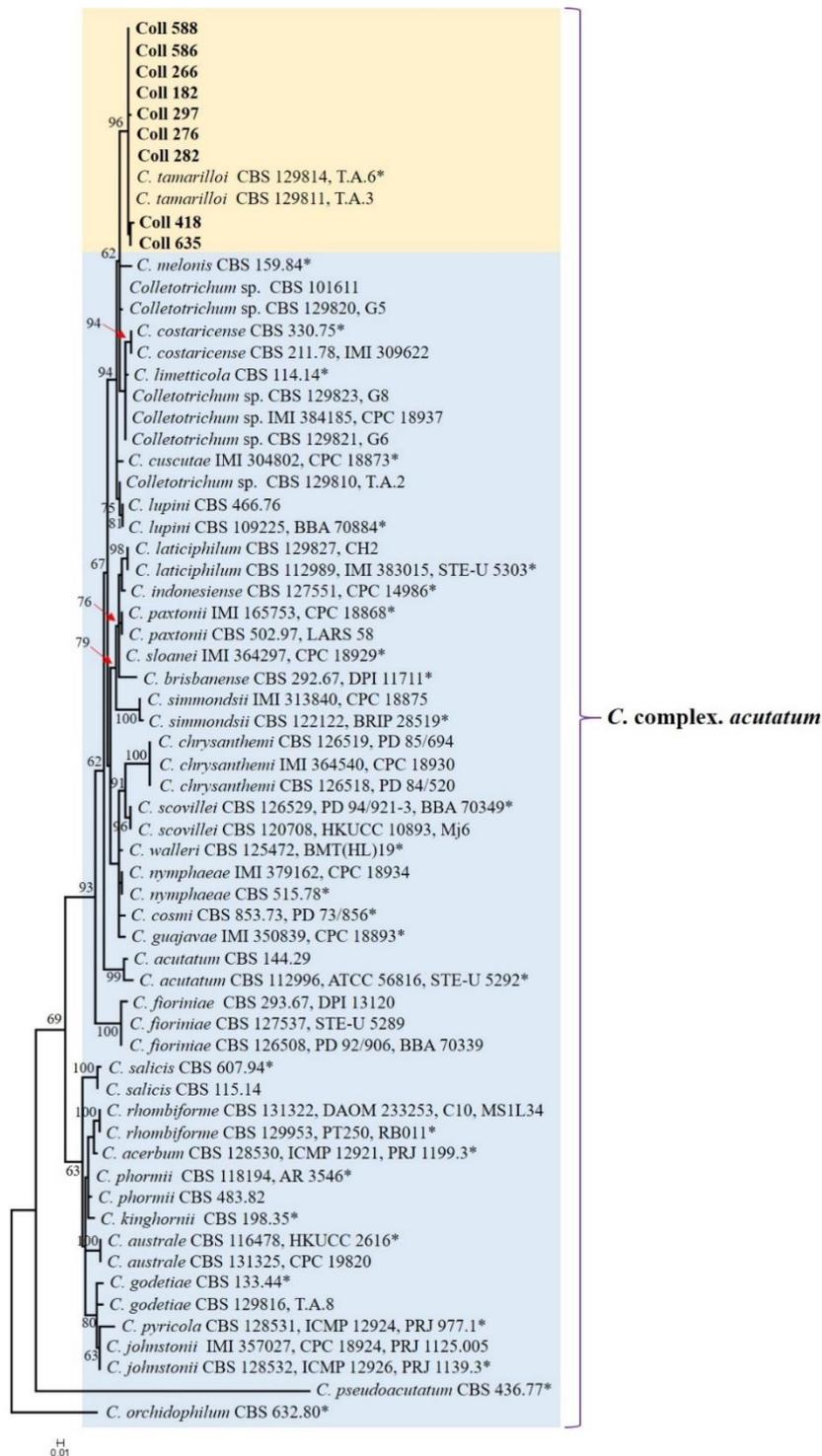


Figura 7 – Árvore de máxima verossimilhança de nove isolados de *Colletotrichum* com base em dados do gene GAPDH. As relações filogenéticas de isolados de *Colletotrichum* obtidos de frutos de *Solanum aethiopicum* são comparadas com outros membros do complexo de *C. acutatum*. *C. orchidophilum* é usado como ‘outgroup’. Os valores de suporte ‘bootstrap’ acima de 50 % (à esquerda) são mostrados nos nós. A barra de escala indica o número de substituições por posição de nucleotídeo. *Espécies tipo de *Colletotrichum* do complexo *acutatum* (Anexo 3).

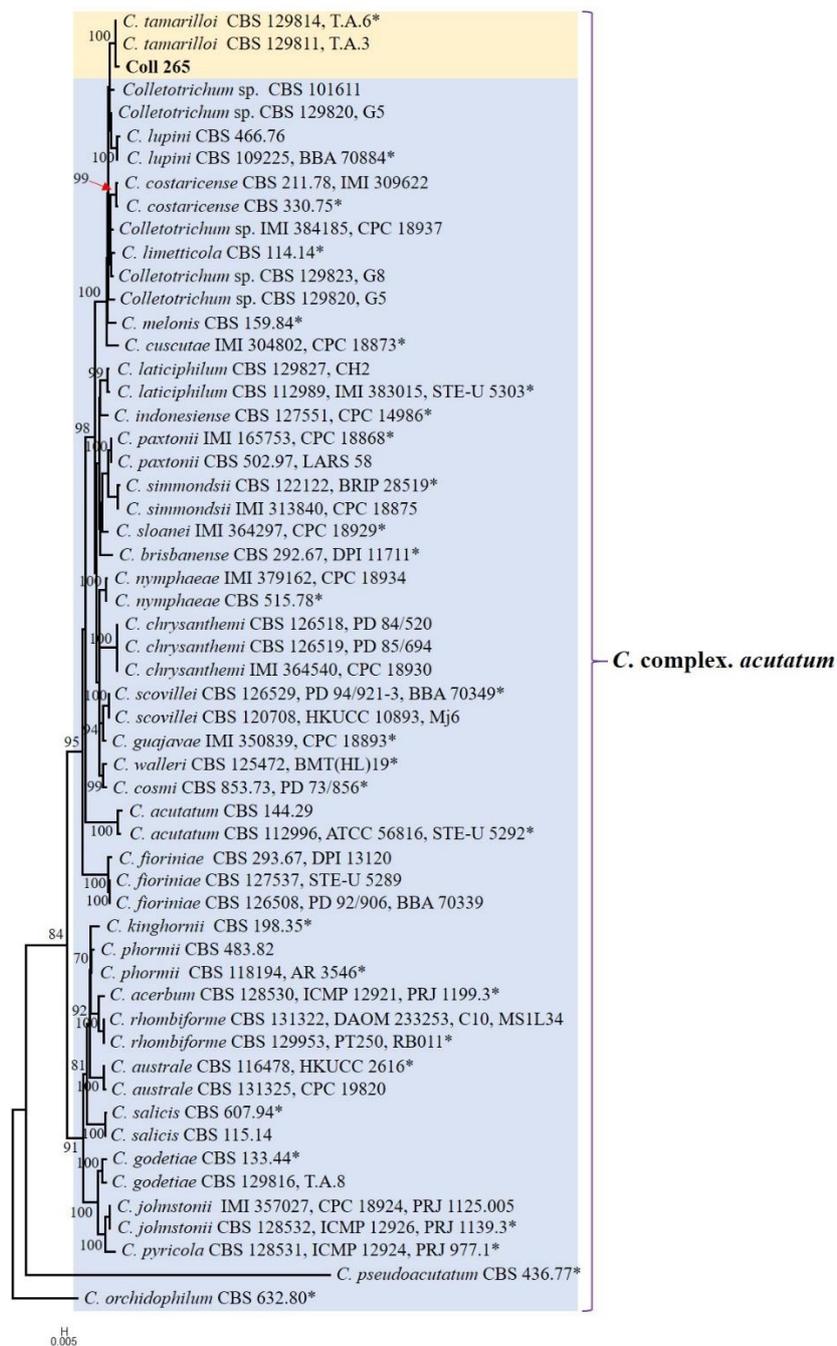


Figura 8 – Árvore de máxima verossimilhança de um isolado de *Colletotrichum* com base em dados multigene (GAPDH, ACT e TUB2). As relações filogenéticas do isolado de *Colletotrichum* obtido de fruto de *Solanum aethiopicum* são comparadas com outros membros do complexo de *C. acutatum*. *C. orchidophilum* é usado como ‘outgroup’. Os valores de suporte ‘bootstrap’ acima de 50 % (à esquerda) são mostrados nos nós. A barra de escala indica o número de substituições por posição de nucleotídeo. *Espécies tipo de *Colletotrichum* do complexo *acutatum* (Anexo 3).

4. DISCUSSÃO

A não observância de incidência de antracnose em frutos inoculados pelos métodos de inoculação M2 (apenas deposição de inóculo sobre o epicarpo do fruto) e M4 (apenas deposição de disco de BDA com cultivo do fungo sobre o epicarpo do fruto) foi devido, primariamente, ao mecanismo de defesa estrutural pré-formado do fruto, representado pela cutícula. A cutícula é o primeiro obstáculo dos órgãos da parte aérea da planta a ser vencido por patógenos (Amorim & Pascholati, 2011). Essa barreira formada pela cutícula é composta por material lipídico (cutina e substâncias cerosas) que reveste a epiderme protegendo-a contra a entrada de fitopatógenos (Agrios, 2005). A dificuldade de *C. tamarilloi* penetrar o tecido sadio de jiló refletiu no não surgimento do sintoma nos frutos durante o período de avaliação do experimento. Em estudo de histopatologia com *C. gloeosporioides* em goiaba usando o mesmo método de inoculação M2, a penetração na cutícula se deu 48h após a inoculação (Moraes *et al.*, 2013). Porém, deve-se considerar que a cutícula de jiló é mais resistente que a da goiaba, o estágio de maturação dos frutos das diferentes espécies botânicas não foi o mesmo e que as espécies de *Colletotrichum* não possuem mesma estratégia de infecção.

Sabe-se que as doenças fúngicas pós-colheita, comumente, são causadas por infecções pré-colheita pela penetração direta do patógeno sobre a superfície do hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2006; Prusky & Lichter, 2007; Prusky *et al.*, 2013) ou infecções pós-colheita através de ferimentos causados pelo manuseio incorreto, transporte e armazenamento inadequados (Dantas *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2011).

Tais métodos de inoculação, M2 e M4, por não apresentarem incidência de antracnose em 12 dias de experimentação, são inviáveis para experimento de histopatologia e controle pois, o jiló, após esse período, fica comprometido devido ao estágio de maturação e desidratação bastante avançados.

É importante destacar que o sintoma da antracnose se manifestou em todos os frutos inoculados pelo M1 (ferimento + deposição de 15 μ L do inóculo) o que não ocorreu em M3 (ferimento + deposição de um disco de BDA com cultivo do fungo), que ao término do experimento apresentou incidência mais baixa (60 %). Ou seja, a inoculação pelo M1 se apresentou mais uniforme garantindo ocorrência da doença em todos os frutos em uma semana de experimentação.

Embora não tenham diferido entre si, estatisticamente, pelo diâmetro médio da lesão, frutos inoculados pelo M3 apresentaram variação muito alta dos valores, enquanto, frutos inoculados por M1 apresentaram valores próximos entre si.

O estágio de maturação do jiló, selecionado para estudo, foi devido a sua cadeia de produção no Brasil onde ele é colhido, transportado, comercializado e consumido com o epicarpo (casca) de coloração verde. Como o processo de amadurecimento do jiló continua a ocorrer mesmo separado da planta (fruto climatérico), seu estágio de maturação com epicarpo ainda verde facilita o manuseio e aumenta o tempo de experimentação ajudando a identificar o tempo de incubação e latência dos isolados fúngicos testados.

Esses tempos de incubação e latência, aqui mensurados, variaram de acordo com o isolado. Embora todos os isolados sejam da mesma espécie fúngica, suas estratégias de infecção podem ser diferentes ou alguns isolados desenvolveram suas estruturas de infecção especializadas mais rápidas que outros. Em Perfect *et al.* (1999) vários estágios do processo de infecção do *Colletotrichum* foram apresentados e, por ser patógeno pós-colheita, a fisiologia do órgão da planta destacado está diretamente associada ao seu sucesso parasitário. Durante o amadurecimento, os frutos são submetidos a processos fisiológicos como a ativação da biossíntese de etileno, alterações cuticulares e afrouxamento da parede celular, alterações que são acompanhadas por um declínio de compostos antifúngicos (Prusky *et al.*, 2013) facilitando a entrada e colonização de patógenos.

Por não ter sido em um ambiente com temperatura e umidade controladas, tais parâmetros foram mensurados e suas variações se deveram pelo fato de manusear as câmaras úmidas nos momentos de avaliação. Embora tenha existido variações de temperatura e umidade no período avaliado, a amplitude térmica foi baixa de apenas 3,1°C e a umidade relativa alta com valores acima de 65 % atingindo até 99 %, valores estes, que se aproximam aos apresentados por Estrada *et al.* (2000) para um melhor crescimento e desenvolvimento de *C. gloeosporioides*. Estas variações de temperatura, inclusive, podem ter favorecido nos diferentes estágios de desenvolvimento dos patógenos aqui estudados pois, Dias *et al.* (2005) ao estudarem *Colletotrichum* spp. obtidos de *Coffea arabica* observaram que uma única temperatura não parece ser ideal para obter maior crescimento micelial, germinação e produção de conídios para um mesmo isolado. De acordo com o que foi apresentado em Estrada *et al.* (2000) a maioria dos conídios do isolado de *C. gloeosporioides* testado em casca de manga germinaram formando apressório em temperaturas de 25°C e 30°C a 100 % de UR. Quanto à umidade relativa, Estrada *et al.* (2000), utilizando o mesmo substrato inoculado pelo mesmo isolado e incubado a 25°C, observaram que a porcentagem de germinação foi maior a 97,5 % e 100 %.

É importante ressaltar que todos os isolados estavam preservados em método de Castellani, variando de 6 anos (Coll-691) a 14 anos (Coll-182), e mostraram-se viáveis por terem esporulado em meio sintético BDA e mantido suas características morfológicas originais,

embora nem todos tiveram sua virulência comprovada. De acordo com a literatura, o método de preservação de Castellani ou de água destilada esterilizada é muito eficiente, com resultados positivos para diversos gêneros de fungo, principalmente *Colletotrichum* podendo ser preservado com viabilidade mantida por décadas (Aparecido *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2012; Aparecido & Camilo, 2013; Camilo *et al.*, 2014).

Os isolados que não se apresentaram virulentos possivelmente eram espécies oportunistas que causaram infecções secundárias e foram obtidas como agente principal ou, simplesmente, não provocaram sintomas nas condições experimentais utilizadas. Para esse último caso, vale ressaltar que o isolado Coll-282 causou sintoma inicial de antracnose no último dia de avaliação o que levou a considerá-lo como virulento, mas que pelos testes de média não diferiu significativamente da testemunha. Um outro fator importante é a cultivar utilizada que tem sido descrita como tolerante a antracnose (Pereira *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2015).

Com base em dados de morfologia, apenas a espécie *C. gloeosporioides* era relatada como causadora da antracnose do jiló no Brasil (Fernandes *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2002). Em 2006 Tozze Júnior *et al.* observaram que as características morfológicas de isolados obtidos de antracnose do jiló procedentes de várias regiões do Brasil se assemelhavam com as descritas para *C. acutatum*. Um ano depois, Castilho *et al.* (2007), fazendo uso também de ferramentas morfológicas, apresentaram resultados parecidos. Entretanto, mas nada foi confirmado molecularmente permitindo que autores posteriores ainda citassem o *C. gloeosporioides* como agente ou um dos agentes da antracnose do jiló no Brasil (Reis *et al.*, 2009; Bonett *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2012).

O *C. tamarilloi*, aqui identificado como o agente causal da antracnose em jiló, já tinha sido mencionado por Alexandre *et al.* (2014), que usaram em seu estudo de sensibilidade a diferentes fosfitos um isolado representativo oriundo de jiló, coletado em Pernambuco, local de origem de dois dos isolados caracterizados neste trabalho. Porém estes autores nada descreveram sobre seu diagnóstico e análise molecular.

Com base em conjunto de análises fenotípica, multigênica e patogênica, o *C. tamarilloi* foi identificado apenas como agente causal de antracnose em tamarillo (*Solanum betaceum*) na Colômbia (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003) e no Equador (Caicedo *et al.*, 2017).

A delimitação de espécies com base apenas na morfologia é impossível em *Colletotrichum*. Por conta disso, fez-se necessário a análise molecular dos isolados virulentos com o intuito de identifica-los ao nível de espécie com precisão e estudar uma estratégia de controle da antracnose em frutos de jiloeiro, que possa ser satisfatória.

Neste trabalho, para identificação do isolado Coll-265, utilizou-se múltiplos marcadores moleculares (GAPDH, β -tubulina e actina) conforme alguns autores (Cai *et al.*, 2009; Cannon *et al.*, 2012; Honger *et al.*, 2014) tem sugerido. Com estes marcadores é possível compreender a divergência filogenética das espécies de *Colletotrichum* do complexo ‘acutatum’ por serem muito informativos. Estes marcadores, associados aos dados de morfologia, são eficientes para delimitar espécies dentro do complexo *C. acutatum*.

A maioria dos estudos para *Colletotrichum* spp. utiliza os marcadores moleculares β -tubulina e GAPDH segundo Damm *et al.* (2012), embora, até o momento, não exista acordo entre os micologistas sobre quais marcadores devem ser usados. Em publicação mais recente Hyde *et al.* (2014) recomendaram o gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), espaçador interno transcrito (ITS), beta-tubulina (β -tubulina), glutamina sintetase (GS), quitina sintase (CHS-1), histona 3 (HIS3), actina (ACT) e região intergênica dos genes *apn 2* e *MAT 1-2-1* (ApMat) como marcadores genéticos para *Colletotrichum*, sendo que, a combinação deles pode resolver as posições filogenéticas de praticamente todas as espécies deste gênero.

O GAPDH, por si só, segundo Hyde *et al.*, (2014) pode delinear a maioria das espécies, o mesmo não acontece com a região ITS por ser altamente conservada nos genomas das espécies de *Colletotrichum* assim como em outros gêneros de fungos (Crouch *et al.*, 2009).

De acordo com Damm *et al.* (2012) o *C. tamarilloi* pertence ao complexo ‘acutatum’ o que levanta a suspeita de que sua estratégia de infecção seja necrotrófica subcuticular intramural, não apresentando quiescência durante o fruto verde e nem adiando a colonização e o surgimento de sintoma. (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Ainda em Wharton & Diéguez-Uribeondo (2004), na fase necrotrófica subcuticular-intramural, hifas subcuticulares intramural iniciam a colonização do hospedeiro e a fase biotrófica é muito curta ou não ocorre corroborando com os resultados encontrados no teste de virulência em que mesmo com o fruto verde, o sintoma é manifestado de forma rápida e bem evidente.

Tal entendimento sobre a etiologia da antracnose em jiló é fundamental para desenvolvimento de estratégias de controle.

5. CONCLUSÕES

- O método de inoculação com fermento no fruto através de furo utilizando agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro, com deposição de 15 µL do inóculo (M1) e profundidade de 4 mm é o mais indicado para estudos de histologia, patogenicidade, virulência e controle pós-colheita da antracnose do jiló;
- Coll-182, Coll-265, Coll-266, Coll-297, Coll-586 e Coll-588 foram os isolados mais virulentos.
- Todos os isolados de diferentes regiões do Brasil que reproduziram sintoma de antracnose em jiló foram identificados como *Colletotrichum tamarilloi*.

6. LITERATURA CITADA

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. 1990 Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

AGRIOS, G.N. 2005. Parasitism and disease development. *In: AGRIOS, G.N. Plant pathology*. 5ª ed. Elsevier Academic. New York. p.77-104.

ALEXANDRE, E.R.; HERCULANO, LM.; SILVA, J.M. & OLIVEIRA, S.M.A. 2014. Fosfitos no manejo da antracnose do jiló. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 49:930-938.

AMORIM, L. & PASCHOLATI, S.F. 2011. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. *In: AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.) Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 4ª ed. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. p. 61-98.

APARECIDO, C.C. & CAMILO, C.M. 2013. Comparação de métodos para a preservação de fungos do gênero *Colletotrichum* em laboratório. *Biológico* 75:17-22.

APARECIDO, C. C.; HUANG, T. M.; PASSADOR, M. M.; FINATTI, D. & FIGUEIREDO, M. B. 2007. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização. *Biológico* 69:5-8.

BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N & SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of American Society for Horticultural Science*. 124:32-38.

BONETT, L.P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R.G.A; AQUINO, T.F. & WENZEL, J.B. 2010. Caracterização morfocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. *Ambiência* 6:451-463.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS,

- R.G.; MCKENZIE, E.H.C. & JOHNSTON, P.R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39:183-204.
- CAMILO, C.M.; COSTA, I.A.M & APARECIDO, C.C. 2014. Preservação de *Colletotrichum* spp. em laboratório e identificação de isolados por marcadores morfológicos e PCR. *Biológico* 76:29-34.
- CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R. & WEIR, B.S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213.
- CARBONE I. & KOHN L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556.
- CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24:270-276.
- CASTILHO, L.B.; REIS, A. & HENZ, G.P. 2007. Identificação morfométrica de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose em solanáceas. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 29. Embrapa Hortaliças. Brasília.
- CROUCH, J.A; CLARKE, B.B. & HILLMAN, B.I. 2009. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101:648-656.
- DAMM, U.; CANNON, P.F; WOUDEBERG, J.H.C & CROUS, P.W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73:37-113.
- DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; MICHEREFF, S.J.; NASCIMENTO, L.C.; GURGEL, L.M.S & PESSOA, W.R.L.S. 2003. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. *Fitopatologia Brasileira* 28: 528-533.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J. & HICKS, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- DIAS, M.D.; POZZA, E.P.; ABREU, M.S & MIRANDA, E.O. 2005. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia* 29:545-552.
- ESTRADA, A.B.; DODD, J.C. & JEFFRIES, P. 2000. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 49:608-618.
- FERNANDES, M.C.A.; SANTOS, A.S. & RIBEIRO, R.L.D. 2001. Sensibilidade ao fungicida benomyl *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela. *Arquivos do Instituto Biológico* 68:89-95.
- FERNANDES, M.C.A.; SANTOS, A.S. & RIBEIRO, R.L.D. 2002. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. *Summa Phytopathologica* 28:325-330.

- FISCHER, I.H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S.A. & AMORIM, L. 2007. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de “packinghouse”. *Fitopatologia Brasileira* 32:304-310.
- FISCHER, I.A.; ALMEIDA, A.M.; ARRUDA, M.C.; BERTANI, R.M.A.; GARCIA, M.J.M. & AMORIM, L. 2011. Danos em pós-colheita de goiabas na Região do Centro-Oeste Paulista. *Bragantia* 70:570-576.
- FREEMAN, S.; KATAN, T. & SHABI, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605.
- GLASS, N.L. & DONALDSON, G. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323-1330.
- HONGER, J.O.; OFFEI, S.K.; ODURO, K.A.; ODAMTEN, G.T. & NYAKU, S.T. 2014. Identification and species status of the mango biotype of *Colletotrichum gloeosporioides* in Ghana. *European Journal of Plant Pathology* 140:455-467.
- HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L. & ZHANG, J.Z. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-182.
- HYDE, K.D.; NILSSON, R.H. ALIAS, S.A.; ARIYAWANSA, H.A.; BLAIR, J.E.; CAI, L.; COCK, A.W.A.M.; DISSANAYAKE, A.J.; GLOCKLING, S.L.; GOONASEKARA, I.D.; GORCZAK, M.; HAHN, M.; JAYAWARDENA, R.S.; KAN, J. A. L.; LAURENCE, M.H.; LÉVESQUE, C.A.; LI, X.; LIU, J.K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; MANAMGODA, D.S.; MARTIN, F.N.; MCKENZIE, E.H.C.; MCTAGGART, A.R.; MORTIMER, P.E.; NAIR, P.V.R.; PAWŁOWSKA, J.; RINTOUL, T.L.; SHIVAS, R.G.; SPIES, C.F.J.; SUMMERELL, B.A.; TAYLOR, P.W.J.; TERHEM, R.B.; UDAYANGA, D.; VAGHEFI, N.; WALTHER, G.; WILK, M.; WRZOSEK, M.; XU, J.C.; YAN, J. & ZHOU, N. 2014. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. *Fungal Diversity* 67:21-125.
- KATOH, K. & TOH, H. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780.
- KUMAR, S.; STECHER, G. & TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- LIMA, L.M.; MORAIS, P.L.D.; MEDEIROS, E.V.; MENDONÇA, V.; XAVIER, I.F. & LEITE, G.A. 2009. Qualidade pós-colheita do mamão formosa ‘tainung 01’ comercializado em diferentes estabelecimentos no município de mossoró-RN. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31:902-906.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; HYDE, K.D.; GARETH JONES, E.B.; MCKENZIE, E.H.C.; BHAT, J.D.; DAYARATHNE, M.C.; HUANG, S.K.; NORPHANPHOUN, C.; SENANAYAKE, I.C.; PERERA, R.H.; SHANG, Q.J.; XIAO, Y.; D'SOUZA, M.J.; HONGSANAN, S.; JAYAWARDENA, R.S.; DARANAGAMA, D.A.; KONTA, S.; GOONASEKARA, I.D.; ZHUANG, W.Y.; JEEWON, R.; PHILLIPS, A.J.L.; ABDELWAHAB, M.A.; AL-SADI, A.M.; BAHKALI, A.H.; BOONMEE, S.; BOONYUEN, N.; CHEEWANGKON, R.; DISSANAYAKE, A.J.; KANG, J.; LI, Q.R.; LIU, J.K.; LIU, X.Z.; LIU, Z.Y.; LUANGSA-ARD, J.J.; PANG, K.L.; PHOOKAMSAK, R.; PROMPUTTHA, I.; SUETRONG, S.; STADLER, M.; WEN, T. & WIJAYAWARDENE, N.N. 2016. Families of *Sordariomycetes*. *Fungal Diversity* 79: 1-317.

MORAES, S.R.G.; TANAKA, F.A.O. & MASSOLA JÚNIOR, N.S. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 35:657-664.

OLIVEIRA, S.M.A; TERAQ, D.; DANTAS, S.A. F & TAVARES, S.C.C.H. 2006. Patologia pós-colheita. *In*: OLIVEIRA, S.M.A; TERAQ, D.; DANTAS, S.A.F. & TAVARES, S.C.C. H. Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Brasília. p.21-44.

PEREIRA, R.P; PINHEIRO, J.B.; ANDERSON, J & REIS, A. 2012. Doenças e pragas do jiloeiro. Circular técnica 106. Embrapa Hortaliças.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J & GREEN, J.R. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.

PINHEIRO, J.B.; PEREIRA, R.B.; FREITAS, R.A. & MELO, R.A.C. 2015. A cultura do jiló. Coleção plantar 75. 1ª ed. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília.

PIRES, G.C.C.; APARECIDO, C.C & FINATTI, D. 2012. Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. *Biológico* 74:9-16.

PRUSKY, D. & LICHTER, A. 2007. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters* 268:1-8.

PRUSKY, D.; ALKAN, N.; MENGISTE, T. & FLUHR, R. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology* 51:155-76.

RAYNER, R.W. 1970. A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, Kew.

RÉBLOVÁ, M.; GAMS, W. & SEIFERT, K.A. 2011. Monilochaetes and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the *Microascales*. *Studies in Mycology* 68: 163-191.

REIS, A.; BOITEUX, L.S. & HENZ, G.P. 2009. Antracnose em hortaliças da família *Solanaceae*. Circular técnica 79. Embrapa Hortaliças. Brasília.

SAS INSTITUTE INC. 2013. Base SAS®9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures. 2ª ed. NC: SAS Institute Inc - Cary.

SERRA, I.M.R.S.; COELHO, R.S.B.; FERRAZ, G.M.G.; MONTARROYOS, A.V.V. & SILVA, D.S. 2011. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. *Summa Phytopathologica* 37:42-51.

STADEN, R; BEAL, K.F. & BONFIELD, J.K.1998. The Staden package. *In: MISENER S, KRAWETZ S.A. (eds). Bioinformatics methods and protocols. Humana. New York. p.115-130.*

STAMATAKIS, A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30:1312-1313.

SUTTON, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *In: BAILEY, J.A. & JEGER, M.J. (eds.) Colletotrichum – Biology, pathology, and control. CAB International. Wallingford. p.1-26.*

TEMPLETON, M.D.; RIKKERINK, E.H.A.; SOLON, S.L. & CROWHURST, R.N. 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, H.J.; MELLO, M.B.A & MASSOLA JÚNIOR., N.S. 2006. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops. *Summa Phytopathologica* 32:71-79.

VAIDYA, G.; LOHMAN, D.J. & MEIER, R. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistic* 27:171-180.

WARD, E.; FOSTER, S.J.; FRAAIJE, B.A. & MCCARTNEY, H.A. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology* 145:1-16.

WHARTON, P.S. & DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.

ZHANG, N.; CASTLEBURY, L.A.; MILLER, A.N.; HUHNDORF, S.M.; SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; ROSSMAN, A.Y.; ROGERS, J.D.; KOHLMAYER, J.; SUNG, G.H. 2006. An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98:1076-1087.

CAPÍTULO 3

QUITOSANA NO CONTROLE PÓS-COLHEITA DA ANTRACNOSE DO JILÓ

QUITOSANA NO CONTROLE PÓS-COLHEITA DA ANTRACNOSE DO JILÓ

RESUMO

No presente trabalho, objetivou-se controlar a antracnose do jiló (*Solanum aethiopicum* L.), causada por *C. tamarilloi*, por meio de revestimento comestível à base de quitosana. De início, testou-se a quitosana em diferentes concentrações para inibir o desenvolvimento do patógeno em placa de Petri. A quitosana, preparada por dissolução em solvente ácido cítrico em diferentes concentrações, foi misturada com batata-dextrose-ágar (BDA) fundido a 40°C. As misturas foram depositadas em placas de Petri de 90 mm e, após solidificação, depositou-se discos de 5 mm de diâmetro da cultura pura do fungo (Coll-265) no centro dos respectivos meios: BDA + quitosana a 0,1 %; BDA + quitosana a 0,2 %; BDA + quitosana a 0,3 %; BDA + quitosana a 0,4 % e BDA puro (testemunha). Depois, as placas identificadas foram mantidas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h por 10 dias. Avaliou-se caracteres culturais da colônia, taxa de crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC). Para análise estatística, os dados de PIC em relação às concentrações de quitosana foram submetidos a ANOVA, teste F e regressão. Após avaliação *in vitro*, avaliou-se o efeito *in vivo* da quitosana para controle da antracnose em jiló inoculado ou não com *C. tamarilloi* a 2×10^5 conídios/mL. Os tratamentos utilizados foram: T1 – frutos não revestidos e não inoculados; T2 – frutos não revestidos e inoculados; T3 – frutos revestidos com quitosana a 0,1 % e inoculados; T4 – frutos revestidos com quitosana a 0,2 % e inoculados e T5 – frutos revestidos com quitosana a 0,3 % e inoculados. A inoculação foi por deposição de 15 µL do inóculo sobre ferimento através de furo utilizando agulha de metal de 1,25mm de diâmetro e o revestimento foi por imersão em dispersão de quitosana nas diferentes concentrações. Em seguida, os frutos foram acondicionados em bandejas de isopor, previamente identificadas e organizadas sobre bancada. Em cada bandeja foram colocados dois frutos compondo uma unidade experimental. Analisou-se perda de massa fresca, pesando-se os frutos no início e no final do experimento; incidência média da doença através da contagem de lesões por tratamento e severidade da doença, mensurando-se o diâmetro das lesões. O delineamento experimental tanto para *in vitro* como *in vivo* foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 repetições. Os experimentos foram repetidos uma vez, cada. Os valores de diâmetro da lesão foram utilizados para o cálculo da AACPD. Para análise estatística, os dados da AACPD foram submetidos a ANOVA, teste F e regressão. *In vitro*, a quitosana em todas as concentrações testadas controlou o crescimento micelial de *C. tamarilloi*. *In vivo*, o revestimento de quitosana na concentração de 0,2% (T4) reduziu a severidade da antracnose, mas não impediu sua incidência em jiló.

Palavras-chave: doença pós-colheita, fruto, hortaliça, *Solanum aethiopicum*.

QUITOSANA IN THE POST-HARVEST CONTROL OF SCARLET EGGPLANT ANTHRACROSIS

ABSTRACT

The objective of this work was to control the anthracnose of scarlet eggplant fruit (*Solanum aethiopicum* L.), caused by *C. tamarilloi*, through an edible chitosan-based coating. Initially, chitosan was tested at different concentrations to inhibit the development of the pathogen in Petri dishes. Chitosan, prepared by dissolving citric acid solvent in different concentrations, was mixed with BDA (potato-dextrose-agar) melted at 40° C. The mixtures were deposited in 90 mm Petri dishes and, after solidification, 5 mm diameter disks of the pure culture of the fungus (Coll-265) were deposited in the center of the respective media: BDA + 0.1% chitosan; BDA + 0.2% chitosan; BDA + chitosan at 0.3%; BDA + 0.4% chitosan and pure BDA (control). After the identification the plates were maintained in BOD at 25° C and photoperiod of 12 h for 10 days. Colony cultural characteristics, mycelial growth rate and percent inhibition of mycelial growth (MGI) were evaluated. For statistical analysis, MGI data on chitosan concentrations were submitted to ANOVA, F test and regression. After in vitro evaluation, the in vivo effect of chitosan was evaluated for anthracnose control in jiló inoculated or not with *C. tamarilloi* at 2×10^5 conidia / mL. The treatments used were: T1 - uncoated and uninoculated fruits; T2 - uncoated and inoculated fruit; T3 - fruits coated with 0.1% chitosan and inoculated; T4 - fruits coated with 0.2% chitosan and inoculated and T5 - fruits coated with chitosan at 0.3% and inoculated. The inoculation was by deposition of 15 µl of the inoculum on injury through hole using a metal needle of 1.25 mm in diameter and the coating was by immersion in chitosan dispersion at different concentrations. Afterwards, the fruits were packed in polystyrene trays, previously identified and organized on a bench. In each tray were placed two fruits composing an experimental unit. Fresh weight loss was analyzed by weighing the fruits at the beginning and at the end of the experiment; mean incidence of disease by counting lesions by treatment and disease severity, by measuring the diameter of the lesions. The experimental design for both in vitro and in vivo assays was completely randomized with 5 treatments and 5 replicates. The experiments were repeated once, each one. The diameter values of the lesion were used to calculate the AACPD. For statistical analysis, the AACPD data were submitted to ANOVA, F test and regression. *In vitro*, chitosan at all concentrations tested controlled the mycelial growth of *C. tamarilloi*. *In vivo*, the chitosan coating at 0.2% concentration (T4) reduced the severity of the anthracnose, but did not prevent its incidence in the fruits.

Key words: post-harvest disease, fruit, vegetable, *Solanum aethiopicum*.

1. INTRODUÇÃO

Várias doenças foram relatadas em jiló (*Solanum aethiopicum* L.) e a antracnose, causada por *Colletotrichum*, é a que causa maiores perdas econômicas na produção. Para minimizar essas perdas na produção, produtores recorrem a fungicidas registrados como única proposta de controle eficiente (Pavan *et al.*, 2016).

Em contrapartida, polímeros naturais biodegradáveis são alternativas para mitigar o impacto negativo ao ambiente causado por polímeros sintéticos não biodegradáveis e por agrotóxicos usados para proteção e controle de fitopatógenos em frutos de jiloeiro. Visto que o petróleo é a principal matéria prima para produção de polímeros sintéticos não biodegradáveis (Rios *et al.*, 2007; Sivan, 2011) que acondicionam e embalam os jilós vendidos em feiras e supermercados podendo, inclusive, demorar anos para se decomporem totalmente. Já o uso indiscriminado de fungicidas inorgânicos causa efeitos nocivos ao ambiente e a saúde humana como, a poluição de recursos hídricos e intoxicações, respectivamente (Peres *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2007; Peres & Moreira, 2007).

Dentre os biopolímeros naturais, os polissacarídeos, como o amido e a quitina, são os mais viáveis economicamente por serem encontrados muito facilmente na natureza.

Depois da celulose, a quitina é o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza (Pedro *et al.*, 2013) e não é tóxica ao ser humano (Aranaz *et al.*, 2009; Soliman *et al.*, 2015) podendo ser encontrada em ambientes marinhos e terrestres compondo o exoesqueleto de artrópodes e paredes celulares de fungos (Anusha *et al.*, 2016; Bierhalz *et al.*, 2016).

Do ponto de vista ecológico, a produção de quitina acarreta menos problemas do que a produção de celulose, uma vez que a produção deste último polímero requer tratamento com produtos químicos relativamente perigosos (Damian *et al.*, 2005).

Um grande problema que enfrenta o desenvolvimento de processamento e uso da quitina é a insolubilidade. No entanto, quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50% (dependendo da origem do polímero), torna-se solúvel em meio ácido aquoso e é chamado de quitosana (Rinaudo, 2006).

A quitosana, diferentemente da quitina, é solúvel na maioria dos ácidos orgânicos (Dutta *et al.*, 2004; Rinaudo, 2006; Pillai *et al.*, 2009) e está sendo muito estudada para elaboração de revestimento comestível em frutos pós-colheita para retardar o amadurecimento (Souza *et al.*, 2011; Galo *et al.*, 2014; Suseno *et al.*, 2014; Mariano-Nasser *et al.*, 2016), proteger contra a invasão de microrganismos patogênicos (Damian *et al.*, 2005; Goy *et al.*, 2009; Ramos-García

et al., 2012; Pilon *et al.*, 2013) e controlar fitopatógenos (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Romanazzi *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2015).

Desta forma, objetivou-se testar neste capítulo o revestimento à base de quitosana em jiló para controle da antracnose e aumento de sua vida útil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução do experimento

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e os experimentos *in vivo* foram realizados no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA). Ambos os laboratórios estão localizados no Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPH) da Embrapa Hortaliças, no Distrito Federal.

2.2. Obtenção de quitosana e de ácido cítrico

Quitosana de peso molecular médio com 75-85 % de quitina desacetilada (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e ácido cítrico P.A. (VETEC Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram fornecidos pelo Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CNPH/Embrapa Hortaliças.

2.3. Crescimento micelial de *Colletotrichum tamarilloi* em BDA com quitosana

2.3.1. Preparação de diferentes concentrações de quitosana

Dispersões nas concentrações de 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % e 0,4 % foram preparadas por dissolução de quitosana em 200 mL de solvente ácido cítrico a 2 %, sob agitação constante, durante 12 h. O ácido cítrico, na concentração de 2 %, foi preparado em água destilada. As misturas foram aquecidas a 40°C para acelerar o processo de homogeneização e atingir consistência de gel.

2.3.2. Preparação de quitosana com meio de cultura BDA em placa de Petri

Meio de cultivo sintético batata-dextrose-ágar (BDA) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante em solvente água destilada. Depois, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado a temperatura ambiente para posterior uso.

A fusão de 500 mL de meio BDA solidificado se fez por aquecimento em forno micro-ondas até 80°C por cinco minutos, sob agitação periódica, a cada um minuto. O meio foi resfriado em temperatura ambiente até atingir 40°C. Em seguida, 50 mL do meio foi transferido para um Becker de 200 mL esterilizado, contendo 50 mL de quitosana a 40°C de cada concentração. A mistura BDA-quitosana foi homogeneizada com um bastão de vidro esterilizado. Em seguida, 20 mL da mistura foi depositada em placas de Petri descartáveis de 90 mm de diâmetro. Repetiu-se o mesmo procedimento para todas as concentrações de quitosana em estudo.

Os meios e as concentrações para avaliação da inibição do crescimento do isolado Coll-265 de *C. tamarilloi* foram: batata-dextrose-ágar (BDA), batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,1 % (BDAQ1), batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,2 % (BDAQ2), batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,3 % (BDAQ3), batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,4 % (BDAQ4). O tratamento somente com BDA serviu como testemunha.

2.3.3. Deposição de *Colletotrichum tamarilloi* em placa de Petri contendo quitosana

Da margem da colônia de cultura pura do fungo, isolado Coll-265, crescida em meio BDA por seis dias a 25°C, foram feitos discos de 5 mm de diâmetro usando-se perfurador de diâmetro equivalente. Os discos foram retirados com uma agulha histológica e transferidos para o centro da placa de Petri contendo 20 mL dos respectivos meios a serem testados. Em seguida, as placas já identificadas com as concentrações de quitosana foram armazenadas a 25°C e fotoperíodo de 12 h por 10 dias em incubadora tipo BOD.

O experimento foi realizado duas vezes em períodos distintos sob as mesmas condições.

2.3.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso nos dois ensaios com cinco tratamentos e cinco repetições. A unidade experimental foi uma placa de Petri com meio de cultivo perfazendo um total de 25 placas por experimento.

2.3.5. Avaliação

As avaliações visuais dos caracteres culturais da colônia foram iniciadas após 48 horas da implantação do experimento, seguindo com as observações e medições a cada 48h, até completar 10 dias de experimento.

Para análise de crescimento micelial, fez-se duas medições em sentidos diametralmente opostos com paquímetro na face inferior da placa, subtraindo-se o diâmetro do disco de BDA com micélio inicial depositada no centro, calculando-se uma média ao final de cada leitura.

A taxa de crescimento micelial (Tx) e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foram calculadas por meio das seguintes fórmulas usando a média das cinco repetições por tratamento:

$$Tx = \left(\frac{\text{diâmetro final da colônia}}{\text{número de dias de incubação}} \right) \times 100$$

$$PIC = \left[\frac{\text{diâmetro testemunha (BDA)} - \text{diâmetro tratamento (BDAQ}_x)}{\text{diâmetro testemunha (BDA)}} \right] \times 100$$

2.3.6. Análise estatística

Os dados de PIC em relação às concentrações de quitosana de cada experimento foram submetidos à análise de variância. Após a análise dos dois experimentos, verificou-se pelo teste F Máximo, que ambos os experimentos tinham o Quadrado Médio do Erro homogêneo, sendo, portanto, comparáveis. Desdobrou-se a interação experimento*tratamento, por tratamento, para avaliar (pelo teste F) se o tratamento tem o mesmo comportamento dentro de cada experimento. Os dados de PIC também foram submetidas à análise de regressão. As análises estatísticas foram feitas com software SAS 9.4 (2013).

2.4. Controle pós-colheita da antracnose do jiló com revestimento de quitosana

2.4.1. Obtenção, seleção e assepsia de frutos para revestimento

Jilós da cultivar Tinguá, ecótipo Gilo e tipo Verde-claro comprido, de um mesmo lote, provenientes de Jardim Azul, Valparaíso de Goiás – GO, foram adquiridos na Feira do Produtor Rural e Atacadista de Ceilândia do Distrito Federal por intermédio do próprio produtor. Os frutos foram transportados para o Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CNPH (Embrapa Hortaliças), Brasília-DF, para serem selecionados e higienizados.

A seleção dos frutos foi feita por três etapas: na primeira foram selecionados aqueles sem sintomas de doenças e sem qualquer dano mecânico aparente; na segunda etapa, selecionou por tamanho uniforme e por último pelo estágio de maturação a depender da cor do exocarpo (casca). Na segunda etapa, mensurou-se a altura, medindo-se da base até o ápice do fruto, e o diâmetro com paquímetro digital, selecionando-se aqueles de tamanhos próximos.

Para a assepsia, os frutos foram submetidos à lavagem com detergente Bioverospol, imersão em sanitizante hortifrutícola Mikro Chlor (ECOLAB Química Ltda, Barueri, SP, Brasil) a 0,1 % por 10 minutos, seguida de enxague em água destilada e secagem ao ar livre sobre papel toalha.

2.4.2. Preparação de diferentes concentrações de quitosana para revestimento em jiló

Dispersões nas concentrações de 0,1 %, 0,2 % e 0,3 % foram preparadas respectivamente por dissolução de 1,0 g, 2,0 g e 3,0 g de quitosana em um litro de solvente ácido cítrico a 2 % sob agitação constante durante 12 h. Para as respectivas concentrações o pH foi de 3,4; 3,9 e 4,2. O ácido cítrico na concentração de 2 % foi preparado em água destilada. As misturas foram aquecidas a 40°C para acelerar o processo de homogeneização e atingir consistência de gel. As concentrações de quitosana testadas foram selecionadas de acordo com o experimento *in vitro*.

2.4.3. Preparação de inóculo

O isolado do fungo *C. tamarilloi*, codificado como Coll-265, foi cultivado em placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). Aos oito dias de cultivo, colocou-se 20 mL de água destilada esterilizada na placa e, com uma alça de Drigalski de vidro esterilizada, espalhou-se a água por toda a colônia para desprender as estruturas do fungo. Após, a suspensão foi filtrada em gaze dobrada em quatro vezes para obter somente conídios.

A contagem de esporos foi feita em hemacitômetro e a concentração ajustada para $2,0 \times 10^5$ conídios/mL.

2.4.4. Inoculação

Para inoculação dos jilós foi utilizado o método 1 de inoculação (M1) descrito no capítulo 2 (ferimento com agulha de 1,25 mm de diâmetro + deposição de 15 µL do inóculo). A profundidade dos ferimentos foi de 4 mm atingindo a parte superior do mesocarpo e o inóculo foi depositado com uma micropipeta automática. Todos os utensílios resistentes ao calor foram

esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e os não resistentes foram desinfetados com álcool a 70%.

2.4.5. Revestimento de jilós com gel de quitosana

A bancada da sala de análise física de produtos vegetais do LCTA e todos os materiais que entraram em contato com os frutos durante o processo de revestimento foram previamente lavados e higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 200 mg L⁻¹.

A temperatura e a umidade da sala foram medidas por aparelho termo-higrômetro digital TFA.

Os frutos foram submetidos aos seguintes tratamentos (T):

T1 – não revestidos e não inoculados (testemunha 1);

T2 – não revestidos e inoculados (testemunha 2);

T3 – revestidos com quitosana a 0,1 % e inoculados;

T4 – revestidos com quitosana a 0,2 % e inoculados e

T5 – revestidos com quitosana a 0,3 % e inoculados.

Os tratamentos T3, T4 e T5 só foram revestidos 48 h após a inoculação para dar condição ao fungo de penetrar e desenvolver.

Os géis para revestimentos só foram aplicados nos frutos após serem resfriados em temperatura ambiente.

A aplicação dos géis para revestimento em frutos se deu por imersão. Os frutos foram imersos nas formulações de quitosana por um minuto, seguido de escoamento do excesso sobre tela de metal e cura (polimerização) das coberturas por evaporação espontânea em temperatura ambiente.

Após a cura, os frutos revestidos foram acondicionados em bandejas de isopor, previamente identificadas e organizadas sobre a bancada, de acordo com o croqui para facilitar nas avaliações. Em cada bandeja foram colocados dois frutos compondo uma unidade experimental.

O experimento foi realizado duas vezes em períodos distintos sob as mesmas condições.

2.4.6. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso para os dois experimentos. Foram cinco tratamentos com cinco repetições para cada ensaio e dois frutos compondo uma unidade experimental por repetição.

2.4.7. Avaliação

Foram analisadas perda de massa fresca, incidência média da doença e severidade da doença.

Para perda de massa fresca, os frutos foram pesados em balança digital de precisão no início e no final do experimento. A porcentagem de perda de massa foi obtida pela equação $PM = [(P_i - P_f) / P_i] \times 100$, onde: PM é a perda de massa (%); P_i é o peso inicial do fruto (g); e P_f é o peso do fruto no final do experimento (g).

As avaliações foram feitas em dias alternados (dia sim dia não) com exceção para análise de perda de massa fresca. As análises de incidência média e severidade da doença foram iniciadas após o aparecimento dos primeiros sintomas nos frutos.

A incidência média da doença foi calculada em porcentagem pela contagem de lesões por tratamento e para a severidade da doença foi mensurado o diâmetro da lesão, obtendo-se a média de duas medidas perpendiculares com paquímetro digital.

2.4.8. Análise estatística

Os valores de severidade da doença de cada tratamento foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Campbell & Madden, 1990). Os dados de AACPD de cada experimento foram transformados para $(x+0,5)^{1/2}$ satisfazendo os pressupostos da análise de variância, em seguida submetidos à análise de variância. Após a análise dos dois experimentos verificou-se pelo teste F Máximo que ambos experimentos tinham o Quadrado Médio do Erro homogêneo, sendo, portanto, comparáveis. Desdobrou-se a interação experimento*tratamento, por tratamento, para avaliar (pelo teste F) se o tratamento tem o mesmo comportamento dentro de cada experimento. Os dados de AACPD também foram submetidas para análise de regressão. As análises foram feitas com software SAS 9.4 (2013).

3. RESULTADOS

3.1. Crescimento micelial de *Colletotrichum tamarilloi* com quitosana

Em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA), a taxa de crescimento micelial (Tx) de *C. tamarilloi* (Coll-265), que serviu como testemunha, foi de aproximadamente 67,5 % ao final dos dois experimentos que foi de 10 dias à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h em incubadora tipo BOD. Em oito dias de experimentação a Tx = 54 % (aproximadamente), que foi o utilizado para preparo de inóculo em todos os experimentos dos dois capítulos.

O crescimento micelial foi circular, aéreo e com aspecto cotonoso. Foram observados anéis concêntricos de cor cinza. A coloração da colônia se iniciou branca, tornando-se cinza no decorrer do tempo. A massa conidial se concentrou no centro da placa onde se depositou o inóculo e, quando abundante, apresentou coloração laranja (Figura 9). No reverso da placa, a coloração foi a mesma com uma intensidade maior variando de branco a cinza-escuro até ficar preto com o passar do tempo.

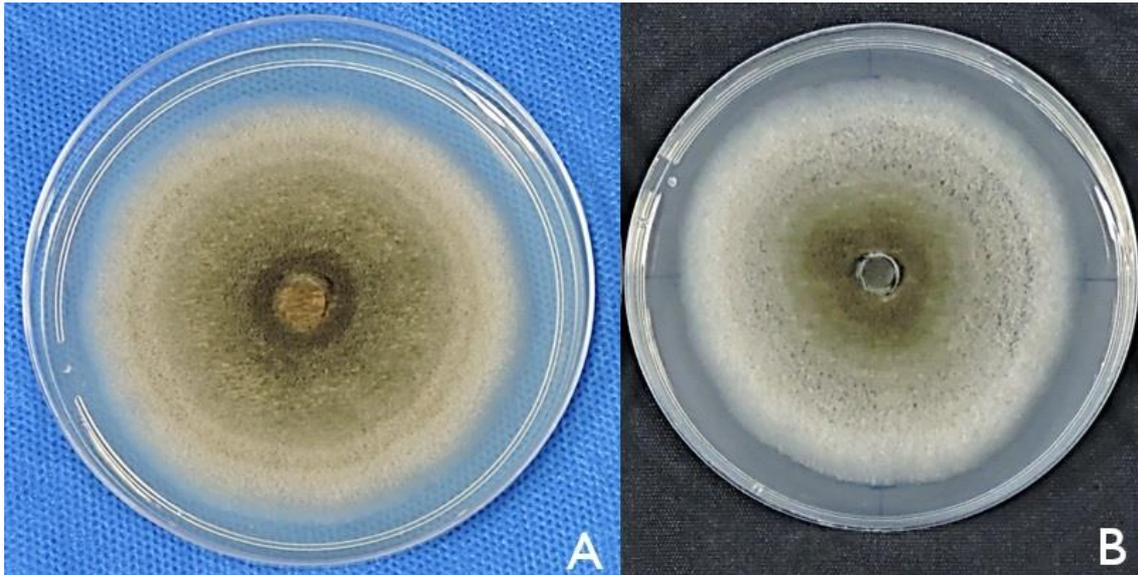


Figura 9 - *Colletotrichum tamarilloi* (Coll-265) com 10 dias de cultivo em placa de Petri com apenas batata-dextrose-ágar (BDA): A) experimento 1 e B) experimento 2.

Quanto aos meios de BDA com quitosana, em todas as concentrações testadas, não foi possível observar características culturais da colônia devido ao seu pouco desenvolvimento. É importante ressaltar que no experimento 1, conforme apresentado pela Figura 10, a massa conidial de coloração laranja centrada na placa nos meios com quitosana, especificamente em BDAQ2 e BDAQ4, pertence ao disco de 0,5 cm da colônia do fungo crescida em BDA puro depositado para avaliação.

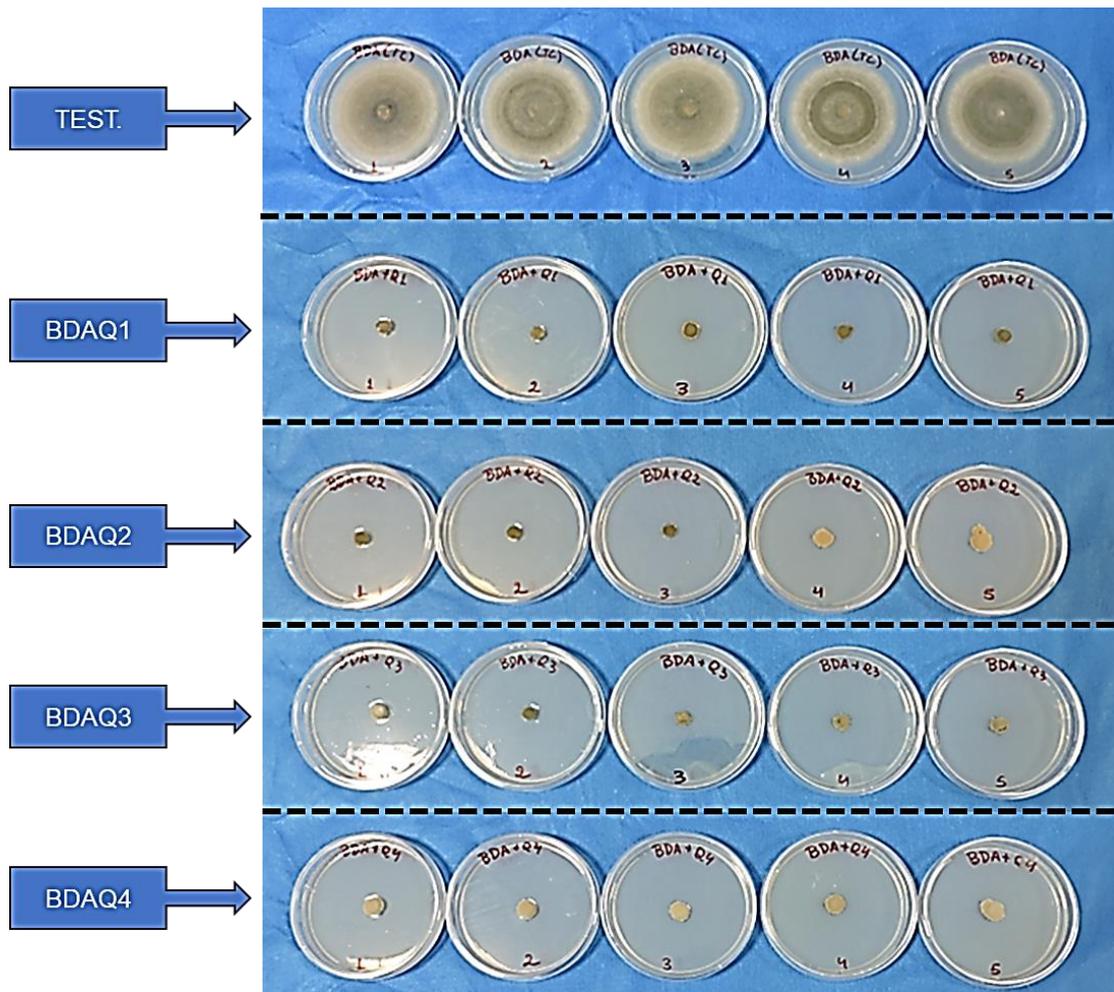


Figura 10 - Placas de Petri com *Colletotrichum tamarilloi* (Coll-265) cultivado por 10 dias em meios BDA = batata-dextrose-ágar (controle); BDAQ1 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,1 %; BDAQ2 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,2 %; BDAQ3 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,3 % e BDAQ4 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,4 % para teste de controle do experimento 1.

As concentrações de quitosana a 0,1 %, 0,2 % e 0,3 % foram as que apresentaram maior porcentagem de inibição do crescimento micelial do *C. tamarilloi* (Coll-265) com valores acima de 90 % nos dois experimentos (Tabela 4). Nota-se que nas Figuras 10 e 11, a colônia do isolado Coll-265, aos 10 dias de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 h, quase não cresceu para essas concentrações apresentando taxas de crescimento abaixo de 10 % nos dois experimentos.

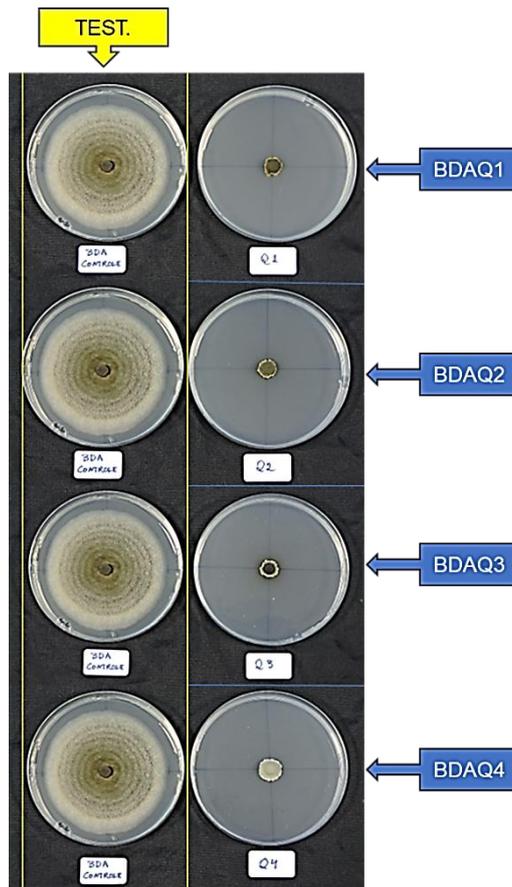


Figura 11 - Placas, representando cada tratamento testado pela segunda vez (experimento 2), com *Colletotrichum tamarilloi* (Coll-265) cultivado em meios com diferentes concentrações de quitosana (BDAQ1 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,1 %; BDAQ2 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,2 %; BDAQ3 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,3 % e BDAQ4 = batata-dextrose-ágar-quitosana a 0,4 %) dispostas ao lado da testemunha (BDA = batata-dextrose-ágar) para comparação de seu desenvolvimento micelial.

Na análise conjunta, avaliando-se o comportamento de cada concentração nos dois experimentos, apenas a concentração a 0,3 % de quitosana (BDAQ3) apresentou o mesmo comportamento nos dois experimentos, ou seja, houve variação de comportamento das outras concentrações de quitosana para inibição do desenvolvimento do patógeno em ambos os experimentos *in vitro* como apresentado na Tabela 5.

Em análise separada não houve aumento linear da PIC com o aumento da concentração de quitosana, sendo que o tratamento com a maior concentração de quitosana (BDAQ4) apresentou a PIC mais baixa tanto no experimento 1 (87,24 %) quanto no experimento 2 (89,22 %) (Tabela 5).

No experimento 1 pela análise de regressão, os modelos linear e quadrático não se ajustaram aos dados, uma vez que, a qualidade do ajuste dado pelo R^2 , de ambos os modelos, foi baixa (linear: $R^2=0,13$ e quadrático: $R^2=0,35$). Já no experimento 2, ajustou-se o modelo quadrático dado pela equação 1) $y = 90,27 + 35,34 \text{ dose} - 94,16 \text{ dose}^2$, com a qualidade do

ajuste dada por $R^2=0,63$. Portanto, analisando-se somente a regressão quadrática do segundo experimento, a PIC teve um máximo estimado pela equação 1 de 93,59 % na concentração de 0,19 % de quitosana (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) do *Colletotrichum tamarilloi* (Coll-265) sob efeito de diferentes concentrações de quitosana *in vitro* com análise separada (regressão) do experimento 2 e conjunta (teste F) dos dois experimentos realizados com os mesmos tratamentos nas mesmas condições.

Tratamentos	PIC (%)				Teste F (Pr > f)
	Exp. 1	Exp. 2		D ^c	
		VER ^a	MP ^b		
BDAQ1**	90,65	92,86	92,98	- 0,12	0,02 s*
0,19 % ***	-	93,59	-	-	-
BDAQ2	91,10	93,57	93,21	0,36	0,04 s
BDAQ3	91,69	91,4	92,76	- 1,36	0,27 ns
BDAQ4	87,24	89,34	89,22	0,12	0,05 s
				$R^2 = 0,63$	CV = 1,63

* Nível de significância dos experimentos para cada concentração (análise conjunta) pelo teste F, em que s = significativo e ns = não significativo. **BDAQ1 = batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,1 %; BDAQ2 = batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,2 %; BDAQ3 = batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,3 % e BDAQ4 = batata-dextrose-ágar com quitosana a 0,4 %. *** Concentração de quitosana estimada pela análise de regressão quadrática do experimento 2. Análise de regressão: a) VER = Valor Estimado pela Regressão; b) MP = Média dos pontos (dados reais) e c) D = diferença entre VER e MP.

3.2. Controle pós-colheita da antracnose do jiló com revestimento de quitosana

A temperatura e umidade relativa dentro da sala de análise física de produtos vegetais do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA) variaram entre 23,5°C a 24,9°C e 56,4 % a 69,3 % respectivamente durante os 12 dias do experimento 1. Durante o experimento 2, a temperatura variou entre 23,1°C a 24,5°C, enquanto que a umidade ficou entre 53,8 % e 70 % (Anexo 2).

Para todos os tratamentos, a perda de massa fresca dos frutos, tanto no experimento 1 quanto no experimento 2, foi em torno de 30 %, não tendo diferença entre os tratamentos com frutos revestidos e não revestidos com quitosana.

A incidência da doença foi de 100 % na última avaliação em todos os tratamentos inoculados dos experimentos 1 e 2 como observado na Figura 12. Em ambos os experimentos

o tratamento T1 (frutos não inoculados e nem revestidos com quitosana) não apresentou lesão (Tabela 5 e Figura 12).



Figura 12 – Jilós inoculados com *Colletotrichum tamarilloi* (Coll-265) e revestidos com quitosana em diferentes concentrações ao final de cada experimento. T1 = frutos não revestidos e não inoculados; T2 = frutos não revestidos e inoculados; T3 = frutos revestidos com quitosana a 0,1 % e inoculados; T4 = frutos revestidos com quitosana a 0,2 % e inoculados e T5 = frutos revestidos com quitosana a 0,3 % e inoculados.

Todos os tratamentos apresentaram os mesmos comportamentos pela análise conjunta para os dois experimentos dada pelo teste F (Tabela 6).

Analisando-se separadamente, no experimento 1 pela análise de regressão, o R^2 foi significativo com $R^2 = 0,66$ e o modelo quadrático se ajustou aos dados com a equação 2) $y = 234,97 - 2099,62 \text{ dose} + 5050,94 \text{ dose}^2$. Portanto, analisando-se a regressão quadrática do primeiro experimento, a AACPD teve um mínimo estimado pela equação 2 de 16,77 % na concentração de 0,21 % de quitosana (Tabela 6).

No experimento 2 pela análise de regressão, os modelos linear e quadrático não se ajustaram aos dados, uma vez que, a qualidade do ajuste dado pelo R^2 , de ambos os modelos, foi baixa (linear: $R^2 = 0,03$ e quadrático: $R^2 = 0,17$).

Não houve redução linear da AACPD com o aumento da concentração de quitosana, sendo que jilós revestidos com quitosana na concentração de 0,2 % (T4) apresentaram a menor AACPD nos dois experimentos conforme exposto na Tabela 6.

Tabela 6 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) causada por *Colletotrichum tamarilloi* (Coll-265) em jiló, revestido ou não com quitosana em diferentes concentrações, com análise separada (regressão) do experimento 1 e conjunta (teste F) dos dois experimentos realizados na mesma condição.

Tratamentos	AACPD (%)			Teste F (Pr > f)	
	Exp. 1		Exp. 2		
	VER ^a	MP ^b	D ^c		
T1**	-	0,00	-	0,00	1,0000 ns*
T2	-	57,48	-	69,56	0,4434 ns
T3 (0,1)	75,52	74,90	0,62	73,46	0,9352 ns
T4 (0,2)	17,8	17,08	0,72	50,62	0,0618 ns
0,21 %***	-	16,77	-	-	-
T5 (0,3)	59,67	58,26	1,41	63,34	0,7331 ns
$R^2 = 0,66$				$CV = 21,83$	

* Nível de significância dos experimentos para cada tratamento (análise conjunta) pelo teste F, em que s = significativo e ns = não significativo. **T1 = frutos não revestidos e não inoculados; T2 = frutos não revestidos e inoculados; T3 = frutos revestidos com quitosana a 0,1 % e inoculados; T4 = frutos revestidos com quitosana a 0,2 % e inoculados e T5 = frutos revestidos com quitosana a 0,3 % e inoculados. ***Concentração de quitosana estimada pela análise de regressão quadrática do experimento 1. Análise de regressão: a) VER = Valor Estimado pela Regressão; b) MP = Média dos pontos (dados reais) e c) D = diferença entre VER e MP.

4. DISCUSSÃO

O posterior decréscimo, após um pico de máxima porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. tamarilloi* em relação às concentrações de quitosana, demonstrou que o aumento da concentração deste polímero não resulta em um aumento do efeito fungistático. O mesmo foi observado em Mendes *et al.* (2016) onde concentrações mais baixas de quitosana foram mais eficazes para inibição do crescimento de *Penicillium expansum* em condição *in vitro*, porém, somente em meio líquido. Quando em meio sólido, Mendes *et al.* (2016) observaram que a quitosana não possuía o mesmo desempenho. Em contrapartida, Botelho *et al.* (2010) e Freddo *et al.* (2014) observaram redução linear do crescimento micelial em meio sólido com o aumento da concentração de quitosana para *Penicillium sp.* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente. Denota-se, com isso, que a depender da composição do meio de cultivo e da espécie fúngica, o efeito da quitosana pode variar.

Quanto ao solvente utilizado para dissolução da quitosana, Cia *et al.* (2010) observaram que apenas na presença do ácido cítrico tanto a 0,5 % como a 1 % incorporado ao meio BDA,

o fungo *Rhizopus stolonifer* se desenvolveu, embora pouco e lentamente, o que não aconteceu em meio com quitosana nas mesmas concentrações que, nesse caso, inibiu por total o desenvolvimento de *R. stolonifer*. Outros ácidos orgânicos usados para dissolução da quitosana também são avaliados como agente antifúngico. Hassan *et al.* (2015), por exemplo, testaram oito solventes orgânicos, dentre eles o ácido cítrico, sobre quatro espécies de fungos (*Aspergillus flavus*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus nigricans* e *Fusarium oxysporum*) e notaram que todos possuem efeito antifúngico, porém nenhum apresentou 100 % de inibição do crescimento micelial para alguma das espécies usadas. Em estudo com ácido acético para inibição de crescimento de *Colletotrichum* spp. Kang *et al.* (2003) explicaram que a diminuição do pH do meio causada por esse ácido orgânico, também utilizado para dissolução de quitosana, influencia no desenvolvimento micelial acidificando a célula fazendo com que consuma grande quantidade de sua energia para manter a homeostase do pH intracelular resultando em crescimento mais lento. Portanto, o efeito inibitório da quitosana no crescimento micelial *in vitro* aqui testado não se deve somente à presença do ácido orgânico em sua formulação indicando que existe uma ação sinérgica entre os dois.

Contudo, deve-se levar em consideração que a atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada por diversos outros fatores, como peso molecular (Jing *et al.*, 2007; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008), grau de acetilação (Andres *et al.*, 2007), pH do meio (Felipini & Di Piero, 2009; Alburquenque *et al.*, 2010) e temperatura em que as interações ocorrem (El-Hefian *et al.*, 2010; Szymańska & Winnicka, 2015).

Segundo Neres *et al.* (2004), a temperatura de 13°C proporciona melhor condição de armazenamento para jiló após a colheita tornando o ambiente desfavorável para o desenvolvimento de patógenos quiescentes, portanto, é importante destacar que a temperatura da sala não influenciou na conservação dos frutos, não ocorrendo interação sinérgica com os dois tipos de controle (alternativo e físico). Vale lembrar que, devido ao elevado custo com consumo de energia elétrica, esse tipo de armazenamento e controle físico de doenças de plantas se torna negligenciado.

Para isso a quitosana vem sendo estudada em grande escala como tecnologia alternativa de baixo custo para conservar órgãos vegetais após a colheita. A atividade antimicrobiana da quitosana tem sido eficiente no controle de doenças de plantas em vários patossistemas como mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em uva (Camili *et al.*, 2007), antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em feijoeiro (Di Piero & Garda, 2008), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em manga (Zhu *et al.*, 2008), podridão-amarga (*Colletotrichum acutatum*) em maçã (Felipini & Di Piero, 2009), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (Ali

et al., 2010), podridão parda (*Monilinia fructicola*) em pêsego (Yang *et al.*, 2012) e mofo azul (*Penicillium expansum*) em maçã (Darolt *et al.*, 2016).

Embora formulações hidrofílicas como a quitosana sejam também indicadas para preservar o aspecto hidratado, mantendo por mais tempo a superfície brilhante do fruto (Assis & Brito, 2014), o revestimento formado pela quitosana sobre a superfície do jiló não reduziu a transferência de umidade (transpiração) apresentando perda de massa fresca na mesma quantidade que frutos não revestidos e alterando a aparência.

O revestimento de quitosana a 0,3 % não reduziu a severidade da doença tanto quanto ou mais do que o revestimento a 0,2 % talvez por reter mais água durante o processo de gelatinização formando um gel mais consistente. Oliveira *et al.* 2016, através de microscópio eletrônico de varredura, observaram que a cobertura de amido de mandioca, usada no controle da antracnose do mamão, nas concentrações mais elevadas testadas, quando em contato com o fruto se tornou muito rígida provocando fissuras. Possivelmente, o mesmo deve ter ocorrido para a cobertura de quitosana a 0,3 % devido a volatilização do ácido cítrico e a perda de umidade.

Já a dissolução de quitosana a 0,1 % quando aquecida forma um gel fraco e em contato com o jiló se desprendia. Esse desprendimento do gel de quitosana a 0,1 %, provavelmente, permitiu com que a doença se desenvolvesse e progredisse sem problema, o que resultou em maior AACPD.

Quanto ao solvente, para controle *in vivo* não é algo que deva ser levado em consideração para potencializar o efeito antimicrobiano da quitosana, uma vez que, para a quitosana ser usada como cobertura protetora em frutos é preciso que ocorra a volatilização do solvente e o revestimento formado pela quitosana tende a se estabilizar no estado sólido aumentando, com isso, o pH (Mendes *et al.*, 2016). Segundo Assis & Leoni (2003) a atividade antifúngica da quitosana é frequentemente influenciada pelo pH local, ou seja, do pH do produto revestido.

É importante sim considerar que o efeito fungicida ou fungistático da quitosana dependerá da espécie de fungo que se deseja controlar (Camili *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2014) e da época de sua aplicação podendo, inclusive, atuar na regulação da imunidade da planta. Na pré-colheita, a quitosana pode ativar várias respostas de defesa induzindo e/ou inibindo diferentes atividades bioquímicas durante a interação planta-patógeno (Bautista-Baños *et al.*, 2006). A oligoquitosana, solúvel em água, produzida a partir da hidrólise da quitosana é uma outra alternativa eficaz que provoca imunidade inata da planta contra várias doenças atuando como vacina (Yin *et al.*, 2010).

Quando associada a outros produtos alternativos usados para mesmo propósito, a atividade antimicrobiana e efeito protetor da quitosana podem ser intensificados como ocorreram em Malmiri *et al.* (2011) mistura quitosana/glicerol; em Campos *et al.* (2011) mistura quitosana/amido de mandioca; Barrera *et al.* (2015) mistura quitosana/própolis; Jovanovic *et al.* (2016) mistura quitosana/gelatina/óleo essencial de tomilho; Oliveira *et al.* (2017) mistura quitosana/óleo essencial de *Mentha piperita* e Khalifa *et al.* (2017) associa quitosana/extrato de folha de oliveira. Essas recomendações indicam que o uso da quitosana como fungicida ou como barreira protetora em consórcio a outros produtos pode auxiliar em uma agricultura sustentável, embora, os mecanismos responsáveis pela atividade antifúngica da quitosana e de seus derivados ainda precisam ser melhor elucidados.

É importante entender que não há uma cobertura aplicável a todos os frutos e nem um único modo de aplicação. A escolha do material usado como revestimento dependerá de vários fatores e da relação entre eles que também precisam ser estudados e testados.

5. CONCLUSÕES

- *In vitro*, a quitosana nas concentrações 0,1 %; 0,2 %; 0,3 % e 0,4 % inibiu o crescimento micelial de *C. tamarilloi*.
- *In vivo*, o revestimento à base de quitosana na concentração de 0,2 % (T4) reduziu a severidade da antracnose em jiló pós-colheita, mas não impediu sua incidência.

6. LITERATURA CITADA

ALBURQUENQUE, C.; BUCAREY, S.A.; NEIRA-CARRILLO, A.; URZÚA, B.; HERMOSILLA, G. & TAPIA, C.V. 2010. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Medical Mycology* December 48:1018-1023.

ALI, Q.; MUHAMMAD, M.T.M.; SIJAM, K. & SIDDIQUI, Y. 2010. Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. *International Journal of Food Science and Technology* 45:2134-2140.

ANDRES, Y.; GIRAUD, L.; GERENTE, C. & LE CLOIREC, P. 2007. Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action. *Environmental Technology* 28:1357-1363.

ANUSHA, J.R.; FLEMING, A.T.; ARASU, M.V.; KIM, B.C.; AL-DHABI, N.A.; YU, K.H. & RAJ, C.J. 2016. Mechanochemical synthesis of chitosan submicron particles from the gladius of *Todarodes pacificus*. *Journal of Advanced Research* 7:863-871.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G. & HERAS, A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology* 3: 203-230.

ARAÚJO, A.J.; LIMA, J.S.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; SOARES, M.O.; MONTEIRO, M.C.M.; AMARAL, A.M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C. A.N.; NEVES, C. & MARKOWITZ, S. 2007. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. *Ciência e Saúde Coletiva* 12:115-130.

ASSIS, O.B.G. & BRITTO, D. 2014. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. *Brazilian Journal of Food Technology* 17: 87-97.

ASSIS, O.B.G. & LEONI, A.M. 2003. Filmes Comestíveis de Quitosana. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 30:33-38.

BARRERA, E.; GIL, J.; RESTREPO, A.; MOSQUERA, K.; DURANGO, D. 2015. A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiiiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 68: 7667-7678.

BAUTISTA-BANÓS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; LÓPEZ, M.H.; AIT BARKA, E.; MOLINA, E.B & WILSON, C.L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25: 108-118.

BIERHALZ, A.C.K.; WESTIN, C.B & MORAES, A.M. 2016. Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom na from shrimp. *International Journal of Biological Macromolecules* 91:496-504.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; RICKLI, E.H.; LEITE, C.D & FARIA, C.M.D.R. 2010. Quitosana no controle de *Penicillium* sp na pós-colheita de maçãs. *Revista Brasileira de Agroecologia* 5:200-206.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F & CIA, P. 2007. Evaluation of chitosan on postharvest protection of 'Itália' grapes against *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica* 33: 215-221.

CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L. .1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York.

CAMPOS, R.P.; KWIATKOWSKI, A. & CLEMENTE, E. 2011. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. *Revista Ceres* 58:554-560.

CHEUNG, R.C.F.; NG, T.B.; WONG, J.H. & CHAN, W.Y. 2015. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Drugs* 13:5156-5186.

CIA, P.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F. & OLIVEIRA, E.G. 2010. Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui 'Rama forte'. *Bragantia* 69: 745-752.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. 2005. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentos e Nutrição* 16:195-205.

DAROLT, J.C.; ROCHA NETO, A.C. & PIERO, R.M. 2016. Effects of the protective, curative, and eradivative applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. *Brazilian Journal of Microbiology* 47:1014-1019.

DI PIERO, R.M. & GARDA, M.V. 2008. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:1121-1128.

DUTTA, P.K.; DUTTA, J. & TRIPATHI, V.S. 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research* 63:20-31.

EL-HEFIAN, E.A.; ELGANNOUDI, E.S.; MAINAL, A. & YAHAYA, A.H. 2010. Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry* 34:47-56.

FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G. & FACCHINI, L.A. 2007. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência e Saúde Coletiva* 12:25-38.

FELIPINI, R.B. & DI PIERO, R.M. 2009. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:1591-1597.

FREDDO, A.R.; MAZARO, S.M.; BRUN, E.J. & WAGNER JÚNIOR, A. 2014. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Ciência Rural* 44:1-4.

GALO, J.Q.B.; SOUZA, M.L.; KUSDRA, J.F. & MATTIUZ, C.F.M. 2014. Conservação pós-colheita de mamão 'Sunrise solo' com uso de quitosana. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36:305-312.

GOY, R.C.; BRITTO, D. & ASSIS, O.B.G. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 19:241-247.

HASSAN, R.; EL-KADI, S. & SAND, M. 2015. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. *International Journal of Advances in Biology* 2:1-11.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; BELLO-PÉREZ, L.A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers* 73: 541-547.

JING, Y.J.; HAO, Y.J.; QU, H.; SHAN, Y.; LI, D.S. & DU, R.Q. 2007. Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. *Acta Biologica Hungarica* 58:75-86.

- JOVANOVIC, G.D.; KLAUS, A. & S. NIKSIC, M.P. 2016. Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish. *Revista Argentina de Microbiología* 48:128-136.
- KANG, H.C.; PARK, Y.H. & GO, S.J. 2003. Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiological Research* 158:321-326.
- KHALIFA, I.; BARAKAT, H.; EL-MANSY, H.A. & SOLIMAN, S.A. 2017. Preserving apple (*Malus domestica* var. Anna) fruit bioactive substances using olive wastes extract-chitosan film coating. *Information Processing in Agriculture* 4:90-99.
- MAIA, A.J.; LEITE, C.D.; BOTELHO, R.V.; FARIA, C.M.D.R. & UBER, S.C. 2010. Efeitos da quitosana no desenvolvimento *in vitro* de videiras cv. Merlot e no crescimento micelial do fungo *Elsinoe ampelina*. *Ciência e Agrotecnologia* 34:1425-1430.
- MALMIRI, H.J.; OSMAN, A.; TAN, C.P. & ABDUL, R. 2011. Development of an edible coating based on chitosan-glycerol to delay 'Berangan' banana (*Musa sapientum* cv. Berangan) ripening process. *International Food Research Journal* 18:989-997.
- MARIANO-NASSER, F.A.C.; BOLIANI, A.C.; NASSER, M.D.; PAGLIARINI, M.K. & MENDONÇA, V.Z. 2016. Conservação de mangabas submetidas à aplicação de quitosana. *Científica* 44:279-285.
- MENDES, L.D.; BRESOLIN, J.D.; ASSIS, O.B.G & BRITTO, D. 2016. Avaliação *in vitro* da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *Penicillium expansum*. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering* 10:116-128.
- NERES, C.R.L.; VIEIRA, G.; DINIZ, E.R.; MOTA, W & PUIATTI, M. 2004. Conservação do jiló em função da temperatura de armazenamento e do filme de polietileno de baixa densidade. *Bragantia* 63:431-438.
- OLIVEIRA, B.F.; CRUZ, A.F.; ALVES, E. 2016. Cassava starch coatings for postharvest control of papaya anthracnose. *Phytopathologia Mediterranea* 55: 276–284.
- OLIVEIRA, K.A.R.; BERGER, L.R.R.; ARAÚJO, S.R.; CAMARA, 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* 66:96-103.
- PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; MOURA, M.F. & KUROZAWA, C. 2016. Doenças das solanáceas. *In: Amarin, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de fitopatologia. 5ª ed. Editora Agronômica Ceres Ltda. Ouro fino. p.677-686.*
- PEDRO, R.O.; TAKAKI, M.; CARAYEB, T.C.C.; BIANCHI, V.L; THOMEIO, J.C.; TIERA, M.J. & TIERA, V.A.O. 2013. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research* 168:50-55.
- PERES, F. & MOREIRA, J.C. 2007. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um polo agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 4:612-621.

PERES, F.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; DELLA-ROSA, H.V.; LUCCA, S.R. 2005. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva* 10:27-37.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W. & SHARMA, C.P. 2009. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34:641-678.

PILON, L.; SPRICIGO, P.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G.; CALBO, A.G.; FERRAUDO, A.S & FERREIRA, M.D. 2013. Effects of antibrowning solution and chitosan-based edible coating on the quality of fresh-cut apple. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation* 3:151-164.

QIU, M.; WU, C.; REN, G.; LIANG, X.; WANG, X & HUANG, J. 2014. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. *Food Chemistry* 155:105-111.

RAMOS-GARCÍA, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; HERNÁNDEZ-ROMANO, J.; ZAVALA-PADILLA, G.; TERRÉS-ROJAS, E.; ALIA-TEJACAL, I.; BARRERA-NECHA, L.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. & BAUTISTA-BAÑOS, S. 2012. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomatoes. *Crop Protection* 38:1-62.

RINAUDO, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31:603–632.

RIOS, L.M.; MOORE, C. & JONES, P.R. 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin* 54:1230-1237.

ROMANAZZI, G.; GABLER, F.M.; MARGOSAN, D.; MACKEY, B.E. & SMILANICK, J.L. 2009. Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Postharvest Pathology and Mycotoxins* 99:1028-1036.

SAS INSTITUTE INC. 2013. Base SAS®9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures. 2st ed. NC: SAS Institute Inc – Cary.

SIVAN, A. 2011. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology* 22:422-426.

SOLIMAN, A.M.; FAHMY, S.R & MOHAMED, W.A. 2015. Therapeutic efficacy of chitosan against invasive candidiasis in mice. *The Journal of Basic and Applied Zoology* 72:163-172.

SOUZA, M.L.; MORGADO, C.M.A.; MARQUES, K.M.; MATTIUZ, C.F.M. & MATTIUZ, B. 2011. Pós-colheita de mangas ‘Tommy atkins’ recobertas com quitosana. *Revista Brasileira de Fruticultura (Volume Especial)*: 337-343.

SUSENO, N.; SAVITRIA, E.; SAPEIA, L. & PADMAWIJAYA, K.S. 2014. Improving shelf-life of cavendish banana using chitosan edible coating. *Procedia Chemistry* 9:113-120.

SZYMAŃSKA, E. & WINNICKA, K. 2015. Stability of chitosan - a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs* 13:1819-1846.

YANG, L. Y.; ZHANG, J. L.; BASSETT, C. L.; MENG, X. H. 2012. Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit. *LWT - Food Science and Technology* 46:254-259.

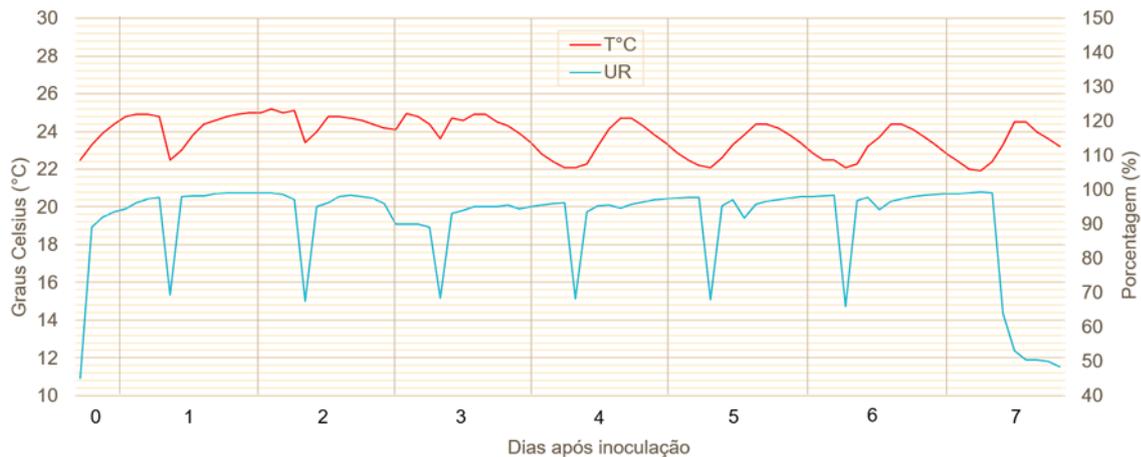
YIN, H.; ZHAO, X & DU, Y. 2010. Oligochitosan: a plant diseases vaccine - A review. *Carbohydrate Polymers* 82:1-8.

ZHU, X.; WANG, Q.; CAO, J.; JIANG, W. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation* 32:770-784.

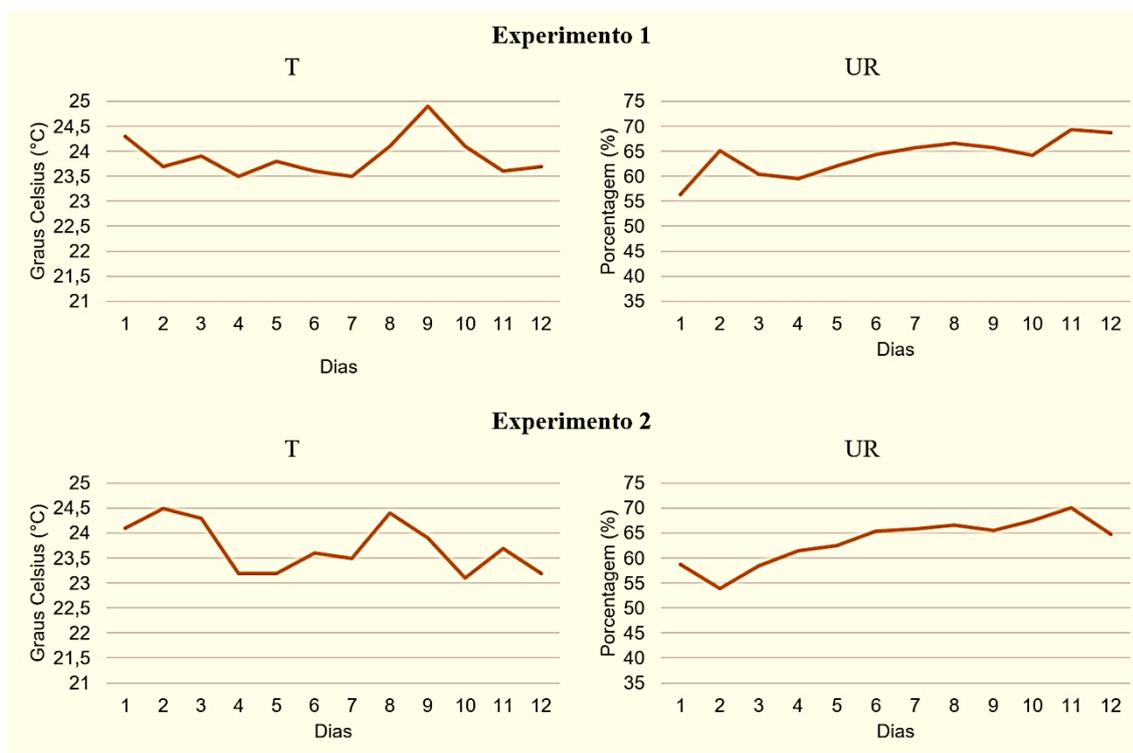
CONCLUSÕES GERAIS

- O método de inoculação com ferimento no fruto através de furo com agulha de metal de 1,25 mm de diâmetro, com deposição de 15 µL do inóculo (M1) e profundidade de 4 mm é o mais indicado para estudos de histologia, patogenicidade, virulência e controle pós-colheita da antracnose do jiló;
- Coll-182, Coll-265, Coll-266, Coll-297, Coll-586 e Coll-588 foram os isolados mais virulentos.
- Todos os isolados de diferentes regiões do Brasil que reproduziram sintoma de antracnose em jiló foram identificados como *Colletotrichum tamarilloi*.
- *In vitro*, a quitosana nas concentrações 0,1 %; 0,2 %; 0,3 % e 0,4 % inibiu o crescimento micelial de *C. tamarilloi*.
- *In vivo*, o revestimento à base de quitosana na concentração de 0,2 % (T4) reduziu a severidade da antracnose em jiló pós-colheita, mas não impediu sua incidência.

ANEXOS



Anexo 1 - Temperatura (°C) e umidade relativa (%) dentro da câmara úmida durante sete dias de experimentação do teste de virulência dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de jiló.



Anexo 2 - Temperatura (T) e Umidade Relativa (UR) no interior da sala de análise física de produtos vegetais do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA) durante 12 dias de condução dos experimentos 1 e 2 de controle *in vivo*.

Anexo 3 – Espécies tipo e de referência do complexo *C. acutatum*.

Espécie	Código de acesso da cultura	Hospedeira	País de origem	Acesso no GenBank		
				GAPDH	ACT	TUB2
<i>C. acerbum</i>	CBS 128530, ICMP 12921, PRJ 1199.3*	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	JQ948790	JQ949780	JQ950110
<i>C. acutatum</i>	CBS 112996, ATCC 56816, STE-U 5292*	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JQ948677	JQ005839	JQ005860
<i>C. acutatum</i>	CBS 144.29	<i>Capsicum annuum</i>	Sri Lanka	JQ948732	JQ949722	JQ950052
<i>C. australe</i>	CBS 116478, HKUCC 2616*	<i>Trachycarpus fortunei</i>	África do Sul	JQ948786	JQ949776	JQ950106
<i>C. australe</i>	CBS 131325, CPC 19820	<i>Hakea</i> sp.	Austrália	JQ948787	JQ949777	JQ950107
<i>C. brisbanense</i>	CBS 292.67, DPI 11711*	<i>Capsicum annuum</i>	Austrália	JQ948621	JQ949612	JQ949942
<i>C. chrysanthemi</i>	IMI 364540, CPC 18930	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	China	JQ948603	JQ949594	JQ949924
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126518, PD 84/520	<i>Carthamus</i> sp.	Holanda	JQ948601	JQ949592	JQ949922
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126519, PD 85/694	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Holanda	JQ948602	JQ949593	JQ949923
<i>C. cosmi</i>	CBS 853.73, PD 73/856*	<i>Cosmos</i> sp.	Holanda	JQ948604	JQ949595	JQ949925
<i>C. costaricense</i>	CBS 330.75*	<i>Coffea arabica</i>	Costa Rica	JQ948510	JQ949501	JQ949831
<i>C. costaricense</i>	CBS 211.78, IMI 309622	<i>Coffea</i> sp.	Costa Rica	JQ948511	JQ949502	JQ949832
<i>C. cuscutae</i>	IMI 304802, CPC 18873*	<i>Cuscuta</i> sp.	República Dominicana	JQ948525	JQ949516	JQ949846
<i>C. cuscutae</i>	CBS 112995, STE-U 5287	<i>Malus domestica</i>	EUA	JQ948628	JQ949619	JQ949949
<i>C. fioriniae</i>	CBS 490.92, ATCC 60260	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nova Zelândia	JQ948656	JQ949647	JQ949977
<i>C. fioriniae</i>	CBS 126508, PD 92/906, BBA 70339	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Holanda	JQ948645	JQ949636	JQ949966
<i>C. fioriniae</i>	CBS 119293, MEP 1322	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Nova Zelândia	JQ948644	JQ949635	JQ949965
<i>C. fioriniae</i>	CBS 127537, STE-U 5289	<i>Vaccinium</i> sp.	EUA	JQ948648	JQ949639	JQ949969
<i>C. fioriniae</i>	CBS 129916, CPC 16823	<i>Vaccinium</i> sp.	EUA	JQ948647	JQ949638	JQ949968
<i>C. fioriniae</i>	CBS 293.67, DPI 13120	<i>Persea americana</i>	Austrália	JQ948640	JQ949631	JQ949961
<i>C. godetiae</i>	CBS 133.44*	<i>Clarkia hybrida</i>	Dinamarca	JQ948733	JQ949723	JQ950053
<i>C. godetiae</i>	CBS 129816, T.A.8	<i>Solanum betaceum</i>	Colômbia	JQ948771	JQ949761	JQ950091
<i>C. guajavae</i>	IMI 350839, CPC 18893*	<i>Psidium guajava</i>	Índia	JQ948600	JQ949591	JQ949921
<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551, CPC 14986*	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonésia	JQ948618	JQ949609	JQ949939
<i>C. johnstonii</i>	CBS 128532, ICMP 12926, PRJ 1139.3*	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nova Zelândia	JQ948775	JQ949765	JQ950095
<i>C. johnstonii</i>	IMI 357027, CPC 18924, PRJ 1125.005	<i>Citrus</i> sp.	Nova Zelândia	JQ948774	JQ949764	JQ950094
<i>C. kinghornii</i>	CBS 198.35*	<i>Phormium</i> sp.	Reino Unido	JQ948785	JQ949775	JQ950105
<i>C. laticiphilum</i>	CBS 112989, IMI 383015, STE-U 5303*	<i>Hevea brasiliensis</i>	Índia	JQ948619	JQ949610	JQ949940
<i>C. laticiphilum</i>	CBS 129827, CH2	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colômbia	JQ948620	JQ949611	JQ949941
<i>C. limetticola</i>	CBS 114.14*	<i>Citrus aurantifolia</i>	EUA	JQ948523	JQ949514	JQ949844
<i>C. lupini</i>	CBS 109225, BBA 70884*	<i>Lupinus albus</i>	Ucrânia	JQ948485	JQ949476	JQ949806
<i>C. lupini</i>	CBS 466.76	<i>Manihot utilissima</i>	Ruanda	JQ948490	JQ949481	JQ949811
<i>C. melonis</i>	CBS 159.84*	<i>Cucumis melo</i>	Brasil	JQ948524	JQ949515	JQ949845

Anexo 3 (continuação)

<i>C. nymphaeae</i>	CBS 515.78*	<i>Nymphaea alba</i>	Holanda	JQ948527	JQ949518	JQ949848
<i>C. nymphaeae</i>	IMI 379162, CPC 18934	<i>Capsicum annuum</i>	Zimbábue	JQ948548	JQ949539	JQ949869
<i>C. orchidophilum</i>	CBS 632.80*	<i>Dendrobium</i> sp.	EUA	JQ948481	JQ949472	JQ949802
<i>C. orchidophilum</i>	CBS 119291, MEP 1545	<i>Cynoches aureum</i>	Panamá	JQ948484	JQ949475	JQ949805
<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753, CPC 18868*	<i>Musa</i> sp.	Santa Lúcia	JQ948615	JQ949606	JQ949936
<i>C. paxtonii</i>	CBS 502.97, LARS 58	<i>Musa nana</i>	‘Ilhas do Caribe’	JQ948616	JQ949607	JQ949937
<i>C. phormii</i>	CBS 118194, AR 3546*	<i>Phormium</i> sp.	Alemanha	JQ948777	JQ949767	JQ950097
<i>C. phormii</i>	CBS 483.82	<i>Phormium tenax</i>	Nova Zelândia	JQ948782	JQ949772	JQ950102
<i>C. pseudoacutatum</i>	CBS 436.77*	<i>Pinus radiata</i>	Chile	JQ948811	JQ949801	JQ950131
<i>C. pyricola</i>	CBS 128531, ICMP 12924, PRJ 977.1*	<i>Pyrus communis</i>	Nova Zelândia	JQ948776	JQ949766	JQ950096
<i>C. rhombiforme</i>	CBS 129953, PT250, RB011*	<i>Olea europaea</i>	Portugal	JQ948788	JQ949778	JQ950108
<i>C. rhombiforme</i>	CBS 131322, DAOM 233253, C10, MS1L34	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	EUA	JQ948789	JQ949779	JQ950109
<i>C. salicis</i>	CBS 607.94*	<i>Salix</i> sp.	Holanda	JQ948791	JQ949781	JQ950111
<i>C. salicis</i>	CBS 115.14	<i>Solanum lycopersicum</i>	Alemanha	JQ948810	JQ949800	JQ950130
<i>C. scovillei</i>	CBS 126529, PD 94/921-3, BBA 70349*	<i>Capsicum</i> sp.	Indonésia	JQ948597	JQ949588	JQ949918
<i>C. scovillei</i>	CBS 120708, HKUCC 10893, Mj6	<i>Capsicum annuum</i>	Tailândia	JQ948599	JQ949590	JQ949920
<i>C. simmondsii</i>	CBS 122122, BRIP 28519*	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JQ948606	JQ949597	JQ949927
<i>C. simmondsii</i>	IMI 313840, CPC 18875	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	JQ948614	JQ949605	JQ949935
<i>C. sloanei</i>	IMI 364297, CPC 18929*	<i>Theobroma cacao</i>	Malásia	JQ948617	JQ949608	JQ949938
<i>C. tamarilloi</i>	CBS 129814, T.A.6*	<i>Solanum betaceum</i>	Colômbia	JQ948514	JQ949505	JQ949835
<i>C. tamarilloi</i>	CBS 129811, T.A.3	<i>Solanum betaceum</i>	Colômbia	JQ948515	JQ949506	JQ949836
<i>C. walleri</i>	CBS 125472, BMT(HL)19*	<i>Coffea</i> sp.	Vietnã	JQ948605	JQ949596	JQ949926
<i>Colletotrichum</i> sp.	CBS 129810, T.A.2	<i>Solanum betaceum</i>	Colômbia	JQ948509	JQ949500	JQ949830
<i>Colletotrichum</i> sp.	IMI 384185, CPC 18937	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	JQ948521	JQ949512	JQ949842
<i>Colletotrichum</i> sp.	CBS 129821, G6	<i>Passiflora edulis</i>	Colômbia	JQ948512	JQ949503	JQ949833
<i>Colletotrichum</i> sp.	CBS 129820, G5	<i>Passiflora edulis</i>	Colômbia	JQ948513	JQ949504	JQ949834
<i>Colletotrichum</i> sp.	CBS 129823, G8	<i>Passiflora edulis</i>	Colômbia	JQ948522	JQ949513	JQ949843
<i>Colletotrichum</i> sp.	CBS 101611	Samambaia	Costa Rica	JQ948526	JQ949517	JQ949847