

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA DO
TRÓPICO ÚMIDO – PPG-ATU/INPA**

KAMILA FREIRE ARAUJO SANTANA

**Controle alternativo da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.)
utilizando produtos derivados de vegetais**

**Manaus- Amazonas
Agosto, 2015**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA DO
TRÓPICO ÚMIDO – PPG-ATU/INPA**

KAMILA FREIRE ARAUJO SANTANA

**Controle alternativo da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.)
utilizando produtos derivados de vegetais**

ORIENTADOR: Dr. Rogério Eiji Hanada

COORIENTADOR: Dr. Sérgio Duvoinsin Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

**Manaus- Amazonas
Agosto, 2015**

S232c Santana, Kamila Freire Araujo
Controle alternativo da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) utilizando produtos derivados de vegetais / Kamila Freire Araujo Santana. --- Manaus: [s.n.], 2015.
f. il., color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.
Orientador: Rogério Eiji Hanada.
Área de concentração: Agricultura no Trópico úmido

1. Cebolinha- antracnose foliar. 2. Antracnose – controle alternativo. 3. Derivados de vegetais – controle de antracnose.
4. *Allium fistulosum* L. I. Título

CDD 635.26


A Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TÍTULO: "Controle alternativo da antracnose em cebolinha
(Allium fistulosum L.) utilizando produtos derivados de
vegetais"**

AUTOR:

KAMILA FREIRE ARAUJO SANTANA


BANCA JULGADORA:



DANILO FERNANDES DA SILVA FILHO, Dr. (INPA)
(Membro)



SOLANGE DE MELLO VERAS, Dra. (UFAM)
(Membro)



KEDMA SILVA MATOS, Dr. (INPA)
(Membro)

Manaus, 27 de Agosto de 2015.

Diana Freire Araujo Santana e Flavio Araujo Santana, meus pais, pelo carinho,
incentivo, determinação e por acreditarem em mim;
Ao Francisco Luis Costa Lima Jr., meu marido, pelo amor, apoio e companheirismo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus;

Aos meus pais Flavio Araujo Santana e Diana Freire Araujo Santana, por me ajudarem na realização de meu sonho e pelo apoio financeiro;

Ao meu esposo Francisco Luis Costa Lima Jr., pela força, coragem e determinação;

Ao Dr. Rogério Eiji Hanada, pela paciência e orientação;

À Dra. Rosalee Albuquerque Coelho Netto, pelo espaço cedido no Laboratório de Fitopatologia- INPA e pelos conselhos pessoais e profissionais de grande ajuda;

Aos pesquisadores Luiz Alberto Guimarães Assis (Tirico), pela ajuda nas coletas de campo e no laboratório; Ariel Dotto Blind pela ajuda no experimento em campo na Estação de Experimental de Hortaliças do INPA (sem sua ajuda não teria conseguido fazer esse trabalho);

Aos meus companheiros de mestrado Lais Bentes e Jonathan Alves da Silva, pela ajuda no laboratório (muito obrigada!);

Ao Pessoal do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa, em especial ao Dr. Gilvan Ferreira, pelo apoio e a disponibilidade em me ajudar nesse trabalho;

À Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado do Amazonas- FAPEAM, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Auxílio financeiro);

Ao Projeto de Moléculas com potencial antifúngico em sementes, folhas e casca de espécies arbóreas: Bioprospecção, uso e sustentabilidade da flora amazônica;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização concretização dessa dissertação.

Obrigada

Controle alternativo da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) utilizando produtos derivados de vegetais

RESUMO

A cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.) é uma das principais hortaliças utilizada na culinária brasileira. Como toda cultura, essa planta é suscetível às doenças que podem causar danos e prejuízos significativos ao produtor. A antracnose foliar, causada por *Colletotrichum* spp. é a principal doença da cultura no Amazonas e o seu controle por meio de produtos químicos é muito complexo por ser uma cultura de ciclo curto. Até a presente data, não existem fungicidas registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para este patossistema. Diante desse contexto esse trabalho teve como objetivo estudar o efeito de produtos derivados de vegetais, como extratos brutos aquosos (EBA) de casca preciosa (*Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez.) e da pimenta longa (*Piper aduncum* L.); hidrolatos (HID) de pau rosa (*A. rosaeodora* Ducke), macacaporanga (*A. parviflora* Ducke) e de pimenta longa; óleo essencial (OE) e infusão (IN) de pimenta longa para controlar antracnose da cebolinha. Inicialmente foram obtidos quatro isolados de *Colletotrichum* spp. e sua patogenicidade confirmada. Para elaboração de EBAs, 200 g de folhas foram imersas em 800 mL de água destilada e mantidas por 24 h em temperatura ambiente. Já os OEs e HIDs foram obtidos por arraste a vapor através do aparelho Clevenger (1 L de água para 100 g de folhas), enquanto que para infusão utilizou-se 200 g de folhas frescas imersas em 800 mL de água destilada aquecida a 70 °C, mantida por três horas em um recipiente escuro e fechado em temperatura ambiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com oito tratamentos: T1 (EBA de casca preciosa), T2 (IN de pimenta longa), T3 (HID de pau rosa), T4 (HID de macacaporanga), T5 (OE de pimenta longa), T6 (HID pimenta longa), T7 (EBA pimenta longa) e T8 (testemunha-água) com nove repetições por tratamento, cada planta foi considerada uma unidade experimental. Os derivados vegetais foram diluídos em água destilada na concentração de 30% e aplicados semanalmente por 50 dias, na parte aérea da planta. A avaliação consistiu tanto na incidência como na severidade da doença. A partir dos dados da incidência da doença ($Y_p =$ planta) e da severidade ($Y_f =$ folhas centrais) foram calculados as respectivas áreas abaixo da curva de progresso da doença, AACPDp e AACPDf. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os produtos derivados de vegetais proporcionaram redução na incidência da doença, sendo os melhores tratamentos com HIDs de macacaporanga e pimenta longa que reduziram em 54,6% e 52,4%, respectivamente. Enquanto que os melhores resultados para severidade foram proporcionadas pelas: IN de pimenta longa, HIDs de macacaporanga e pimenta longa que reduziram em 63,5%, 63% e 62,9% respectivamente, em comparação com a testemunha. Os tratamentos proporcionaram incrementos médios de 64,5% no comprimento final das plantas de cebolinha em comparação com a testemunha. A partir desses resultados os HIDs de macacaporanga e pimenta longa apresentaram potenciais controladores da antracnose da cebolinha.

Palavras chave: Óleo essencial, hidrolatos, extrato bruto, *Aniba* spp., *Piper aduncum*.

ABSTRACT

Alternative control of anthracnose in chives (*Allium fistulosum* L.) using vegetable-derived products

The common chives (*Allium fistulosum* L.) is one of the main vegetables used in Brazilian cuisine. The leaf anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. is the major disease of the chives culture in the Amazon. However, there are no fungicides registered with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply for this pathosystem. This study aimed to report the effect of plant-derived products such as precious shell of aqueous crude extracts (*Aniba canelilla* (HBK) Mez.), long pepper (*Piper aduncum* L.), hydrolats rosewood (*A. rosaeodora* Ducke), macacaporanga (*A. parviflora* Ducke), long pepper, long pepper essential oil and infusion in controlling anthracnose chives, caused by *Colletotrichum* sp. First, 4 isolated *Colletotrichum* spp. were obtained and it was confirmed its pathogenicity, however just one isolated was used. For the preparation of EBAs, 200 g of leaves were immersed in 800 mL of distilled water and it was kept for 24 h at room temperature. Since SOs and the HIDs were obtained by steam distillation by Clevenger apparatus (1 L water for 100 g of leaves), while infusion was used 200 g of fresh leaves immersed in 800 ml of distilled water heated to 70 °C, maintained for three hours in a dark container and closed at room temperature. OEs and HIDs were obtained by steam distillation by Clevenger apparatus (1 L water for 100 g of leaves), while infusion was used 200 g of fresh leaves immersed in 800 mL of distilled water heated to 70 °C, maintained for three hours in a dark, closed container at room temperature. The experimental design was completely randomized (DIC), with eight treatments: T1 (precious shell EBA), T2 (long pepper IN), T3 (rosewood HID), T4 (macacaporanga HID), T5 (pepper OE long), T6 (HID long pepper), T7 (EBA long pepper) and T8 (control-water); nine replicates per treatment, each plant was considered an experimental unit. The vegetable derivatives were diluted in distilled water and applied weekly for 50 days, in all aerial parts of the plant, at a concentration of 30 %. The evaluation consisted of computing all treatment with the absence or presence of disease symptoms. Data from the incidence of the disease in the plant (Y_p = plant) and severity in the central leaves (Y_f = central leaves) were used to calculate the respective areas under the disease progress curve, AACPD_p and AACPD_f. The mean data were compared using ANOVA and Tukey's test at 5% probability. The treatments significantly affected the health and productivity of spring onion plants. Provided average 40% reduction in incidence of the disease in the whole plant. Highlighted, there are treatments with HIDs of macacaporanga that inhibited 54.6% and long pepper with 52.4% inhibition and average reduction of 55.6% severity. Highlighted, long pepper infusion that inhibited 63.5%, the macacaporanga's HIDs that inhibited 63% and long pepper that inhibited 62.9% compared with the control (water). Regarding productivity, the treatment caused 64.5% Average increases in of the final width of chives leaves compared to the witness. From these results, it is estimated that in the future, macacaporanga's HIDs and long pepper will be used by chives producers in the states of Amazonas.

Keywords: *Colletotrichum* sp .; *Allium fistulosum*; vegetable products; anthracnose leaf

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aspectos gerais sobre a cultura da cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.)	3
2.2. Antracnose na família Alliaceae	4
2.3. Aspecto e características de <i>Colletotrichum</i> spp.	5
2.4. Identificação de <i>Colletotrichum</i> spp.	7
2.5. Controle da antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i>)	10
2.6. Controle alternativo de fitopatógenos utilizando produtos derivados de vegetais	11
2.7. Pimenta longa (<i>Piper aduncum</i> L.) como biodefensivo agrícola	12
2.8. Importância econômica e potencial de pau rosa (<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke), casca preciosa (<i>Aniba canelilla</i> (H.B.K.) Mez.) e macacaporanga (<i>Aniba parviflora</i> Ducke) no controle de micro-organismos	13
2.9. Características gerais de óleos essenciais e as principais formas de extração	15
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Isolamento e identificação por características morfológicas e molecular dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. oriundos de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.)	18
4.1.1. Local de coleta das espécies de <i>Colletotrichum</i>	18
4.1.2. Obtenção de culturas monospóricas	18
4.1.3. Caracterização morfocultural de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	19
a. Crescimento micelial em diferentes meios de cultura	19
b. Formação de setores, topografia e coloração da colônia	20
c. Esporulação em diferentes meios de culturas	20
d. Preparo de lâminas semipermanentes para estudo de morfometria de conídios e apressórios	21
4.1.4. Caracterização molecular	22
a. Preparo do tampão de extração	22
b. Extração, quantificação e diluição do DNA	22
c. Identificação molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.	24
4.2. Elaboração de Hidrolatos (HID), Extrato Bruto Aquoso (EBA), Óleo Essencial (OE) e Infusão (IN)	24
a. Local de coleta	25
b. Produção do Óleo Essencial (OE) e Hidrolatos (HID) de pimenta longa e macacaporanga	25
c. Produção de Extrato Bruto Aquoso (EBA) de pimenta longa e casca	

preciosa	25
d. Produção de Infusão (IN) de pimenta longa	26
e. Esterilização dos produtos derivados de vegetais	26
4.3. Efeito dos produtos derivados de vegetais quanto à inibição de germinação de conídios de quatro isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	26
4.4. Efeito dos produtos derivados de vegetais na incidência e severidade da antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.), causado por <i>Colletotrichum</i> sp.	28
a. Avaliação da incidência e severidade da antracnose foliar em cebolinha ...	31
b. Análise biométricas das cebolinhas	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Identificação molecular dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.)	34
5.1.1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. oriundos de cebolinha	35
5.2. Efeito fungitóxico dos produtos derivados de vegetais na inibição da germinação de conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. oriundos de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.)	42
5.3. Efeito da aplicação de produtos vegetais no controle da antracnose causado por <i>Colletotrichum</i> spp. e na produtividade na cultura da cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.)	44
a. Incidência da antracnose em cebolinha	45
b. Severidade da antracnose em cebolinha	48
c. Produtividade das plantas de cebolinhas	50
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. ANEXOS	66

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Lista de <i>primers</i> utilizados para o sequenciamento	24
Tabela 2: Escala de nota para avaliar a incidência da antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) causada por <i>Colletotrichum</i> sp.	32
Tabela 3: Escala de nota para avaliar a severidade da antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) causada por <i>Colletotrichum</i> sp.	32
Tabela 4: Identificação molecular de quatro isolados de <i>Colletotrichum</i> sp., oriundos de folhas com sintomas de antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.), os genes utilizados e o acesso no GenBank	35
Tabela 5: Média de produção de conídios de quatro isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., oriundos de folhas com sintomas de antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) cultivados em três tipos de meio de cultura (BDA, Aveia e SNA) ..	37
Tabela 6: Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e características morfocultural dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., oriundos de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) no Estado do Amazonas, Brasil, sobre diferentes meios de cultura	41
Tabela 7: Porcentagem da inibição na germinação de conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp., oriundos de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) utilizando produtos derivados de vegetais sob diferentes concentrações	43
Tabela 8: Média da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (incidência) da antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> sp. em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) e porcentagem de controle em relação a testemunha	46
Tabela 9: Média da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (severidade) da antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> sp. em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) porcentagem de controle em relação a testemunha	49
Tabela 10: Média do comprimento de folhas de plantas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) e porcentagem de desenvolvimento em comparação com a testemunha	51
Tabela 11: Média da largura de folhas de plantas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) e porcentagem de desenvolvimento em comparação com a testemunha	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Formas de apressórios utilizados para classificação: 1. Lobados; 2. Levemente lobados; 3. Arredondados (Adaptado de Cox e Irwin, 1988; Sutton, 1980)	22
Figura 2: Croqui da distribuição do experimento para o plantio das mudas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.). As plantas úteis localizadas no centro do experimento (parte verde) e a bordadura (parte marrom).....	29
Figura 3: Fig.A e B- Manejo do solo e preparo dos canteiros; Fig. C e D- Plantio de mudas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.)	29
Figura 4: Fig.A, B, C, D e E- Sintomas da antracnose em plantas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) causado por <i>Colletotrichum</i> sp.	30
Figuras 5: Fig.A, B, C- Sintomas da antracnose em folhas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) causado por <i>Colletotrichum</i> sp.; Fig.D, E- Presença de acervúlos	30
Figuras 6: Fig.A, B, C- Acervúlos com setas de <i>Colletotrichum</i> sp. em folhas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.), Fig.A e B- isolado INPA 2770 e Fig.C- isolado INPA 2774	31
Figuras 7: Escala Diagramática para avaliação da severidade da antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) causada por <i>Colletotrichum</i> sp.	32
Figura 8: Aspecto de colônias de <i>Colletotrichum theobromicola</i> (INPA 1809), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA); A- topografia parte superior; B- topografia parte inferior	37
Figura 9: Aspecto das colônias de <i>Colletotrichum truncatum</i> (INPA 2743), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA); A- topografia parte superior; B- topografia parte inferior	37
Figura 10: Aspectos das colônias de <i>Colletotrichum spaethianum</i> (INPA 2770), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA)	38
Figura 11: Aspectos das colônias de <i>Colletotrichum spaethianum</i> (INPA 2774), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA); A- topografia parte superior; B- topografia parte inferior	38
Figura 12: A e B- Setas septadas retiradas de acervúlos de <i>Colletotrichum spaethianum</i> (INPA 2774), cultivados por sete dias a 25 °C em meio de Aveia	38
Figura 13: Estruturas de <i>Colletotrichum theobromicola</i> (INPA 1809); A- Apressórios e B- Conídios.....	39

Figura 14: Estruturas de <i>Colletotrichum truncatum</i> (INPA 2743); A- Apressórios e B- Conídios	39
Figura 15: Estruturas de <i>Colletotrichum spaethianum</i> (INPA 2770); A- Apressórios e B- Conídios	39
Figura 16: Estruturas de <i>Colletotrichum spaethianum</i> (INPA 2774); A- Apressórios e B- Conídios	40
Figura 17: Efeito de pulverização de produtos derivados de vegetais em plantas de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) infectadas por <i>Colletotrichum</i> sp., durante sete semanas de produção, em Manaus, AM. A testemunha está ao lado esquerdo de cada foto (Extrato Bruto Aquoso (EBA) de casca preciosa (A), Infusão de pimenta longa (IN) (B), Hidrolato (HID) de pau rosa (C), Hidrolato (HID) de macacaporanga (D), Óleo Essencial (OE) de pimenta longa (E), Hidrolato (HID) de pimenta longa (F), Extrato Bruto Aquoso (EBA) de pimenta longa (G), uma parcela de cada tratamento (H))	45
Figura 18: Curva de progresso da doença, quanto à incidência da antracnose em cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.), após pulverizações dos produtos derivados de vegetais em função do tempo.....	46
Figura 19: Curva de progresso da doença (severidade) da antracnose em três folhas centrais de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i> L.) infectadas por <i>Colletotrichum</i> sp., após pulverizações dos produtos derivados de vegetais em função do tempo.....	48
Figura 20: Efeito dos produtos derivados de vegetais em cebolinhas infectadas com <i>Colletotrichum</i> sp., após sete semanas do plantio. (T1) extrato bruto aquoso de casca preciosa, (T2) extrato aquoso de pimenta longa; (T3) hidrolatos de pimenta longa, (T4) hidrolato de pau rosa, (T5) hidrolato de macacaporanga, (T6) óleo essencial de pimenta longa, (T7) infusão de pimenta longa, (T8) testemunha	52

1. INTRODUÇÃO

A cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.) é uma planta anual, pertencente à família Alliaceae, que possui numerosas folhas fistulosas e cilíndricas, com comprimento que varia de 25 e 35 cm (Agrovel, 2015). O cultivo dessa cultura é indicado para regiões de clima ameno, porém, se desenvolve, também, em climas tropicais (Filgueira, 2000). No Brasil, é bastante apreciada como condimento, sendo na Região Norte, comercializada com outras hortaliças, como o coentro (*Coriandrum sativum* L.) e a chicória (*Eryngum foetidum* L.), esse trio é denominado de cheiro verde, nome que pode variar dependendo da região do país. É utilizada como um dos principais temperos para a elaboração de pratos à base de peixes, principalmente caldeiradas, um dos pratos mais consumido pelos amazonenses (Heredia *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2006).

Sem dúvida, a cebolinha é uma das principais hortaliças utilizada na culinária brasileira. No entanto, existem várias enfermidades que podem afetar sua produção, tais como: mancha púrpura, causada pelo fungo *Alternaria porri* (Ell.) Cif., a queima das pontas incitada por *Botrytis squamosa* (J. Walker), e a antracnose foliar ou mal das sete voltas, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Sacc.) (Costa e Mello, 1984). Sendo esta considerada a mais severa para a cultura na região de Manaus, AM e a que mais depende do uso de fungicidas para o seu controle.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos amplamente disseminados, sobrevivem parasitando vegetais ou como saprófita em materiais orgânicos em decomposição. Os principais sintomas causados pelo fungo nas folhas são lesões circulares, deprimidas com halo de coloração marrom clara (Resende e Fancelli, 1997). Apesar de antracnose ocorrer em todo o mundo, a maior severidade é registrada nas regiões tropicais e subtropicais, limitando o cultivo de diversas plantas economicamente importantes, como cebola (*Allium cepa* L.), alho (*Allium sativum* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener). A doença afeta a qualidade e causa perdas que podem atingir até 100% da produção (Costa e Mello, 1984; Cabera e Alvarez, 2002; Varzia *et al.*, 2002; Wordell Filho *et al.*, 2008).

O controle químico da antracnose na cebolinha, no Brasil, é muito complexo. Por ser uma planta de ciclo curto e explorada em pequena escala não existem fungicidas

registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para este patossistema (Agrofit, 2015). Outros métodos de controle devem ser desenvolvidos e empregados no manejo dessa doença. O uso de recursos naturais com atividade antimicrobiana e até indutores de resistência podem ser métodos alternativos no controle dessa enfermidade. Além disso, os produtos derivados de vegetais (óleos, extratos e hidrolatos) têm a vantagem de não agredir o meio ambiente e a saúde tanto do agricultor como do consumidor (Souza e Resende, 2006).

Os produtos derivados de vegetais (óleos, extratos e hidrolatos) vêm sendo amplamente estudados por apresentarem em sua composição múltiplas atividades, como: inseticida, acaricida, nematicida, bactericida e fungicida. Muitos derivados vegetais possuem substâncias que podem envolver mais de um mecanismo de ação no controle de doenças de plantas, como a nutrição vegetal, atividade antimicrobiana e a indução de resistência do hospedeiro (Franco e Bettiol, 2000; Benato *et al.*, 2002; Carré *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Araújo, 2014).

Celoto *et al.* (2011) registraram a inibição de 71% de crescimento micelial e 100% da germinação de conídios de *Colletotrichum musae* (Berk. e Curtis) Arx., agente causal da antracnose na banana (*Musa* sp.), utilizando extrato aquoso de *Momordica charantia* L. (melão de São Caetano). Venturoso *et al.* (2011) relataram a atividade antifúngica dos extratos bruto aquosos de alho, canela e cravo da Índia sobre os fungos, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Fusarium solani* (Snyd e Hans) e *Cercospora kikuchii* (Mats. e Tomoy.) Gardner.

Portanto, estudar a eficiência e a viabilidade do uso de produtos derivados de vegetais para o controle alternativo de doenças de plantas é um desafio dos pesquisadores no que tange o manejo de doenças de plantas, além de visar um sistema agrícola sustentável. Dentro deste contexto, esse estudo teve como proposta avaliar os produtos derivados de vegetais, como extratos brutos aquosos de casca preciosa (*Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez.) e pimenta longa (*Piper aduncum* L.), hidrolatos de pau rosa (*A. rosaeodora* Ducke), macacaporanga (*A. parviflora* Ducke) e pimenta longa, óleo essencial e infusão de pimenta longa no controle da antracnose da cebolinha, causada por *Colletotrichum* spp.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais sobre a cultura da cebolinha (*Allium fistulosum* L.)

A cebolinha (*Allium fistulosum* L.), pertencente à família Alliaceae, popularmente conhecida como cebolinha verde ou comum, é uma hortaliça anual, natural da Sibéria, semelhante à cebola, porém não desenvolve bem o bulbo. Na base da haste produz um engrossamento semelhante a bulbos ovais, os quais vão formar tufos bem fechados, onde irão originar folhas finas de coloração verde-escura (Agrovel, 2015). Existe algumas cultivares de cebolinha, sendo Futonegui, Hossonegui e Todo Ano as mais conhecidas (Filgueira, 2000).

O cultivo da cebolinha é indicado para regiões de clima ameno, com temperaturas entre 8 e 22 °C, porém, se desenvolve bem em climas tropicais. Esta planta necessita de solos de textura média, ricos em matéria orgânica, bem drenados com pH entre 6,0 e 6,8. A colheita é realizada por meio da retirada da planta inteira que geralmente ocorre entre 55 e 60 dias após o plantio ou entre 85 e 100 dias após a semeadura (Filgueira, 2000).

A cebolinha é uma das principais hortaliças consumida pelos brasileiros como condimento para elaboração de vários pratos. Na região Amazônica é muito utilizada como condimento para o preparo de pratos à base de peixes, como, caldeiradas, um dos pratos mais consumidos pelos amazonenses (Clemente *et al.*, 2006). Estima-se que em 2013, o Estado do Amazonas produziu 142.747,50 mil maços de cebolinha da cultivar Todo Ano, em 256,94 hectares, sendo cultivada principalmente por produtores da agricultura familiar (IDAM, 2014).

Como toda cultura, a cebolinha também é suscetível às doenças que podem causar danos e prejuízos significativos ao produtor, como a podridão mole, que é provocada por *Pectobacterium carotovorum subsp. Caratovorum* (Jones) Hauben *et al.* Após a infecção por essa bactéria, rapidamente o tecido amolece, apodrece e é invadido por micro-organismos saprófitas. O bulbo da planta apresenta forte impregnação de odor fétido. Geralmente essa doença esta associada ao manejo inadequado de irrigação (Wordell Filho *et al.*, 2008).

Entre as doenças causadas por fungos, três apresentam importância relevante à cultura. A mancha púrpura causada por *Alternaria porri* (Ell.) Cif., que secreta um pigmento de coloração púrpura ante da infecção, posteriormente infectam as folhas,

manifestando-se pequenas manchas esbranquiçadas, amareladas e ovuladas, que podem expandir em condições de alta umidade (Araujo *et al.*, 2012). As infecções que afetam o pseudocaule podem alcançar o bulbo e provocar o apodrecimento do mesmo. As lesões maiores no centro da folha e na haste floral causam a dobra e a quebra das mesmas. Essa doença pode provocar perdas de até 50 % da produção (Araujo *et al.*, 2012).

A queima das pontas, incitada pelo fungo *Botrytis squamosa* (J. Walker), apresenta pequenas manchas isoladas sobre a lâmina foliar, com dimensões de um a três milímetros e manifesta halos prateados na ponta das folhas, o resto do tecido permanece verde (Wordell Filho *et al.*, 2008). As manchas pequenas podem aumentar de tamanho, permanecendo isoladas, porém, quando em alta densidade, causam o ressecamento da folha ou, em condições favoráveis, a doença evolui rapidamente, em forma de queima descendente da folha (Wordell Filho *et al.*, 2008). A queima das pontas provocado por *B. squamosa* é facilmente confundida com as lesões causadas por fitotoxidez de agrotóxicos e danos mecânicos, o que dificulta sua identificação (Wordell Filho *et al.*, 2008).

Por último a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum cicirans* e *C. gloeosporioides* Penz. (Sacc.), conhecido por apresentar lesões nas folhas, com círculos concêntricos, alongados com margem marrom clara deprimida, sendo perceptível a aparição de pequenos pontos pretos (acérvulos) distribuídos nesses círculos concêntricos (Kim *et al.*, 2008; Resende e Fancelli, 1997).

2.2. Antracnose na família Alliaceae

A antracnose é uma doença de clima tropical e sub-tropical favorecida por frequentes precipitações, que causam impactos econômicos significativos em várias regiões produtoras, por diminuir a qualidade e, conseqüentemente, provocar perdas no valor comercial de até 100% (Resende e Fancelli, 1997). A enfermidade na cebola (*Allium cepa* L.) teve seu primeiro relato no Brasil em 1931, sendo que, a partir de 1960 até 1964 surgiram os primeiros relatos de epidemias (Boff, 1993). Na ocasião estudos sobre a etiologia da doença a qual apresentou um complexo quadro sintomatológico foram iniciados. Desde então, essa enfermidade vem sendo relatada na maioria das regiões produtoras de cebola do Brasil, embora de ocorrência esporádica e localizada

(Wordell Filho *et al.*, 2008).

Os sintomas mais frequentes da antracnose na cebolinha (*Allium fistulosum* L.), no alho (*Allium sativum* L.) e na cebola é o tombamento. A infecção nos primeiros meses pode também induzir o retorcimento foliar, deixando o pescoço mais endurecido e de cor verde clara, conhecido como “mal das sete voltas” (Resende e Fancelli, 1997). Caso a infecção ocorra mais tarde pode haver redução da parte aérea e emissão de novas raízes, fazendo com que haja o rompimento das escamas dos bulbos próximos a coroa e tornando-os mais frágeis no armazenamento (Wordell Filho *et al.*, 2008).

2.3. Aspectos e características de *Colletotrichum* spp.

O gênero *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em diversas plantas incluindo as Alliaceas, pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Phyllachorales (Sutton, 1992, Alexopoulos *et al.*, 1996; Agrios, 2005). Há varias espécies desse gênero que são denominadas de acordo com o nome do hospedeiro: *Colletotrichum guaranicola*, *C. musae* e *C. graminicola*. Algumas espécies de *Colletotrichum* são mais específicas a determinados hospedeiros, como *C. lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e *C. musae* em frutos de bananeira (*Musa paradisiaca* L.). Existem outras espécies que são polípagas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* que podem infectar uma gama de hospedeiros (Menezes, 2002).

Este fungo pode ser encontrado nas formas saprofíticas e patogênicas e é responsável por provocar o sintoma da antracnose, doença que causa danos a economia de ocorrência em uma ampla gama de hospedeiros (Menezes, 2002). As plantas estão expostas a essa doença em todas as fases de desenvolvimento e o patógeno pode ser disseminado de uma planta para outra por meio de inúmeros agentes do ambiente (Bo *et al.*, 2012). As sementes infectadas podem disseminar o patógeno de uma área para outra e, quando semeadas, podem infectar as plântulas, induzindo sintomas de *damping-off* de pré e pós-emergência (Amorim *et al.*, 2011).

Para invadir o tecido hospedeiro, este fungo utiliza estratégias que variam de hemibiotróficos intracelular a necrotrófico subcuticular, já que apresenta em seu desenvolvimento estruturas especializadas (apressórios) (Amorim *et al.*, 2011). Com o processo de colonização nos tecidos da planta afetada, surgem os sintomas de

antracnose, visíveis em folhas, inflorescências e frutos, sendo a doença mais severa em regiões tropicais e subtropicais (Bo *et al.*, 2012).

Colletotrichum spp. apresentam células conidiogênicas agregadas em conidiomas (acérvulos), como, também, ramificações laterais do micélio. As setas e células conidiogênicas são homólogas (Lins *et al.*, 2007). Em determinadas condições do ambiente, as setas podem produzir conídios na sua extremidade, pois existem setas férteis e com função semelhante a de um conidióforo fialídico (Holliday; 1980; Gunnell e Gubler, 1992; Alexopoulos *et al.*, 1996; Lins *et al.*, 2007).

Os conídios variam de curvados a retos, cilíndricos, de ápice obtuso ou não e base truncada. São produzidos nos acérvulos, envolvidos por uma matriz gelatinosa (coloração que varia de rosa alaranjado, amarelo ou hialino) constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz protege os conídios da dissecação, aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro. Os conídios não constituem estruturas de sobrevivência, porque sua viabilidade diminui rapidamente. Entretanto, o micélio pode permanecer viável por longo período, em sementes infectadas, restos de cultura ou infecções latentes (Mishra e Siradhana, 1979). A disseminação dos conídios dá-se especialmente pelo vento e respingos de chuva, animais, insetos e ferramentas de trabalho contaminadas (Tavares, 2004; Sales Junior *et al.* 2004).

A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade. Na extremidade do tubo germinativo do conídio há formação de apressório, estrutura que pode ser produzida na extremidade de hifas do micélio. Durante a formação do apressório há síntese de proteínas requeridas para a produção de melanina que confere a cor escura (castanha) da estrutura, tornando-o infectivo. Em geral, os apressórios são resistentes às condições adversas do ambiente, atuando como órgão de sobrevivência. No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, este emite hifas de penetração e colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia. Um simples tubo germinativo, também, proporciona potencial para produção de conídios fialídicos na sua extremidade (Menezes e Hanlin, 1996).

As colônias de *Colletotrichum* spp. variam de coloração dependendo da espécie ou podem variar de cor sendo da mesma espécie, geralmente apresentam cores de micélio que variam de branco a cinza clara a cinza escuro, de amarelo a creme a rosa

amarelado, normalmente possuem micélio aéreo (Tavares, 2004). Segundo Cruz (2014), colônias de *Colletotrichum* spp. oriundas de folhas de guaranazeiro, apresentaram coloração branca a creme amarelada (verso) e amarelo a creme amarelada (reverso), com poucos setos e sem microescleródios. A maioria das colônias apresentaram micélio baixo, liso e escarso ou coriáceo, com reverso de coloração branca a creme amarelada. Porém, outras colônias também isoladas de folhas de guaranazeiro, apresentaram características distintas quanto a morfologia, com micélio aéreo mais denso e cotonoso, de coloração branco acinzentado a cinza claro (verso) e branco a cinza escuro (reverso), indicando espécies distintas. Aspectos semelhantes foram descritos por Tozze Júnior, (2012) para *C. gloeosporioides* e por Moriwaki *et al.*, (2003), para *C. boninense*. Esse gênero é muito heterogêneo em meio de cultura, especialmente quanto às características miceliais (Tavares, 2004).

2.4. Identificação de *Colletotrichum* spp.

Devido à alta plasticidade genética e grande dependência de fatores ambientais, os agentes patogênicos estão sujeitos a constantes mudanças física-morfológicas e no comportamento patogênico (Michereff, 2000). Além disso, o uso da especificidade hospedeira para propósito de identificação pode levar o pesquisador a negligenciar a diferença genética, altamente relevante, especialmente em relação a isolados do agente da antracnose, uma vez que táxons, como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola* e outros, podem infectar uma ampla variedade de plantas hospedeiras (Sutton, 1992). Todavia, a identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* tem se baseado principalmente nas diferenças das características morfológicas, tais como cor das colônias, tamanho e forma dos conídios e apressórios, temperatura ideal para o crescimento, taxa de crescimento, presença ou ausência de cerdas e existência do teleomorfo *Glomerella* (Baxter *et al.*, 1983; Sutton, 1992). Porém, as distinções entre espécies de *Colletotrichum* baseadas nessas características atualmente é confusa, necessitando de informações detalhadas sobre determinado isolado fitopatogênico.

No trabalho realizado por Bueno *et al.* (2005) foi constatada a variabilidade morfológica de conídios de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* isolados de pimentão, pimenta e jiló. Os autores relataram distinções significativas nas dimensões e formato de conídios produzidos por um isolado monospórico por causa das condições de cultivo

(substrato, temperatura e fonte de luz). Portanto, foi constatado que essas duas espécies não podem ser distinguidas unicamente com base no tamanho e formato dos conídios. Com isso, os cultivos dos isolados em meios artificiais, visando à identificação em nível de espécie, neste complexo grupo do *Colletotrichum* ressaltam a falta de informações nos estudos realizados com caráter de identificar espécies somente com as características morfológicas e culturais (Sutton, 1992; Bezerra e Menezes, 2007; Tozze Júnior e Massola Júnior, 2007). Além disso, os marcadores moleculares estão sendo, atualmente, ferramentas importantíssimas no auxílio da identificação de espécies de *Colletotrichum* (Talhinhas *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2007).

Devido à taxonomia de *Colletotrichum* ser confusa, tanto para as espécies anamórficas quanto para as teleomórficas (*Glomerella*), o uso combinado de ferramentas moleculares com as técnicas morfológicas tradicionais é, atualmente, uma abordagem adequada para o estudo de complexos de espécies de *Colletotrichum* (Pilleggi *et al.*, 2009). O uso de marcadores moleculares tem facilitado a caracterização e diferenciação genética entre indivíduos e populações de *Colletotrichum* (Rojas-Martínez *et al.*, 2008; Barguil *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010; Torres-calzada *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Assis *et al.*, 2013). Contudo, alguns estudos demonstram contradições entre critérios morfológicos e moleculares para identificação de espécies desse gênero (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2011), assim, são necessários mais estudos para aperfeiçoar a identificação pelo uso combinado das técnicas moleculares com as morfológicas tradicionais.

Atualmente, diversos marcadores moleculares têm sido utilizados, os quais permitem uma ampla caracterização do polimorfismo genético existente em diferentes espécies de *Colletotrichum*. As técnicas que utilizam marcadores de DNA são mais competentes para a caracterização de isolados e suas populações, pois mostram diretamente a diferença genética, não estando sujeitas a influências do ambiente, nem sofrendo variações em função do estágio de desenvolvimento do organismo ou do tipo de tecido utilizado (Puterka *et al.*, 1993). Assim, os marcadores moleculares são úteis na avaliação de níveis de diversidade genética e relações filogenéticas intra e interespecíficas e também para caracterizar linhagens (Martin e Figueres, 1999). Além disso, técnicas que utilizam ferramentas moleculares propiciaram grandes avanços na taxonomia e na caracterização de fungos fitopatogênicos.

Nos últimos anos, diferentes técnicas de genotipagem têm sido utilizadas para resolver problemas taxonômicos tais como: RFLP (*Restriction Fragment Length*

Polymorphism ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo por Comprimento de Fragmento Amplificado) (Louws *et al.*, 1999; Soll, 2000). Estas técnicas levam em consideração as informações distribuídas em todo o genoma de um organismo e geralmente permitem discriminá-los em nível de espécies e raças. A técnica de PCR (criada na década de 80) foi disseminada nos vários campos da biologia (Mullis e Faloona, 1987; White *et al.*, 1989).

Os genes do DNA que codificam o RNA ribossômico (genes 18S, 5,8S e 28S) apresentam-se em grupo. Internamente os genes 18S, 5,8S e 28S são separados por duas regiões chamadas de ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer* ou Espaçador Interno Transcrito), estas são transcritas e modificadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. Esse grupo gênico aparece repetido centenas de vezes no genoma fúngico, separados por espaços intergênicos não transcritos (IGS). Esses grupos apresentam algumas regiões bem conservadas e outras variáveis, com isso tem-se possibilitado a análise de variação de distintos níveis taxonômicos (Hibbet, 1992; Ganley e Scott, 2002; Zaha *et al.*, 2003).

A região 18S é a mais conservada e é apontada para comparação de organismos que encontram-se relacionados com certas distâncias e a região 28S é mais variável, é indicada para comparar diferentes gêneros ou diferentes espécies (White *et al.*, 1990). A partir de DNA total extraído de tecidos congelados de *Livistona chinensis*, Guo *et al.* (2001) sequenciaram fragmentos amplificados, com iniciadores universal e específico para fungo (do gene 5,8S e das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 do rDNA). Análises filogenéticas com máxima parcimônia e consulta ao GenBank e EMBL, indicaram que seis sequências clonadas tinham origens distintas e cinco sequências (P1-9, P2-6, P4-4, P4-5 e P4-7) eram de fungos e a sequência P3-2, pertencia a plantas.

Entre espécies fúngicas, sequências de DNA frequentemente mostram polimorfismo. A região ITS do rDNA são promissoras para a diferenciação de uma espécie e exclusão das demais (Bueno, 2005). Inúmeros oligonucleotídeos foram criados como espécie-específico, usando como referência as sequências de nucleotídeos da região ITS do rDNA, e podem ser utilizados a técnica de PCR para identificação de espécies de *Colletotrichum* (Munaut *et al.*, 2002). Foram identificados alguns pares de oligonucleotídeos, CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4 para a identificação e diferenciação de

espécies de *Colletotrichum*, tais quais, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (Mills *et al.*, 1992; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996b). Os pares de oligonucleotídeos CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4 já foram utilizados em estudos que objetivaram a identificação de espécies de *Colletotrichum* de diversos hospedeiros: mamoeiro (*Carica* sp.), pessegueiro (*Prunus* sp.), maracujazeiro (*Passiflora* sp.), amendoeira (*Terminalia* sp.), abacateiro (*Persea* sp.), mangueira (*Mangifera* sp.), goiabeira (*Psidium* sp.) e morangueiro (*Fragaria* sp.). Há pares de oligonucleotídeos específicos Cc1NF1/Cc2NR1 para *C. coccodes* e pares de oligonucleotídeos específicos CcInt/ITS4 para *C. capsici* (Brown *et al.*, 1995; Adaskaveg e Hartin, 1997; Peres *et al.*, 2002; Cullen *et al.*, 2002; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Tozze Júnior *et al.*, 2004; Bueno, 2005; Andrade *et al.*, 2007).

O sequenciamento de genes conservados seguindo a filogenia multilocus é atualmente a técnica mais utilizada, pois compara espécime-tipo e linhagens mais estreitamente relacionadas promovendo melhor entendimento do relacionamento dentro do gênero *Colletotrichum* (Cai *et al.*, 2009; Damm *et al.*, 2012). Além da região ITS, vários outros genes vem sendo utilizados nas análises multilocus para identificação de espécies de *Colletotrichum* estreitamente relacionadas dentro de complexos de espécies, como ACT (actina), tub 2 (β -tubulina), CAL (calmodulina), GS (glutamina sintetase), Quitina sintase (CHS-1) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (Prihastuti *et al.*, 2009; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012).

2.5. Controle da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum*)

No Brasil, não existe produto químico registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da antracnose na cebolinha. Mas existe uma vertente, citada no site da Agrofit (www.agricultura.gov.br, 2015), conforme Portaria nº 10 (08.03.85)/ D.O.U. (14.03.85), Portaria nº 685 (27.08.98)/ D.O.U. (28.08.98), republicada em (24.09.98), Resolução - RE nº 347 (16.12.02)/ D.O.U. (31.12.02), aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites Máximos de Tolerância para Contaminantes Inorgânicos". Atualizado de acordo com as monografias de produtos agrotóxicos da ANVISA no dia 01/12/2005, respaldando a aplicação na parte aérea da cultura de qualquer hortaliça, incluindo a cultura da

cebolinha, os defensivos hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre, óxido cuproso e sulfato de cobre (Agrofit, 2015). Em relação a estudo sobre controle biológico, não foi encontrado trabalhos abordando esse patossistema. O mesmo também pode ser estendido para o controle alternativo com produtos derivados de vegetais.

2.6. Controle alternativo de fitopatógenos utilizando produtos derivados de vegetais

A maioria dos estudos envolvendo derivados de produtos vegetais no controle de doenças de plantas é em nível de laboratório. Estudos realizados por Celoto *et al.* (2011) resultaram em 71% de inibição do crescimento micelial e em 100% na germinação dos conídios de *C. musae* utilizando extrato aquoso proveniente de folhas e ramos de melão de São Caetano (*Mormodica charantia* L.). Venturoso *et al.* (2011) constataram inibição de 100% do crescimento micelial de diversos fungos entre eles *Colletotrichum* sp. utilizando extrato de cravo da índia (*Syzygium aromaticum* L. Merr. e L.M. Perry). Rozwalka *et al.* (2008) mencionam que o extrato aquoso e o óleo essencial de cravo da índia inibiram em 100% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado de goiabeira (*Psidium guajava* L.) no período de pós-colheita.

Shafique *et al.* (2007) verificaram que o extrato aquoso de folhas de cinamomo (*Melia azedarach* L.) reduziram a incidência de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl de 53% para 37%. Kuhn *et al.* (2006) observaram total inibição do crescimento de *Xanthomonas* sp. proveniente de *Maniva* sp., quando submetida ao extrato de açafrão da terra (*Curcuma longa* L.). Estudos realizados por Shafique *et al.* (2005) mostraram a eficiência de 100% no controle de patógenos ao desinfetar sementes de milho durante 20 minutos com o extrato vegetal de cinamomo. Bonaldo *et al.* (2004) verificaram que o extrato bruto aquoso de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook) inibiu 75% da germinação de conídios de *C. lagenarium* (Pass.) Ell. e Halst., agente causal da antracnose em pepino (*Cucumis sativus* L.).

Incipientes são estudos que abordam controle alternativo de doenças de importância econômica na agricultura, em condições de campo, com produtos vegetais (extratos, óleos e hidrolatos). Dentre eles, o trabalho realizado por Araujo *et al.* (2012) resultaram na redução de 70 % de severidade da mancha púrpura em cebolinha, causada por *A. porri*, quando aplicado extrato de *Ulva fasciata*; Rodrigues *et al.* (2007)

avaliaram o efeito do extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e concluíram que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação de mecanismos de defesa da planta. É importante ressaltar que os crescentes esforços e estudos que buscam a inserção de meios alternativos de controle no manejo de enfermidades são intermitentes.

2.7. Pimenta longa (*Piper aduncum* L.) como biodefensivo agrícola

Piper aduncum L., conhecida como pimenta longa ou pimenta de macaco, pertence à família Piperaceae (Lorenzi e Matos, 2008), nativa da Amazônia, bem adaptada aos solos pobres da região (Fazonlin *et al.*, 2006). A espécie contém diversos compostos secundários como o éter fenílico, dilapiol, terpinen-4-ol, piperitone, pineno, termineno, linal, terpinol, safrol, miceno e cardinal. Contudo, o dilapiol é a principal substância encontrada no óleo desta Piperaceae, cujo teor depende da variedade da espécie, sendo que a concentração pode variar de 31% a 97% em relação aos outras substâncias presentes nessa família (Maia, 1998). Não obstante, é uma das espécies vegetais que vem despertando interesse sobre seus efeitos nas áreas médica e agrícola, direcionada no controle de pragas e patógenos, pois tem apresentado ação inseticida, acaricida, nematicida, bactericida e fungicida (Bastos, 2011).

Alguns estudos realizados com óleo essencial apresentaram resultados promissores na inibição de crescimento micelial. Bastos e Silva (2002), Bastos e Poltronieri (2005) e Bastos e Benchimol (2006) relataram 100% de inibição no crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* spp. isolados de diversas espécies de plantas, como gravioleira (*Annona muricata* L.), bastão do imperador (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith), maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), bananeiras (*Musa* sp.) e pimenteira (*Piper* sp.). Em outro trabalho, Bastos e Albuquerque (2004) constataram que o melhor resultado de controle da podridão dos frutos de *Musa* sp., causada por *C. musae*, foi obtido com o óleo na concentração de 1%, semelhante ao resultado obtido com fungicida benomil. Por meio de análises fotoquímicas, Orjaba *et al.* (1989) identificaram C-glicosilflavonas, propiofenonas e derivados de ácido benzoico, do óleo essencial da pimenta longa, como prováveis substâncias com ação antimicrobiana.

2.8. Importância econômica e potencial de pau rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), casca preciosa (*Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez.) e Macacaporanga (*Aniba parviflora* Ducke) no controle de micro-organismos

Pau rosa (*Aniba rosaeodora* (Ducke), casca preciosa (*Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez.) e Macacaporanga (*Aniba parviflora* Ducke) são árvores da família *Lauraceae*. Nativas da Região Amazônica, amplamente distribuídas nas matas pluviais do interior da Guiana Francesa no leste, ao longo das Guianas, Venezuela e Colômbia até à Amazônia (Oger *et al.*, 1994). Seus derivados vegetais são utilizados como cosméticos, perfumes caseiros e *sprays* para aromatizar ambientes. O óleo essencial puro é usado na odontologia e no tratamento de alergias. As folhas são utilizadas pelas lavadeiras à beira dos rios da Amazônia, para a última água de enxágue das roupas, o que lhe confere um aroma especial de limpeza (Oger *et al.*, 1994).

A madeira de pau rosa possui aroma que lembra a rosas e o óleo essencial é constituído na maior parte por linalol. Análises do óleo essencial mostraram que o linalol apresenta em alta concentração na madeira (85%) e nas folhas (81%). Este e seus ésteres, como o acetato de linalila são matérias odoríferas de cheiro intenso e agradável. O óleo é bastante usado em perfumaria para produtos de fragrâncias florais e pode ser aplicado em detergentes e sabões. Desde o início do século XX a indústria de perfumaria e cosméticos vem utilizando este óleo, que hoje é vendido por US\$80 kg⁻¹, sendo os principais compradores do óleo os Estados Unidos e Europa. Podemos citar empresas como a francesa Chanel, que utiliza o óleo na produção dos seus perfumes (Hydrosols, 2014).

O óleo essencial além de ser utilizado na perfumaria, também, tem sido alvo de pesquisas para controlar diferentes micro-organismos (fungos e bactérias) de interesse médico e causadores de doenças de plantas (Hammer *et al.*, 1999; Simic *et al.*, 2004; Scorzoni *et al.*, 2007). Estudos realizados por Souza *et al.* (2007) constataram óbitos de todas as larvas de *Artemia franciscana* Kellogg, em 10 minutos após a aplicação do óleo essencial e hidrolato de pau rosa na concentração de 25% e 50%, respectivamente.

A árvore de casca preciosa fornece madeira de ótima qualidade, apropriada para mobiliário e construção civil e as suas cascas e folhas são muito utilizadas na medicina popular (Silva, 1997). O chá das cascas e folhas é empregada contra o artrite, esgotamento nervoso como redutora da albumina do sangue, para hidropsia, catarro crônico, sífilis, leucorréia, aerofagia, males do coração e para amenizar a dor após a

extração de dentes, sendo ainda considerado anti-anêmico, anti-espasmódico, digestivo, eupéptico e estimulante (Silva, 1997). Já o óleo essencial é usado contra acnes, dermatites, febre, infecções diversas e ferimentos (Mors *et al.*, 2000). Possíveis aplicações em cosméticos são sugeridas pelo seu uso etnobotânico (Maia *et al.*, 2000). Devido ao aroma de canela é usado como condimento (Mors *et al.*, 2000). O odor do óleo essencial da preciosa, semelhante ao da canela, fez com expedições portuguesas e espanholas, após o descobrimento do Brasil, penetrassem na região amazônica em busca dessa especiaria (Silva, 1997).

Os tecidos vegetais possuem composição de eugenol, linalol, metileugenol, anabasina, anibina e tanino (Lorenzi e Matos, 2008). O principal componente do óleo essencial, tanto do tronco quanto das folhas de *A. canelilla* é o 1-nitro-2-feniletano, uma molécula rara em produtos naturais, derivada da fenilalanina. O óleo da madeira apresenta rendimento de 0,7-1,0% e consistem de eugenol (5%), metil eugenol (15%) e 1-nitro-2-feniletano (80%) (Maia *et al.*, 2000). A análise de cromatografia do óleo essencial das folhas apresentou a seguinte composição química: α -pineno, β -pineno, β -felandreno, β -cariofileno, β -sesquifelandreno, p-cimeno, linalol, 1-nitro-2-feniletano, α -copaeno e espatulenol (Maia *et al.*, 2000; Lorenzi e Matos, 2008). Sesquiterpenos no óleo essencial das folhas, bem como a presença de moléculas precursoras da biossíntese de 1-nitro-2-feniletano como benzonitrila, benzoacetaldéido e benzoacetoneitrila, também foram identificados. O óleo essencial das cascas apresentou os alcalóides benziltetrahydroisoquinolina, tetrahydroprotoberberina, noranicanina, anicanina, canelila, norcanelilina, norcanelilina, canelilina, canelilinoxina (Lorenzi e Matos, 2008; Taveira *et al.*, 2003; Oger *et al.*, 1994). Não foram encontrados na literatura trabalhos que relatem o uso dessa planta no controle de fitopatógenos. Apesar de apresentar em sua composição compostos com ação antimicrobiana como, por exemplo, o componente majoritário do óleo essencial, 1-nitro-2-feniletano altamente tóxica a *Candida albicans* (Robin) Berkhout (Maia *et al.*, 2000).

Análises fitoquímicas realizadas nos tecidos da macacaporanga possuem composição de eugenol, metileugenol, anabasina, anibina, tanino e o linalol (composto majoritário) (Lorenzi e Matos, 2008). No entanto, não há relatos na literatura do uso dessa planta no controle alternativo de doenças na área agrícola. Contudo, seria interessante investigar a ação antimicrobiana dos derivados vegetais de plantas dessa espécie, pois apresenta compostos semelhantes ao do pau rosa e da casca preciosa, na sua composição química.

2.9. Características gerais de óleos essenciais e as principais formas de extração

As substâncias odoríferas em plantas possuem funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (Craveiro *et al.*, 1986; Harbone *et al.*, 1993). Os óleos essenciais também chamados de óleos voláteis são produtos obtidos de partes de plantas através, sobretudo, de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes (Craveiro *et al.*, 1986; Harbone *et al.*, 1993).

A maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de terpenóides ou de fenilpropanóides (Craveiro *et al.*, 1986). Os terpenóides são derivados de unidades do isopreno e os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. Tais compostos são metabólitos secundários que têm a sua origem explicada a partir do metabolismo da glicose (Craveiro *et al.*, 1986; Harbone *et al.*, 1993).

Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como nas flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais sua composição pode variar segundo a localização (Harbone *et al.*, 1993). A composição química dos óleos essenciais pode ser afetada pelas condições ambientais. Já que, um indivíduo cultivado numa região chuvosa pode apresentar composição química diferente de outro indivíduo da mesma espécie cultivado em uma região seca (Simões *et al.*, 2003).

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta de utilização do mesmo, os mais comuns são:

a) *Enfleurage*: é empregado para extrair óleo essencial de pétalas de flores. As pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo período de tempo. Em seguida, essas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para obter-se o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto possui alto valor comercial (Simões *et al.*, 2003).

b) Extração com solventes orgânicos: os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos essenciais. Por isso, os produtos assim obtidos raramente possuem valor comercial (Degani *et al.*, 1998).

c) Extração por CO₂ supercrítico: esse método permite recuperar os aromas naturais de vários tipos de óleos essenciais, bem eficiente. É o método ideal para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação, produto final com alto valor comercial (Degani *et al.*, 1998).

d) Arraste por vapor d'água: para a extração de óleos vegetais é utilizado o princípio da hidrodestilação que consiste em evaporar uma mistura de vapor d'água e componentes voláteis presentes na matéria vegetal, em contato direto com água quente. Para esse procedimento, utiliza-se o aparelho de Clevenger, o qual usa de um sistema de arraste por vapor de água. A água e a planta são aquecidas em um recipiente de fundo redondo sobre uma manta aquecedora, ao atingir o ponto de ebulição, retira o óleo que está entre as células do material vegetal. Junto com os vapores de água, cujos voláteis são direcionados ao condensador que vai para o tubo de resfriamento, para que o óleo seja coletado em um recipiente. Como óleo possui densidade diferente à água, este normalmente fica concentrado sobre a camada de água, podendo ser facilmente separado. Após a separação do óleo, a água residual (hidrolato) (Koketsu e Gonçalves 1991).

O hidrolato é uma solução aquosa (água da destilação), apresenta em sua composição, baixo teor de óleo volátil. Esse baixo teor de óleo é o suficiente para que possa apresentar um forte aroma (Hydrosols, 2014). Segundo Souza *et al.* (2007), os hidrolatos não apresentam importância econômica. As empresas de extração de óleo descartam os hidrolatos diretamente no ambiente, causando danos aos ecossistemas onde essas atividades industriais são realizadas. Estes hidrolatos podem causar problemas ao meio ambiente. Contudo, é interessante investigar se os hidrolatos (produto não explorado) possam ter efeitos no controle da antracnose em cebolinha.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de extratos bruto aquosos de casca preciosa (*Aniba canelilla*) e pimenta longa (*Piper aduncum*), hidrolatos de pau rosa (*A. rosaeodora*), macacaporanga (*A. parviflora*) e pimenta longa, óleo essencial e infusão de pimenta longa no controle da antracnose foliar causada por *Colletotrichum* sp. em cebolinha (*Allium fistulosum*).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar morfológica e molecularmente os isolados de *Colletotrichum* spp.;
- Avaliar o efeito dos produtos derivados de vegetais na inibição da germinação de conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp.;
- Avaliar o efeito dos produtos derivados de vegetais na incidência e severidade da antracnose em cebolinha;
- Estimar o crescimento e o número de folhas da cebolinha sob o efeito dos produtos derivados de vegetais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento e identificação por características morfológicas e molecular dos isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de cebolinha (*Allium fistulosum* L.)

4.1.1. Local de coleta das espécies de *Colletotrichum* spp.

As amostras com lesões de antracnose foliar em cebolinha foram coletadas em sítios de comunidades de produtores rurais dos municípios de Iranduba, Manacapuru e da Estação de Hortaliças do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus (Tabela 1).

Os isolamentos dos fungos foram realizados nas alocações do Laboratório de Fitopatologia do INPA. O isolamento foi por meio do método direto, com ajuda de agulha histológica flambada, massa de conídios representada por pontos de coloração alaranjada e acérvulos na superfície da lesão foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata + Dextrose + Ágar) e incubadas sob luz fluorescente, com fotoperíodo de 12 h em temperatura de 25 ± 2 °C. Após o crescimento das colônias, fragmentos de micélio contendo estruturas do fungo, foram preservados pelo método de Castellani (Alfenas e Mafaiá, 2007). Para isso, cinco discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos para frascos de vidro de 13 mL contendo 5 mL de água destilada estéril. Em seguida, os isolados foram armazenados na Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, registrados como: INPA 1809, INPA 2743, INPA 2770 e INPA 2774.

4.1.2. Obtenção de culturas monospóricas

As culturas monospóricas foram obtidas por meio da retirada de pequenas porções da mucilagem alaranjada de culturas com 10 dias de idade, raspadas com alça de platina e transferidas para um microtubo de 2,0 mL contendo 0,5 mL de água destilada e esterilizada. A partir, de então, foi preparada uma suspensão de conídios na concentração de 400 conídios mL⁻¹, da qual alíquotas de 40 µL foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar-Água (2%). Após 12 h de incubação a 25 °C, a superfície do meio foi observada em microscópio de luz, sob objetiva de 10x. Para cada isolado,

três conídios germinados foram transferidos para as novas placas contendo meio de cultura BDA. Após o crescimento, selecionou-se uma colônia típica do patógeno para preservação e futuros estudos.

4.1.3. Caracterização morfofocultural de isolados de *Colletotrichum* spp.

A caracterização cultural foi realizada cultivando-se os isolados monospóricos de *Colletotrichum* sp. em três meios de cultura BDA, Aveia-agar e Synthetic nutrient-poor-agar (SNA), conforme a metodologia de Leslie e Summerell, (2006). Para a elaboração do meio BDA, ferveu-se 250 g de batata em 1 L de água destilada (até o amolecimento da batata), utilizou-se apenas o caldo (a batata foi descartada), este foi filtrado em peneira de cozinha comum. Após, o caldo foi fracionado, de 1 L para 250 mL de caldo postos em quatro erlenmeyers de capacidade de 500 mL. Nestes, foram acrescentados 5 g de dextrose e 5 g de agar. Os erlenmeyers foram devidamente lacrados e autoclavados por 30 min a 121 °C.

Para a elaboração do meio Aveia, em fogo brando realizou o cozimento de 250 g de flocos de aveia “Quaker”, envolto em gaze (formato de trouxinha), em 1 L de água destilada (sempre completando o volume de água destilada), por duas horas. A gaze contendo flocos de aveia foi descartada e o caldo foi acrescido 20 g de agar, distribuído em erlenmeyers e autoclavados por 30 min a 121 °C.

Para a elaboração do meio SNA, utilizou-se 1 L de água destilada e acrescentou 20 g de agar; 0,20 g de sacarose; 0,20 g de glicose; 0,50 g de KCl; 0,50 g de MgSO₄.7H₂O; 1 g de KNO₃; 1 g de KH₂PO₄. O meio foi distribuído em erlenmeyers e autoclavados por 30 min a 121 °C.

Foi avaliado o crescimento micelial, a formação de setores, topografia, coloração da colônia, tipo de micélio, esporulação, coloração dos esporos e a presença ou ausência de acérvulos com ou sem setas.

a. Crescimento micelial em diferentes meios de cultura

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado esquema fatorial (4 x 3) quatro isolados (INPA 1809, INPA 2743, INPA 2770 e INPA 2774) por três meios de culturas (BDA, Aveia e SNA). Cada tratamento foi composto de cinco repetições, sendo cada placa de Petri constituindo uma unidade experimental. A avaliação foi feita medindo-se diariamente o tamanho da colônia, nos dois sentidos perpendiculares da placa, durante sete dias. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado utilizando a fórmula de Maguire (1962) adaptada por Oliveira (1991): $IVCM = \Sigma(D-Da)/N$, em que IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial da colônia, D = diâmetro médio atual da colônia, Da = diâmetro médio do dia anterior da colônia e N = número de dias após a inoculação.

Discos de micélio de cinco milímetros de diâmetro das colônias, cultivadas por 7 dias em meio de BDA, foram transferidas para placas de Petri descartáveis de oito centímetros de diâmetro contendo seus respectivos meios de cultura. Após a repicagem, as placas foram mantidas em fotoperíodo de 12 h, à temperatura de 25 ± 2 °C, para o desenvolvimento dos isolados. Após 48 h, foi realizada a mensuração diária do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, com auxílio de paquímetro milimetrado. As avaliações foram encerradas quando um dos isolados atingiu a borda da placa.

Os dados obtidos foram submetidos análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software ASSISTAT 7.7 beta (Assistat, 2015).

b. Formação de setores, topografia e coloração da colônia

A descrição da formação de setores, topografia e coloração da colônia foi realizada ao final do experimento. Os setores foram descritos por meio de visualização como presentes ou ausentes. Já a topografia das colônias foi descrita através da visualização da colônia micelial, observando-se as principais características do crescimento micelial. Para caracterização da coloração da colônia utilizou-se a Carta de Munsell. Presença e ausência de acérvulos e de setas nas colônias, também foram observadas.

c. Esporulação em diferentes meios de cultura

A quantificação da esporulação foi realizada ao final do ensaio de crescimento micelial, utilizando-se as mesmas colônias do ensaio com oito dias de idade. Para o preparo da suspensão de conídios, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, para facilitar a remoção dos conídios da colônia. Com auxílio da alça de Drigalsky, o material foi removido e filtrado em duas camadas de gaze. A concentração da suspensão de conídios foi determinada em câmara de Neubauer. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado esquema fatorial (4 x 3) quatro isolados (INPA 1809, INPA 2743, INPA 2770 e INPA 2774) e três meios de cultura (BDA, Aveia e SNA). Cada tratamento foi composto de cinco repetições, sendo cada placa constituindo uma unidade experimental e de cada placa foram realizadas 10 leituras em câmara de Neubauer. A média da concentração da suspensão de conídios das 10 leituras correspondia a uma repetição. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software ASSISTAT 7.7 beta (Assistat, 2015).

d. Preparo de lâminas semipermanentes para estudo de morfometria de conídios e apressórios

O preparo de lâminas para visualização de conídios e apressórios foi realizado através do método de microcultura, segundo metodologia sugerida por Cai *et al.* (2009). Fragmentos de meio BDA de 10 mm³ foram colocados no centro de uma placa de Petri de poliestireno estéril. Uma gota da suspensão de conídios foi pipetada sobre o fragmento, sobre o qual uma lamínula flambada e esfriada foi inserida. Pequenos chumaços de algodão embebidos em água destilada esteril foram colocados nos bordos da placa, promovendo-se uma câmara úmida. O conjunto foi mantido em condições padronizadas de temperatura (25 °C) e fotoperíodo de 12 h, no interior de BOD, por oito dias. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e colocadas sobre lâminas para microscopia contendo uma gota de lactoglicerol. As lâminas foram vedadas com esmalte e guardadas em estojo de lâmina para determinação da morfometria de conídios

e apressórios. As microculturas foram preparadas a partir das culturas monospóricas de cada isolado. Após o período de incubação, mediram-se 30 conídios e 30 apressórios por isolado. As medições foram em objetiva de 100x, realizadas em Microscópio tipo Zeiss Axio Imager M.2 acoplado à câmara digital AxioCam MRc, acoplado a um computador com Software Axiovision Rel. 4.6, que permitiu captar, medir e fotografar imagem observada no microscópio.

As características dos conídios e apressórios foram descritas visualmente (formato e coloração) e analisado o tamanho (comprimento e largura). Para a caracterização do apressório, utilizou-se a metodologia Sutton (1980), para fins comparativos de formas de apressórios de *Colletotrichum* spp. (Figura 1).



Figura 1- Formas de apressórios utilizados para classificação: 1. Lobados; 2. Levemente lobados; 3. Arredondados (Adaptado de Cox e Irwin, 1988; Sutton, 1980)

4.1.4. Caracterização molecular

Foram repicadas culturas monospóricas (isolados: INPA 1809, 2743, 2770 e 2774) em placas de poliestireno, contendo BDA em mantidas em BOD, com temperatura de 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h, por 10 dias. As colônias foram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no Município de Manaus/AM, para a identificação das espécies.

a. Preparo do tampão de extração

Foi utilizado o CTAB 2x como tampão de extração. Para a elaboração do tampão foram misturados 5 mL da solução estoque CTAB 10%; 3,5 mL da solução estoque NaCl 5 M; 0,5 mL da solução estoque EDTA 0,5 M, pH 8; 2,5 mL da solução estoque Tris-Base 1 M, pH 8. Os reagentes foram misturados em vortex no interior de tubo Falcon. Após, adicionou-se 0,5 mL de β -mercaptoetanol e completou-se o volume

para 25 mL com água Mili-Q autoclavada. O tampão inserido no tubo de Falcon foi posto em banho Maria por 30 min, a 65 °C.

b.Extração, quantificação e diluição do DNA

O DNA foi extraído pelo método CTAB conforme o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1987). Após o crescimento dos isolados em meio de BDA, discos de inóculo contendo micélio foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido de BD (Batata + Dextrose) para a obtenção da massa micelial. Os erlenmeyers com as culturas de cada isolado monospórico foram colocados sob mesa agitadora. Após sete dias sob agitação de 120 rpm, a massa micelial foi filtrada por meio de coador de papel pequeno (Melitta®) estéril e desidratada em estufa a 45 °C em *overnight*. Depois de seco, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de cadinho e pistilo de porcelana. O pó resultante da maceração foi transferido para microtubos de 2 mL. Os tubos foram identificados e dispostos em *rack* para a extração de DNA.

Em seguida, uma solução de 600 µL de tampão CTAB 2x (2% brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB: Sigma H-5882); 1,4 M NaCl; 0,2% 2-mercaptoetanol; 20 mM EDTA (ácido etilonoamino tetra-acético), 100 mM Tris- HCl, pH 8.0 + β-mercaptoetanol (2%) foi adicionada nos microtubos. A amostra foi mantida por 30 min a 65 °C e a cada 10 min homogeneizada. Na sequência adicionou-se 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e inverteu-se varias vezes por um minuto, seguida por 5 min de centrifugação a 14.000 rpm (4°C), com a observação da fase superior transparente. Transferiu-se 360 µL do sobrenadante para novos tubos de Falcon, no qual adicionou-se 0,9x o volume de isopropanol (cerca de 324 µL). As amostras foram levadas para o freezer por 15 min a -20 °C, seguida por 10 min de centrifugação a 14.000 rpm. O isopropanol foi descartado e lavou-se o *pellet* com 1 mL de etanol 70% por duas vezes e, em seguida, lavado com 1 mL de etanol absoluto durante 3 min. O etanol foi descartado e os tubos Falcon ficaram abertos e de boca para baixo sobre papel toalha dentro da câmara de fluxo laminar, por aproximadamente uma hora, com finalidade de secar o *pellet*.

Os DNAs precipitados foram ressuspensos em 1 mL de tampão TE contendo de RNase A (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg µL⁻¹ RNase A) e incubados em banho maria a 37 °C por 30 min. A quantificação foi feita em

espectrofotômetro Nanodrop e eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado no Sistema de Fotodocumentação L-Pix Chemi. As amostras foram diluídas em água ultrapura até a concentração de 50 ng DNA/ μ L de suspensão e armazenadas sob temperatura de -20 °C.

c. Identificação molecular de *Colletotrichum* spp.

A identificação das espécies de *Colletotrichum* foi realizada por meio da amplificação e sequenciamento dos fragmentos de actina (ACT), quitina sintase (CHS), calmodulina (CAL), de quatro isolados selecionados previamente, com a utilização dos *primers* listados na Tabela 2. As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 μ l, contendo tampão da enzima 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs, 0,06 U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada primer, 50 ng do DNA e água milli-Q (q.s.p.).

As PCRs foram incubadas em termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, nas seguintes condições: ciclo inicial com desnaturação 31 de 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, temperatura de anelamento de 60 °C para ACT, CAL e CHS; 67 °C GAPDH por 30 seg, 72 °C por 1 min, com um ciclo final de 72 °C por 7 min e 10 °C para manutenção. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose (1,5%) e em seguida, purificados e sequenciados no Sequenciador de DNA 3500 GENETIC ANALYZER. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com auxílio do programa SeqAssem (Herppele, 2012) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do *National Center for Biotechnological Information*- NCBI, por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), o qual permite detectar homologia de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes.

Tabela 1: Lista de *primers* utilizados para o sequenciamento

Região	Sigla/ Orientação	Primer 5'-3'	Referência
Actina	ACT512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	Carbone e Kohn(1999)
	ACT783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT'	
Quitina sintase	CHS-79-F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	Carbone e Kohn(1999)
	CHS-345-R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	
Calmodulina	CAL 228 F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	Carbone e Kohn(1999)
	CAL 737 R	CATCTTTCTGGCCATCATGG	

4.2. Elaboração de Hidrolatos (HID), Extrato Bruto Aquoso (EBA), Óleo Essencial (OE) e Infusão (IN)

a. Local de coleta

Folhas frescas de plantas de pimenta longa com idade aproximadamente de dois anos foram utilizadas para extração e preparação de OE, HID, EBA, IN. As plantas foram coletadas no INPA/Campus III (S 03° 05' 28,6''/ W 59° 59' 35,0''), depósito 10.480, no Herbário EAFM do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus - Zona Leste. Casca e folhas frescas das plantas de preciosa foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke- RFAD no município de Manaus, AM, para o preparo de EBA. Enquanto que de macacaporanga foram coletadas folhas frescas para a extração do OE e HID na Fazenda PEMATEC localizada no município de Santarém, PA. Já galhos finos e folhas frescas de pau rosa para preparação de HID (doador), foram coletados na Estação Experimental de Silvicultura do INPA, município de Manaus, AM.

b. Produção do Óleo Essencial (OE) e Hidrolatos (HID) de Pimenta longa e Macacaporanga

Folhas frescas de pimenta longa e macacaporanga foram trituradas em liquidificador comum (Mundial Power, 400W), no laboratório de Fitopatologia do INPA, e acondicionadas em sacos de poliestireno (contendo 100 g de folhas trituradas cada). O material foi transportado para o Laboratório de Química da Universidade do Estado do Amazonas – UEA para a obtenção dos óleos e hidrolatos.

Conforme mencionada por Koketsu e Gonçalves (1991) utilizou-se a metodologia de arraste a vapor. Para isso foi utilizado o aparelho Clevenger, onde a mistura de 100 g de folhas frescas e moídas para 1 L de água foi depositada. Os OEs extraídos foram acondicionados em frasco de cor âmbar, selado hermeticamente e preservados a 8 °C em refrigerador.

c. Produção de Extrato Bruto Aquoso (EBA) de Pimenta longa e Casca Preciosa

As folhas de pimenta longa e as casca da preciosa foram submetidas ao processo de desidratação em estufa a 50 °C por 48 horas e trituradas em moinho de facas no prédio da antiga Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas do INPA.

Para a elaboração de EBA de pimenta longa e da casca de preciosa, 200 g de folhas foram imersas em 800 mL de água destilada, mantidas por 24 h em um recipiente escuro, em temperatura ambiente. Após esse período, as folhas foram separadas da parte líquida com auxílio de uma peneira comum (tamanho da tela de 2 x 2 mm) e, na sequência, a parte aquosa foi filtrada em gaze, para a retenção de partículas menores. Os resíduos foram descartados.

d. Produção de Infusão (IN) de Pimenta longa

Foram utilizadas 200 g de folhas frescas de pimenta longa e imersas em 800 mL de água destilada aquecida a 70 °C, mantida por 3 h em um recipiente escuro e fechado, em temperatura ambiente. Após esse período, as folhas foram separadas da parte líquida com auxílio de peneira comum. As folhas foram descartadas e a parte aquosa foi filtrada em gaze, para a retenção de partículas menores.

e. Esterilização dos produtos derivados de vegetais

O óleo de pimenta longa foi previamente diluído com Tween 0,5%, com auxílio de Becker de vidro de 20 mL e uma pipeta volumétrica (para facilitar a homogeneização da solução), foram diluídos 2 mg mL⁻¹ do óleo em 1 mL de Tween 0,5%.

A esterilização dos hidrolatos, extrato bruto aquoso, infusão e o óleo (previamente diluído com Tween 0,5%) foram realizados em câmara de fluxo laminar, por filtração a vácuo utilizando membranas Millipore® de 0,45 µm e, posterior, a de 0,22 µm, para garantir a integridade dos produtos esterilizados.

4.3. Efeito dos produtos derivados de vegetais quanto à inibição de germinação de

conídios de quatro isolados de *Colletotrichum* spp.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia, da Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde – SAS - INPA e nos Laboratórios do Grupo de Pesquisa Química Aplicada a Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, em Manaus-AM.

O delineamento experimental foi em esquema fatorial (4 x 4 x 7), constituído de quatro isolados, quatro concentrações (0, 10, 20, 30%) e sete produtos derivados de vegetais (HID de pimenta longa, pau rosa, macacaporanga, EBA de casca preciosa, pimenta longa, OE e infusão de pimenta longa) com três repetições, sendo cada recipiente (poço) da placa de teste de ELISA considerada uma unidade experimental.

Inicialmente as colônias monospóricas (INPA 1809, INPA 2743, INPA 2770, INPA 2774), foram repicadas em placa de Petri (nove centímetros de diâmetro) contendo meio de cultura BDA, mantidas por 15 dias, sob fotoperíodo de 12 h, em temperatura ambiente. Após o período de incubação foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa para facilitar a remoção dos conídios da colônia. Com auxílio de uma alça de Drigalsky o material foi removido e filtrado em duas camadas de gazes. Em seguida, foi determinada em câmara de Neubauer uma suspensão na concentração de $4,5 \times 10^6$ conídios mL⁻¹.

Uma alíquota de 15 µl de BD (batata + dextrose), 20 µl de suspensão de conídios, 15 µl de cada concentração (0, 10, 20, 30 %) de HID de pimenta longa, pau rosa, macacaporanga, EBA de casca preciosa, pimenta longa, OE e IN de pimenta longa foram individualmente misturadas e depositadas em cada um dos recipientes (“poço”) de uma placa usada em teste de ELISA (Regente *et al.*, 1997), para a testemunha foi utilizada apenas água destilada esterilizada. A placa foi mantida em BOD, sob fotoperíodo de 12 h a 25 °C. Após 24 h acrescentou-se 30 µl de lactofenol, para paralisar a germinação.

A avaliação foi realizada através do microscópio óptico com aumento de 400x. Computou-se 100 conídios por cada unidade experimental, considerando como conídios germinados aqueles que apresentaram emissão do tubo germinativo com o dobro do tamanho do conídio. Para avaliação, os conídios germinados foram somados com os conídios não germinados (Nesp), obtendo-se o total de conídios (TC) por cada unidade experimental. Calculou-se a percentagem de não germinação ($Nesp \times 100/TC$).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as

médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software ASSISTAT 7.7 beta (Assistat, 2015).

4.4. Efeito dos produtos derivados de vegetais na incidência e severidade da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.), causado por *Colletotrichum* sp.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e Estação Experimental de Hortaliças do INPA, em Manaus-AM. No período entre os meses de julho a dezembro de 2014. Canteiros a céu aberto com solo tipo arenoso foram preparados para condução do experimento. As análises analíticas do solo, anexo 1, foram realizados pelo Laboratório de Análises de Solos e Plantas- LASP da Embrapa Ocidental.

As mudas de cebolinha (cultivar: Todo Ano) foram adquiridas na feira da comunidade japonesa, localizada na Zona Sul de Manaus. As mudas foram plantadas no espaçamento de 30 x 15 cm e o sistema de irrigação foi por aspersão. As adubações foram efetuadas um mês antes do plantio com esterco de aves não curtido. Toda semana foi realizado o controle de ervas daninhas por capina e arranquio manual.

Foram utilizados três canteiros de 1,50 m x 4,50 m cada, onde foram plantadas 255 mudas de cebolinha. Dessas 255 mudas plantadas, foram consideradas como plantas úteis apenas as 72 centrais e as demais fizeram parte da bordadura (Figura 2 e 3).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com oito tratamentos: T1 (EBA de casca preciosa), T2 (IN de pimenta longa), T3 (HID de pau rosa), T4 (HID de macacaporanga) T5 (OE de pimenta longa), T6 (HID pimenta longa), T7 (EBA de pimenta longa) e T8 (testemunha - água); com nove repetições por tratamento, sendo considerada cada touceira uma unidade experimental.

A inoculação do *Colletotrichum* sp. ocorreu naturalmente e folhas com sintomas da doença (Figuras 4, 5 e 6) foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia do INPA, para isolamento e posterior identificação morfológica e molecular. O material foi depositado na Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, o qual recebeu o número de registo INPA 2770.

Os produtos derivados de vegetais foram previamente diluídos em água destilada e aplicados na concentração de 30%, exceto a testemunha que foi aplicada somente água

estéril. As aplicações ocorreram semanalmente, em toda parte aérea da planta, por meio do pulverizador com pressão prévia (TRAPP®) durante 50 dias, totalizando sete aplicações. É importante ressaltar que a primeira aplicação ocorreu uma semana antes do surgimento dos sintomas da doença.

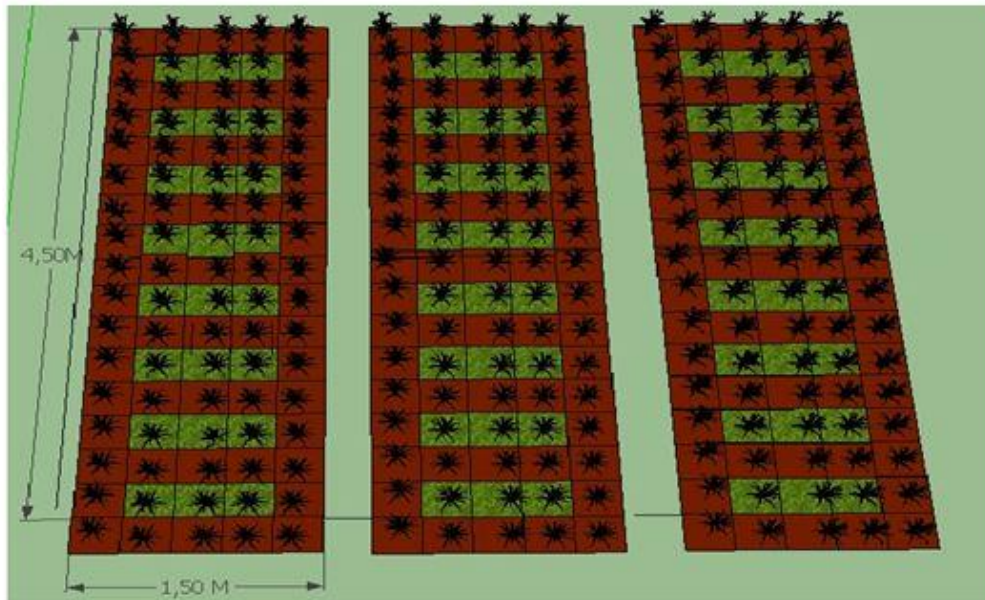


Figura 2: Croqui da distribuição do experimento para o plantio das mudas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.). As plantas úteis localizadas no centro do experimento (parte verde) e a bordadura (parte marrom).



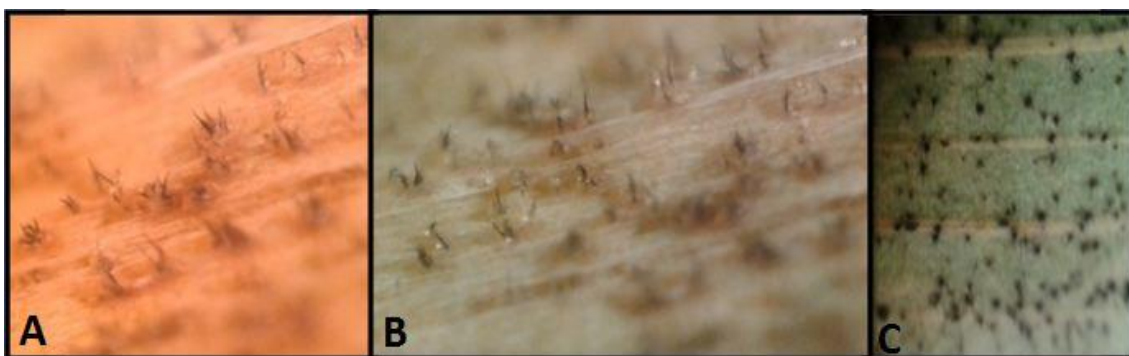
Figura 3: Fig.A e B- Manejo do solo e preparo dos canteiros; Fig. C e D- Plantio de mudas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.)



Figura 4: Fig.A, B, C, D e E- Sintomas da antracnose em plantas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) causado por *Colletotrichum* sp.



Figuras 5: Fig.A, B, C- Sintomas da antracnose em folhas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) causado por *Colletotrichum* sp.; Fig.D, E- Presença de acervúlos



Figuras 6: Fig.A, B, C- Acervúlos com setas de *Colletotrichum* sp. em folhas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.), **Fig.A e B-** isolado INPA 2770 e **Fig.C-** isolado INPA 2774

a. Avaliação da incidência e severidade da antracnose foliar em cebolinha

Após a detecção dos sintomas da doença e a comprovação da etiologia do patógeno, deu-se início a primeira avaliação das folhas de cebolinha. Para a avaliação, foram observados os sintomas da doença e sinais do patógeno nas folhas, por meio, de uma lupa de lente bifocal 3"/75 mm (Magnifer®). As folhas foram computadas, levando em consideração presença (+) e ausência (-) dos sintomas e marcadas com pincel permanente preto indicando incidência da doença (+) e com azul indicando a ausência da doença (-), esse procedimento foi realizado para que não houvesse repetições de avaliações na mesma folha. A incidência e a severidade da doença foram avaliadas, semanalmente, por 50 dias, conforme a Tabela 1 e 2. Para incidência todas as folhas foram avaliadas enquanto que a severidade apenas as três folhas centrais.

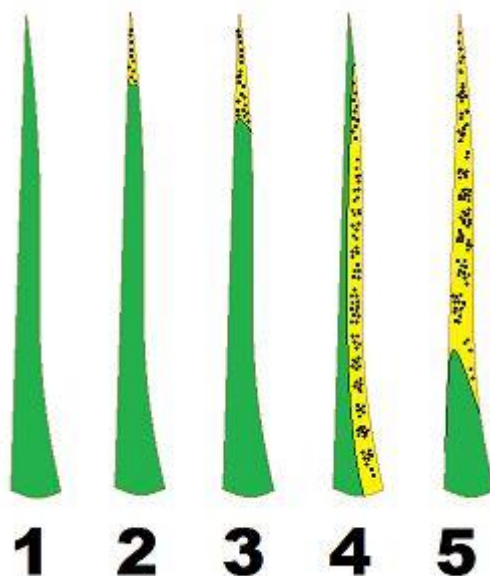
Os dados da incidência da doença na planta ($Y_p =$ planta) e da severidade nas folhas centrais ($Y_f =$ folhas centrais) foram usados para calcular as áreas abaixo da curva de progresso da doença, AACPDp e AACPDF, respectivamente. Portanto, utilizou-se a fórmula: $AACPD = \sum(y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_{ti}$, sendo y_i e y_{i+1} os valores de incidência observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o intervalo entre as avaliações (Araujo *et al.*, 2012). A AACPDp foi determinada pela avaliação visual da incidência em todas as folhas e a AACPDF foi calculada pela média de três folhas centrais marcadas em cada planta. Os dados obtidos foram submetido à análise de variância (ANOVA) e a média comparada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software ASSISTAT 7.7 beta (Assistat, 2015).

Tabela 2: Escala de nota para avaliar a incidência da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) causada por *Colletotrichum* sp.

Nota	Descrição
1	Planta limpa
2	01-15 % de incidência de doença na planta
3	16-39 % de incidência de doença na planta
4	40-75 % de incidência de doença na planta
5	76-100 % de incidência de doença na planta

Tabela 3: Escala de nota para avaliar a severidade da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) causada por *Colletotrichum* sp.

Nota	Descrição
1	Folhas limpas ou apresentando pontos cloróticos
2	Pequenas lesões cloróticas-necróticas nas pontas, presença de acérvulos
3	Lesões cloróticas-necróticas maiores, presença de acérvulos
4	Lesões necróticas em 50% da área foliar com acérvulos
5	Lesões necróticas em 70% da área foliar com acérvulos



Figuras 7: Escala Diagramática para avaliação da severidade da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) causada por *Colletotrichum* sp.

b. Análise biométricas das cebolinhas

As medições das cebolinhas foram realizadas no último dia do experimento, levando em consideração o comprimento das nove plantas por tratamento, com auxílio de uma régua milimetrada (Maped). As mensurações das folhas foram realizadas do bulbo até o ápice e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software ASSISTAT 7.7 beta (Assistat, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação molecular dos isolados de *Colletotrichum* spp. de cebolinha (*Allium Fistulosum* L.)

Sequências parciais dos genes actina (ACT) e quitina sintetase (CHS-1) dos isolados INPA 2770 e INPA 2774 revelaram identidade de 100% para ambos os genes com sequências de *Colleotrichum spaethianum* depositadas no GenBank, do isolado INPA 1809 a identidade foi de 97% para ACT e 99% para CHS-1 com *Colletotrichum theobromicola*, e do isolado INPA 2743 a homologia foi de 98% para calmodulina (CAL) e 100% para CHS-1 com *Colletotrichum truncatum*. Números de acessos das sequências depositadas no GenBank estão na Tabela 3.

Os isolados foram identificados como: INPA 1809 - *Colletotrichum theobromicola* (Rojas *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2015); INPA 2743 - *Colletotrichum truncatum* (Damm *et al.*, 2009); INPA 2770 e INPA 2774 - *Colletotrichum spaethianum* (Damm *et al.*, 2009).

As duas primeiras espécies, ainda não foram relatadas causando antracnose na cebolinha. *Colletotrichum theobromicola* foi descrita pela primeira vez em 2010 em associação com *Theobroma cacao* (Rojas *et al.*, 2010) e é considerada uma espécie amplamente distribuída que ocorre em diferentes hospedeiros nas regiões tropicais e subtropicais (Weir *et al.*, 2012). *Colletotrichum truncatum* também é um importante patógeno de planta que tem uma ampla gama de hospedeiros, incluindo pimenta, berinjela, melão, grão de bico, uvas, e muitas outras espécies de plantas (Damm *et al.*, 2009).

A espécie *C. spaethianum* foi descrita em *Hosta sieboldiana* na Alemanha, *Lilium* sp. na Coreia do Sul e *Hemerocallis* sp. na Nova Zelândia (Damm *et al.*, 2009), *Hemerocallis fulva*, *Hemerocallis citrina* e *Peucedanum praeruptorum* na China (Guo *et al.*, 2013) e em *Hemerocallis flava* no Brasil (Vieira *et al.*, 2014). Recentemente, a espécie foi descrita causando antracnose na cebolinha (Santana *et al.*, 2016), utilizando parte dos resultados do presente estudo em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM (Anexo 2).

Tabela 4: Identificação molecular de quatro isolados de *Colletotrichum* sp., oriundos de folhas com sintomas de antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.), os genes utilizados e o acesso no GenBank

Isolado	Espécie	N° Acesso GenBank		
		ACT	CAL	CHS-1
INPA1809	<i>C. theobromicola</i>	JX009457	-	KP642641
INPA2743	<i>C. truncatum</i>	-	KP823839	KP743259
INPA2770	<i>C. spaethianum</i>	GU227905	-	GU228297
INPA2774	<i>C. spaethianum</i>	GU227905	-	GU228297

5.1.1. Caracterização morfológica dos isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de cebolinha (*Allium fistulosum*)

Não houve diferença significativa entre os isolados de acordo com análise estatística realizada para os valores do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de *Colletotrichum* spp. testados (INPA 1809, INPA 2743, INPA 2770 e INPA 2774) em meios de cultura (BDA, SNA e Aveia) (Tabela 4). Apesar de não haver diferença significativa do IVCM entre os isolados, foi possível observar diferenças na vigorosidade e coloração dos micélios (Tabela 4; Figuras 7, 8, 9 e 10).

O isolado INPA 1809 (*C. theobromicola*) possui característica distinta dos outros isolados na morfo-cultura em meios de BDA, Aveia e SNA, (Tabela 4). As colônias apresentaram coloração micelial cinza claro com mucilagem conidial alaranjada e conídios de coloração hialina com formato cilíndrico. Semelhante ao trabalho de Rodrigues *et al.* (2014), cuja a coloração das colônias (com 10 dias de idade) foram de branco ao cinza, após dois a três dias tornou-se negro. Apresentou massa de conídios na coloração laranja e conídios de coloração hialina com formato cilíndrico. A produção de conídios foi superior nos meio de Aveia e SNA (Tabela 3). Os conídios apresentaram-se hialinos, asseptados, com formato cilíndrico (alantóide) e 8,9-13 µm de comprimento e 1,9-2,8 µm de largura. Os apressórios apresentaram-se solitários, de coloração marrom escuro com formato arredondado e 10,9-5,1 µm de comprimento e 2,3-5,9 µm de largura (Figura 12). Em comparação ao que foi relatado por Rodrigues *et al.* (2014), os conídios mostraram-se menores quanto ao comprimento e largura.

O isolado INPA 1809 apresentou características típicas de espécies do complexo *C. gloeosporioides* descritas por Cannon *et al.* (2008); Rojas *et al.* (2010); Weir *et al.* (2012). No entanto, as diferenças entre as espécies de *Colletotrichum* são sutis e a gama

de tamanho de conídios sobrepõe, assim sendo, a morfologia sozinha não pode discriminar espécies no complexo *C. gloeosporioides* (Phoulivong *et al.*, 2010 e Weir *et al.*, 2012).

O isolado INPA 2743 (*Colletotrichum truncatum*), apresentou acérvulos no meio de aveia e características distintas entre meios de cultura no micélio (Tabela 4). Foi observada formação de acérvulos em meio de cultura Aveia. Houve produção de conídios semelhantes nos três meios de culturas (Tabela 3). Os conídios apresentaram-se hialinos, asseptados, com formato curvado (falciforme) e 13,5-19,2 µm de comprimento e 1,5-2,9 µm de largura. Os apressórios apresentaram-se, solitários, arredondados de coloração marrom escuro com formato arredondado a levemente lobado e 9,9-6,5 µm de comprimento e 3,7-6,6 µm de largura (Figura 13).

Quando cultivado em meio BDA apresentou coloração do cinza ao amarelado e coloração da mucilagem conidial de hialina ao alaranjado. Para a mesma espécie Diao *et al.* (2015) relataram coloração de cinza nas colônias cultivadas em BDA, massa conidial alaranjada e conídios hialinos com formato falciforme, descrição semelhante ao isolado desse trabalho. No entanto, os conídios do isolado INPA 2743 apresentaram-se menores quanto (comprimento x largura) aos dados relatados por esse autor (17,6-21,6 x 2,57-3,31).

Por outro lado, os isolados INPA 2770 e INPA 2774, (*C. spaethianum*) apresentaram características distintas em relação às colônias no meio Aveia. O isolado INPA 2770 apresentou na massa conidial coloração hialina, enquanto o isolado INPA 2774, coloração creme. Os aspectos micelial dos isolados INPA 2770 e 2774, também, apresentaram características distintas, enquanto o isolado INPA 2770, em todos os meios de cultura testados, apresentou aspecto feltroso. Houve a formação de acérvulos em ambos os isolados, mas somente no isolado INPA 2774 apresentou setas, em meio de Aveia (Tabela 4 e Figura 11). O isolado INPA 2770 apresentou maiores estímulos na produção de conídios nos meios de BDA e SNA em relação ao meio de Aveia e o isolado INPA 2774 produziu mais conídios no meio de BDA (Tabela 3). Os conídios apresentaram-se hialinos, asseptados, curvado ou ligeiramente curvo, com um vértice arredondado, base truncada e com 13,1-20,2 µm de comprimento e 3,3-4,0 µm de largura. Apressórios solitários ou em grupos soltos, marrom escuro com formato lobado a levemente lobado, e 5,6-10,8 µm de comprimento e 4,3-8,2 µm de largura (Figuras 14 e 15). Esses resultados são semelhantes aos mencionados por Damm *et al.* (2009), Vieira *et al.* (2014) e Guo *et al.* (2013).

Tabela 5: Média de produção de conídios de quatro isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de folhas com sintomas de antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) cultivados em três tipos de meio de cultura (BDA, Aveia e SNA)

Isolados	BDA	Aveia	SNA
INPA 1809	1,58 bB	5,74 aA	6,88 bA
INPA 2743	0,90 bA	0,94 bA	0,68 cA
INPA 2770	19,62 aA	2,46 abB	17,30 aA
INPA 2774	20,88 aA	1,80 bC	9,72 bB

*CV% 27,67

*CV % (coeficiente de variação). Colunas representadas por letras minúsculas e linhas representadas por letras maiúsculas. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

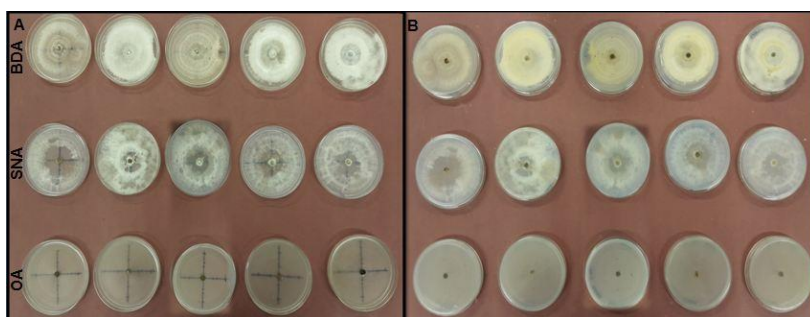


Figura 8: Aspecto de colônias de *Colletotrichum theobromicola* (INPA 1809), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA); **A-** topografia parte superior; **B-** topografia parte inferior

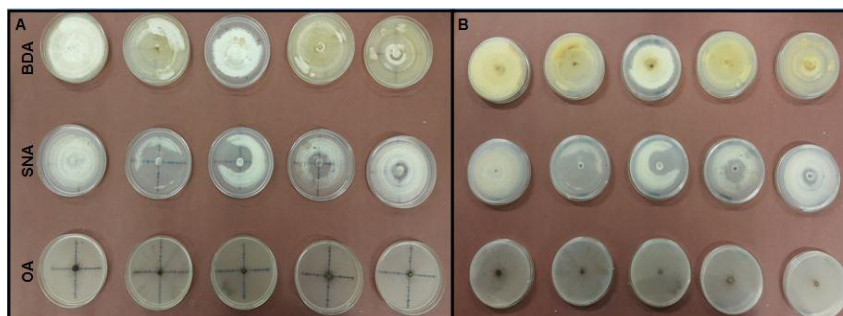


Figura 9: Aspecto das colônias de *Colletotrichum truncatum* (INPA 2743), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA); **A-** topografia parte superior; **B-** topografia parte inferior.

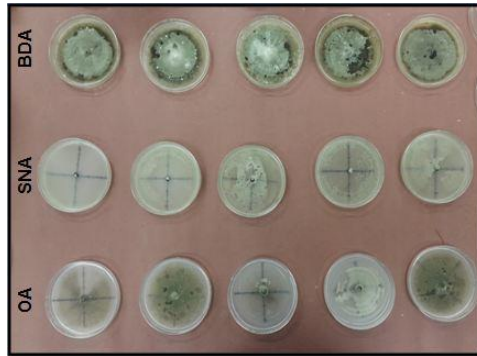


Figura 10: Aspectos das colônias de *Colletotrichum spaethianum* (INPA 2770), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA)

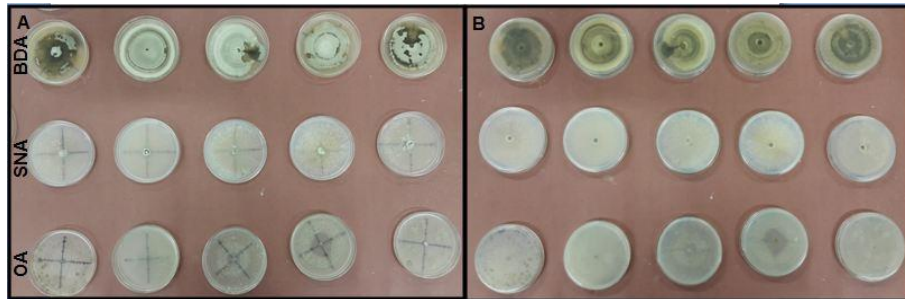


Figura 11: Aspectos das colônias de *Colletotrichum spaethianum* (INPA 2774), cultivados por sete dias a 25 °C em meios BDA, SNA e Aveia (OA); **A-** topografia parte superior; **B-** topografia parte inferior

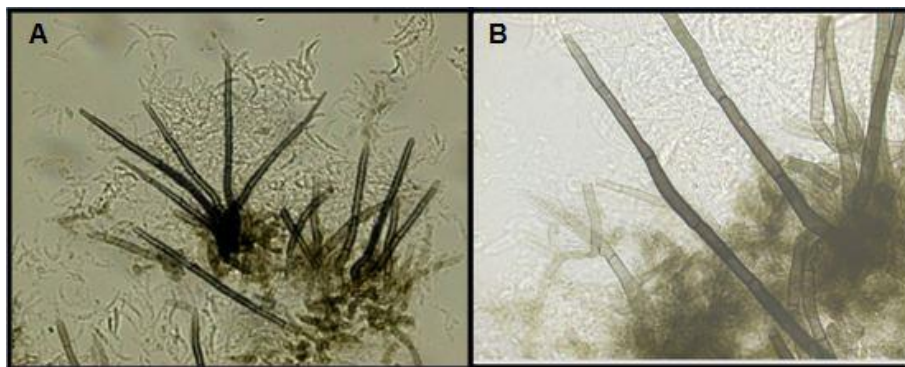


Figura 12: **A e B-** Setas septadas retiradas de acérvulos de *Colletotrichum spaethianum* (INPA 2774), cultivados por sete dias a 25 °C em meio de Aveia

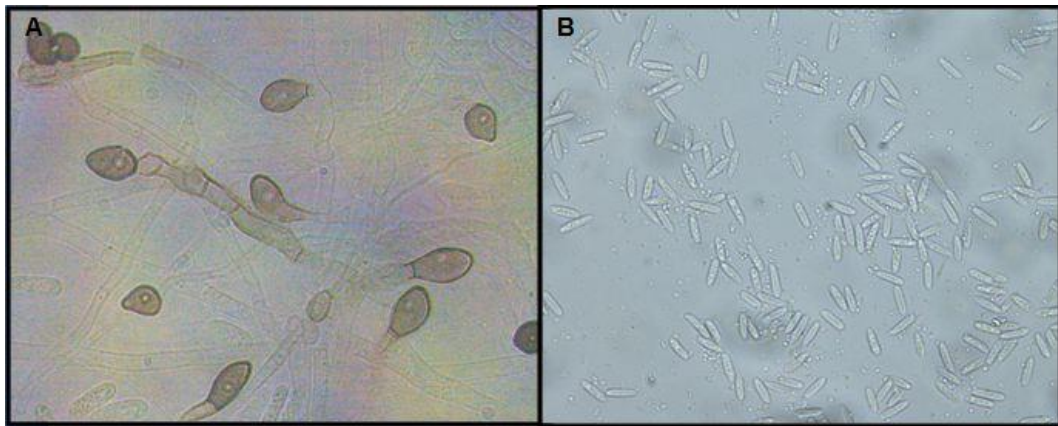


Figura 13: Estruturas de *Colletotrichum theobromicola* (INPA 1809); A- Apressórios e B- Conídios

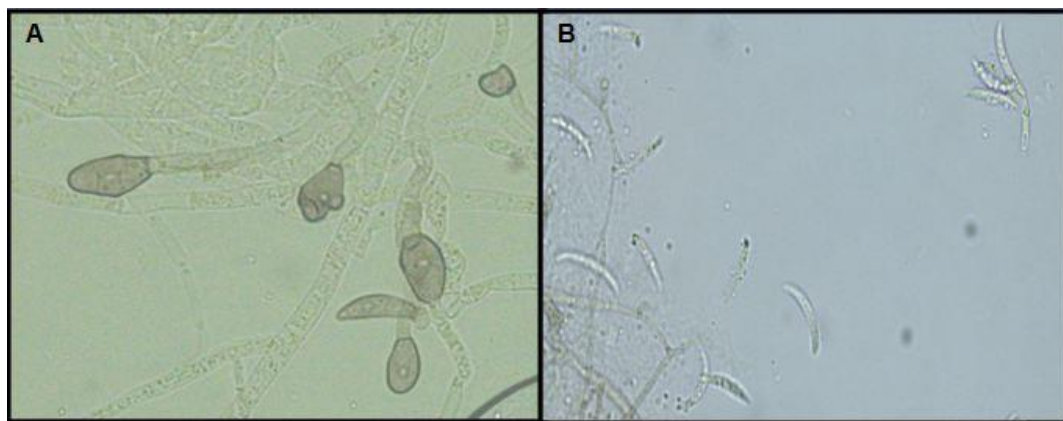


Figura 14: Estruturas de *Colletotrichum truncatum* (INPA 2743); A- Apressórios e B- Conídios

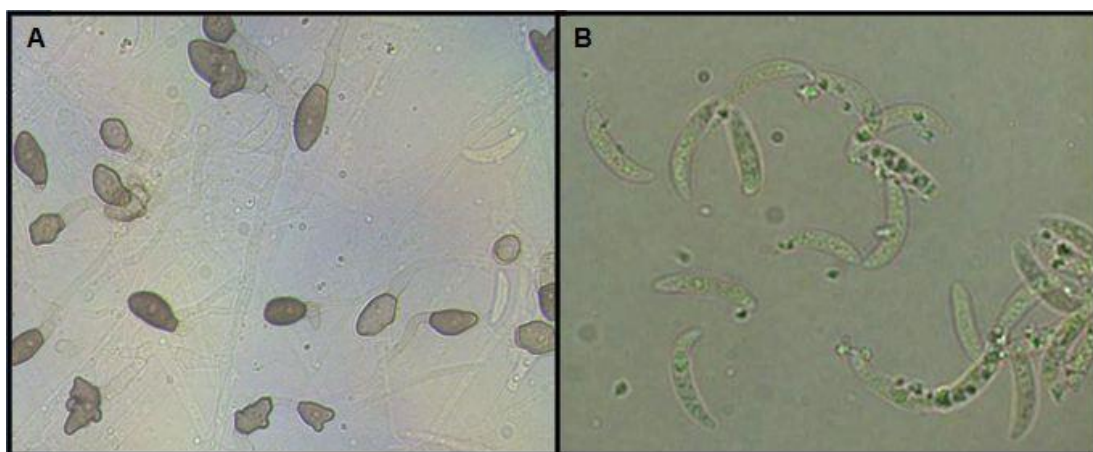


Figura 15: Estruturas de *Colletotrichum spaethianum* (INPA 2770); A- Apressórios e B- Conídios

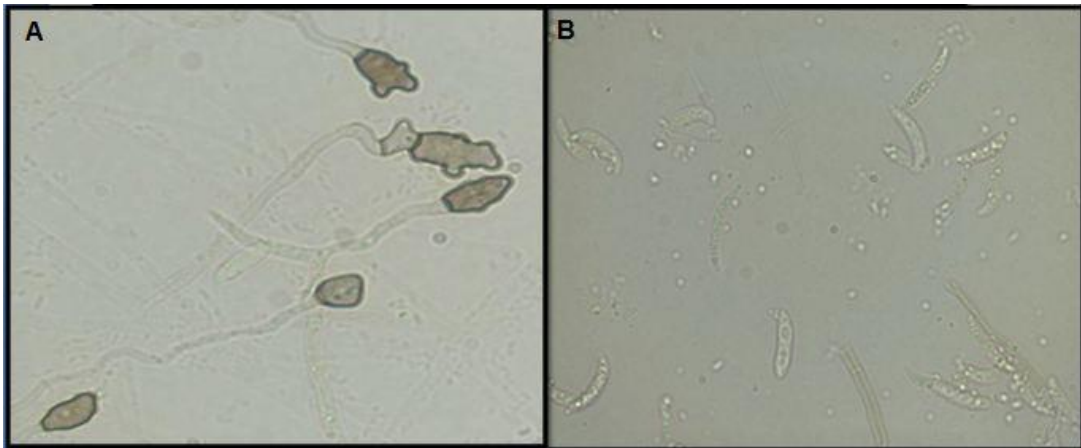


Figura 16: Estruturas de *Colletotrichum spaethianum* (INPA 2774); A- Apressórios e B- Conídios

Tabela 6: Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e características morfocultural dos isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) no Estado do Amazonas, Brasil, sobre diferentes meios de cultura.

Isolado	Espécie	Meio de cultura	IVCM ¹	Micélio	Aspecto	Coloração da superfície ²	Coloração do reverso ²	Setor	Esporulação	Massa conidial	Coloração da massa conidial	Acérvulos
1809	<i>C. theobromicola</i>	BDA	0,91 a	aéreo, ralo e parcialmente denso	feltroso, seco	Cinza claro	laranja claro	ausente	presente	mucilagínosa	alaranjada	ausente
1809	<i>C. theobromicola</i>	SNA	0,89 a	aéreo, denso	feltroso, seco	Cinza claro	Cinza claro	ausente	presente	mucilagínosa	hialina com partes alaranjadas	ausente
1809	<i>C. theobromicola</i>	Aveia	0,94 a	imerso, ralo	esparso, seco	Cinza claro	Cinza claro	ausente	presente	mucilagínosa	alaranjada	ausente
2743	<i>C. truncatum</i>	BDA	0,87 a	aéreo, ralo e parcialmente denso	feltroso, seco	amarelo claro	amarelo claro	ausente	presente	mucilagínosa	hialina com partes alaranjadas	ausente
2743	<i>C. truncatum</i>	SNA	0,91 a	aéreo, denso	feltroso, seco	Cinza claro	amarelo claro	ausente	presente	mucilagínosa	hialina	ausente
2743	<i>C. truncatum</i>	Aveia	0,865 a	imerso, ralo	esparso, seco	Cinza claro	Cinza claro	presente	presente	mucilagínosa	hialina	presente
2770	<i>C. spaethianum</i>	BDA	0,94 a	aéreo, denso	feltroso, seco	castanho acinzentado	castanho escuro	ausente	presente	mucilagínosa	de hialina a alaranjada	presente
2770	<i>C. spaethianum</i>	SNA	0,92 a	aéreo, denso	feltroso, seco	marrom acinzentado	marrom acinzentado	ausente	presente	mucilagínosa	de hialina a alaranjada	ausente
2770	<i>C. spaethianum</i>	Aveia	0,90 a	aéreo, ralo e parcialmente denso	feltroso, esparso, seco	castanho a cinza claro	castanho a cinza claro	presente	presente	mucilagínosa	hialina	presente
2774	<i>C. spaethianum</i>	BDA	0,89 a	aéreo,denso	feltroso, seco	amarelo a castanho acinzentado	amarelo a castanho acinzentado	ausente	presente	mucilagínosa	de hialina a alaranjada	ausente
2774	<i>C. spaethianum</i>	SNA	0,92 a	aéreo, ralo	plumoso, seco	cinza claro	cinza claro	ausente	presente	mucilagínosa	de hialina a alaranjada	ausente
2774	<i>C. spaethianum</i>	Aveia	0,85 a	imerso, ralo	plumoso, esparso, seco	cinza claro	cinza claro	presente	presente	mucilagínosa	creme	presente c/ setas

CV%: 11,72

¹Índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados, estimado com os dados de leituras de cinco dias;

²Descrição com base na carta de Munsell e observadas no sétimo dia após a repicagem;

³CV % coeficiente de variação;

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

5.2. Efeito fungitóxico dos produtos derivados de vegetais na inibição da germinação de conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de cebolinha (*Allium fistulosum* L.)

Todos os tratamentos com produtos derivados de vegetais (HID, EBA, OE e IN) mostram-se eficientes na inibição da germinação de conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp. em relação a testemunha. A maioria dos isolados, na concentração de 30%, teve a inibição de 100% da germinação de conídios na presença dos produtos derivados de vegetais, com exceção do isolado INPA 2743 (Tabela 5). No entanto, a média de inibição dos conídios dos isolados não diferiu estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que realizaram identificação das substâncias que compõe os extratos brutos aquosos de pimenta longa e de casca de preciosa; os hidrolatos de pimenta longa, de macacaporanga e de pau rosa e nem da infusão de pimenta longa. No entanto, sabe-se que o OE da pimenta longa contém como principal substância o dilapiol (Maia, 1998), o OE de casca de preciosa possuem compostos com ação antimicrobiana e o componente majoritário é 1-nitro-2-feniletano (Maia *et al.* 2000). Lorenzi e Matos (2008) relatam presença de compostos eugenol, metileugenol, anabasina, anibina, tanino e o linalol (composto majoritário) em OE de macacaporanga, por meio de análises fitoquímicas. Enquanto que o OE de pau rosa possui linalol em alta concentração (Hammer *et al.* 1999).

Com os relatos de análises fotoquímicas dos compostos que possui atividade antimicrobiana presentes nos óleos de pimenta longa, pau rosa, casca preciosa, macacaporanga (Hammer *et al.* 1999; Maia *et al.*, 2000; Bastos e Albuquerque, 2004; Simic *et al.* 2004; Scorzoni *et al.* 2007) é provável que esses compostos possam estar presentes em outros produtos derivados. Já se tem confirmação que os HID carregam compostos dos óleos em sua extração (Hydrosols, 2015). No entanto, os trabalhos que relatam a utilização dessas plantas no controle de micro-organismos, principalmente fitopatogênicos são escassos.

Tabela 7: Porcentagem da inibição na germinação de conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp., oriundos de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) utilizando produtos derivados de vegetais sob diferentes concentrações.

Isolados	Tratamentos	0%	10%	20%	30%
INPA 1809	EBA de Pimenta longa	70,3 a C	85,0 cd B	87,0 b B	93,6 ab A
INPA 1809	HID de Macacaporanga	70,3 a C	88,6 bc B	98,6 a A	100,0 a A
INPA 1809	HID de Pau rosa	70,3 a C	89,3 bc B	94,6 a AB	100,0 a A
INPA 1809	OE de Pimenta longa	70,3 a D	87,0 c C	93,6 ab B	100,0 a A
INPA 1809	Infusão de Pimenta longa	70,3 a C	83,3 cd B	94,6 a A	100,0 a A
INPA 1809	HID de Pimenta longa	70,3 a C	88,6 bc AB	88,6 b AB	96,3 a A
INPA 1809	EBA de Casca Preciosa	70,3 a C	88,3 bc B	95,3 a A	100,0 a A
INPA 2743	EBA de Pimenta longa	69,0 a C	87,0 bc B	95,6 a A	99,6 a A
INPA 2743	HID de Macacaporanga	69,0 a C	88,6 bc B	97,0 a A	98,6 a A
INPA 2743	HID de Pau rosa	69,0 a C	89,0 bc B	95,6 a A	99,6 a A
INPA 2743	OE de Pimenta longa	69,0 a C	91,3 b B	93,3 ab B	99,6 a A
INPA 2743	Infusão de Pimenta longa	69,0 a C	90,0 bc B	96,3 a A	99,3 a A
INPA 2743	HID de Pimenta longa	69,0 a C	85,0 cd C	93,0 ab B	99,3 a A
INPA 2743	EBA de Casca Preciosa	69,0 a C	81,0 d B	85,0 b B	96,6 a A
INPA 2770	EBA de Pimenta longa	68,6 a C	91,6 b B	91,6 ab B	100,0 a A
INPA 2770	HID de Macacaporanga	68,6 a B	100,0 a A	100,0 a A	100,0 a A
INPA 2770	HID de Pau rosa	68,6 a C	92,6 b B	100,0 a A	100,0 a A
INPA 2770	OE de Pimenta longa	68,6 a B	95,0 ab A	98,6 a A	100,0 a A
INPA 2770	Infusão de Pimenta longa	68,6 a B	97,3 a A	100,0 a A	100,0 a A
INPA 2770	HID de Pimenta longa	68,6 a B	95,0 ab A	100,0 a A	100,0 a A
INPA 2770	EBA de Casca Preciosa	68,6 a C	93,3 b B	96,3 a AB	100,0 a A
INPA 2774	EBA de Pimenta longa	69,0 a B	99,0 a A	97,6 a A	100,0 a A
INPA 2774	HID de Macacaporanga	69,0 a B	94,6 ab A	97,6 a A	99,0 a A
INPA 2774	HID de Pau rosa	69,0 a B	97,0 a A	97,3 a A	100,0 a A
INPA 2774	OE de Pimenta longa	69,0 a B	94,0 ab A	99,6 a A	100,0 a A
INPA 2774	Infusão de Pimenta longa	69,0 a C	92,3 b B	98,6 a A	99,3 a A
INPA 2774	HID de Pimenta longa	69,0 a B	95,3 ab A	97,6 a A	100,0 a A
INPA 2774	EBA de Casca Preciosa	69,0 a C	86,0 c B	94,0 ab A	100,0 a A

¹CV%= 3,38

¹(CV % coeficiente de variação). Colunas representadas por letras minúsculas e linhas representadas por letras maiúsculas. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Existem na literatura inúmeros trabalhos, em condições de laboratório, que relatam o potencial de produtos derivados de vegetais de outras plantas em diversos micro-organismos fitopatogênicos, incluindo espécies de *Colletotrichum*. Araújo (2014) mencionou a eficiência de nanopartícula de goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) a 25% sobre a inibição de 7,46% e 8,95%, do crescimento micelial de *C. musae* e *C. gloeosporioides*. Maqbool *et al.* (2012), observaram inibição de 100% do crescimento micelial de *C. musae* e inibição de 92,5% sobre a germinação de conídios quando aplicada goma arábica (*Coffea arabica* L.) à 10% combinada com quitosa (1%), Silva *et al.* (2011) relataram inibição de 58% e 60% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado de seringueira (*Hevea brasiliensis* (HBK) M. Arg.), quando aplicado óleo de nim nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Celoto *et al.* (2011) registraram 71% de inibição do crescimento micelial e 100% na germinação dos conídios de *C. musae* utilizando extrato aquoso proveniente de folhas e ramos de *Mormodica charantia* L. Esses são alguns dos trabalhos que relatam a eficiência de produtos derivados de vegetais na inibição de *Colletotrichum* spp. *in vitro*.

5.3. Efeito da aplicação dos produtos vegetais no controle da antracnose causada por *Colletotrichum* spp. e na produtividade da cultura de cebolinha (*Allium fistulosum* L.)

Os produtos derivados de vegetais reduziram significativamente a doença e conseqüentemente aumentou a produtividade das plantas de cebolinha no período de 50 dias do desenvolvimento da cultura, conforme a Figura 16.



Figura 17: Efeito de pulverização de produtos derivados de vegetais em plantas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) infectadas por *Colletotrichum* sp., durante sete semanas de produção, em Manaus, AM. A testemunha está ao lado esquerdo de cada foto (Extrato Bruto Aquoso (EBA) de casca preciosa (A), Infusão de pimenta longa (IN) (B), Hidrolato (HID) de pau rosa (C), Hidrolato (HID) de macacaporanga (D), Óleo Essencial (OE) de pimenta longa (E), Hidrolato (HID) de pimenta longa (F), Extrato Bruto Aquoso (EBA) de pimenta longa (G), uma parcela de cada tratamento (H))

a) Incidência da antracnose em cebolinha

Todos os tratamentos proporcionaram redução na incidência da doença em cebolinha em relação à testemunha. Os tratamentos que apresentaram maiores reduções na incidência da antracnose em relação à testemunha foram: HIDs de macacaporanga e de pimenta longa que reduziram 54,6% e 52,4%, respectivamente. Ambos os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si, no entanto, diferiram dos outros tratamentos. Na sequência o tratamento com HID de pau rosa reduziu em 38,3%, o OE de pimenta longa em 38%, IN de pimenta longa em 37%; EBA de casca preciosa em 32,2% e EBA de pimenta longa em 27,6% em comparação com a testemunha (Tabela 6; Figura 17).

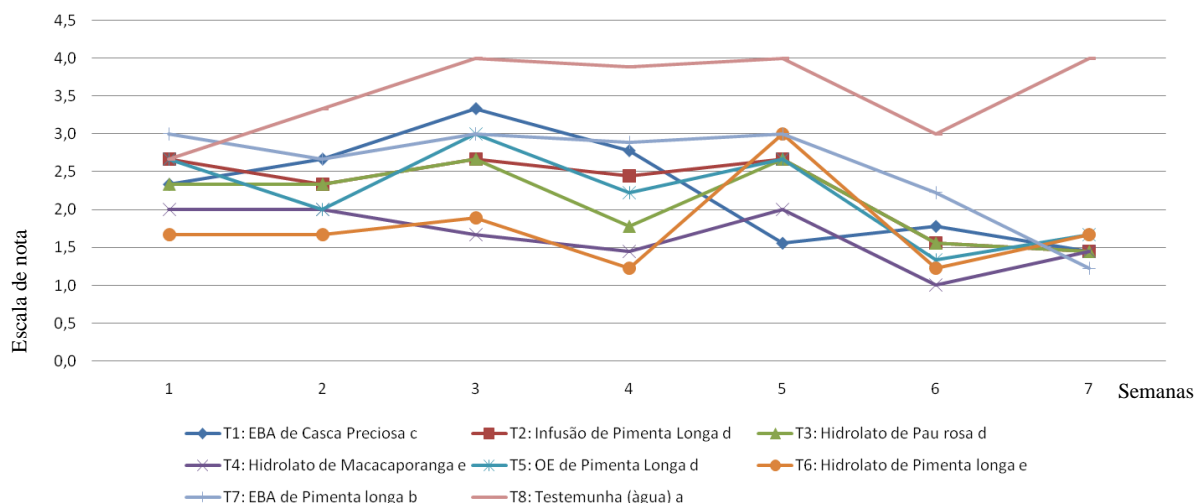


Figura 18: Curva de progresso da doença, quanto à incidência da antracnose em cebolinha (*Allium fistulosum* L.), após pulverizações dos produtos derivados de vegetais em função do tempo.

Tabela 8: Média da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (incidência) da antracnose causada por *Colletotrichum* sp. em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) e porcentagem de controle em relação a testemunha

Tratamentos	Média dos tratamentos AACPD	Redução da incidência em comparação c/ a testemunha (%)
EBA de casca preciosa	150,5 (c)	32,2
Infusão de pimenta longa	139,8 (d)	37
HID de pau rosa	137,0 (d)	38,3
HID de macacaporanga	100,9 (e)	54,6
OE de pimenta longa	137,4 (d)	38
HID de pimenta longa	105,7 (e)	52,4
EBA de pimenta longa	160,8 (b)	27,6
Testemunha (água)	222,0 (a)	
CV%	2,48	

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

É importante ressaltar a importância dos dados obtidos no experimento da inibição da germinação de conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. por meio de produtos derivados de vegetais. Pois, o isolado INPA 2770 foi proveniente de folhas de cebolinha do experimento em campo, que adquiriu a doença naturalmente. Este isolado

apresentou sensibilidade com todos os produtos derivados de vegetais, apresentando 100% de inibição da germinação dos conídios. Já em condições de campo, os produtos derivados de vegetais mostraram controle parcial da doença. Resultados que evidenciam esses produtos com atividade antimicrobiana direta (inibição da germinação de conídios) e na ativação de mecanismos de defesa da planta. Segundo Rodrigues *et al.* (2007) produtos derivados de vegetais podem agir diretamente ao fitopatógeno e ou ativar mecanismos de defesa na planta.

Os trabalhos que relatam efeitos de produtos vegetais no controle de fitopatógenos em condições de campo são escassos. Especificamente não foi encontrado na literatura trabalhos relatando esse patossistema. Existem trabalhos que relatam inibição da incidência da antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* e diferentes fitopatógenos em outros patossistemas em condições de campo, por meio de diferentes produtos derivado de vegetais. Estudos realizados por Araujo *et al.* (2012), obtiveram redução média de 50% da incidência da alternariose causada por *Alternaria porri* (Ellis) Cif., em cebolinha, por meio de aplicações semanais de extrato de alga (*Ulva fasciata*). Leite (2010) constatou que o uso do óleo vegetal de nim reduziu em 52% a AACPD do míldio da videira em relação à testemunha absoluta (água). Dias-Arieira *et al.* (2010) verificaram redução de 91%, da ocorrência de abortamento de flores de morangueiro inoculadas com *C. acutatum*, e redução de 86% na aparição de sintomas nos frutos que resultaram das flores inoculadas por meio de pulverizações de óleo de nim nas dosagens de 0,5 e 1,0%. Hassanein *et al.* (2008), verificaram redução de 42,5% da incidência de *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) em plantas de tomateiro pulverizadas com 20% do extrato aquoso de nim, em apenas duas semanas após a inoculação. Rodrigues *et al.* (2007) observou a inibição de 74% da incidência de *S. sclerotiorum* de Bary em alface, por meio do extrato de gengibre, aplicando na base da planta, foi constatado também que na alface houve aumento da atividade da enzima peroxidase, reduzindo significativamente a incidência da doença, indicando que o controle de *S. sclerotiorum*, em alface, pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação de mecanismos de defesa da planta. Amadioha e Obi (1998) verificaram que a aplicação de óleo de nim em feijão reduziu em 90% a ocorrência de lesões de antracnose provocadas por *C. lindemuthianum*, apresentando efeito fungitóxico superior ao fungicida benomyl.

b) Severidade da antracnose em cebolinha

Foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos com produtos derivados de vegetais (EBA de casca preciosa, pimenta longa, HID de pimenta longa, pau rosa, macacaporanga, OE de pimenta longa, e IN de pimenta longa), conforme a Figura 18, estes proporcionaram uma redução média de 55,6 % de severidade da doença nas folhas avaliadas em relação a testemunha (água). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha.

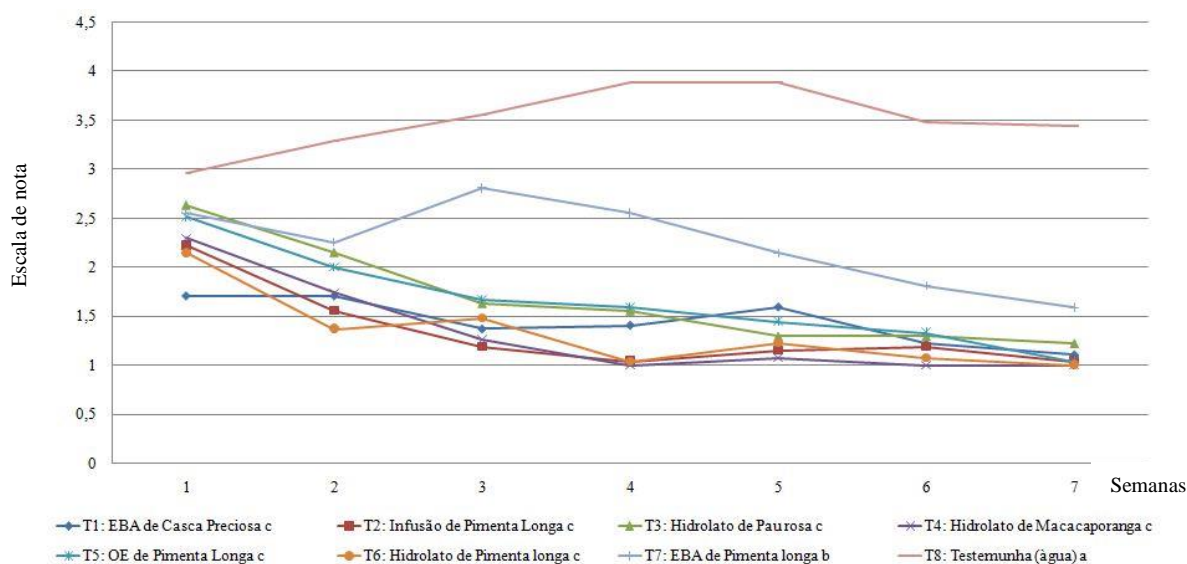


Figura 19: Curva de progresso da doença (severidade) da antracnose em três folhas centrais de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) infectadas por *Colletotrichum* sp., após pulverizações dos produtos derivados de vegetais em função do tempo.

Os tratamentos com produtos derivados de vegetais que apresentaram maiores reduções da severidade da antracnose em relação à testemunha (água) foram os: HID de pimenta longa que reduziu 62,9% da doença, seguido da infusão de pimenta longa que reduziu 63,5% e a menor redução da severidade foi proporcionada pela aplicação de EBA de pimenta longa 34,6%. Este produto diferiu estatisticamente dos demais tratamentos quanto a redução da severidade da antracnose em cebolinha, conforme a Tabela 7.

Tabela 9: Média da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (severidade) da antracnose causada por *Colletotrichum* sp. em cebolinha (*Allium fistulosum* L.) porcentagem de controle em relação a testemunha

Tratamentos	Média dos tratamentos (AAPCD)	Redução da severidade em comparação c/ a testemunha (%)
EBA de casca preciosa	60,92 (c)	58,4
Infusão de pimenta longa	53,40 (c)	63,5
HID de pau rosa	67,92 (c)	53,6
HID de macacaporanga	54,05 (c)	63
OE de pimenta longa	68,70 (c)	53
HID de pimenta longa	54,31 (c)	62,9
EBA de pimenta longa	95,66 (b)	34,6
Testemunha (água)	146,35 (a)	
CV%	2,75	

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na literatura não foi encontrado referência que menciona o controle de antracnose em cebolinha utilizando extratos vegetais. No entanto, existem trabalhos que obtiveram resultados promissores por meio do uso de produtos derivados de vegetais em outros patossistemas. Araujo *et al.* (2012), obtiveram redução média de 70% da severidade de áreas necrosadas por *A. porri* em cebolinha, por meio de aplicações semanais de extrato de alga (*Ulva fasciata*). Hassanein *et al.* (2008), verificaram redução da severidade de *F. oxysporium* Schlecht. de 81% em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) irrigadas e tratadas com o extrato aquoso de nim, em condições de campo. Carneiro *et al.* (2007), obtiveram redução média de 97% do número de manchas nas folhas causado por oídio no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) por meio de aplicações de óleo de nim, em condições de casa de vegetação, resultado tão eficiente quanto o fungicida triforine na dose de 4 ml L⁻¹.

Geralmente plantas medicinais e aromáticas possuem substâncias, em sua composição, que podem exercer funções de interações planta-patógeno, podendo ser por ação fungitóxica (Pereira *et al.*, 2008), bactericida (Vigo-Schultz *et al.*, 2006; Lucas, 2009) ou pela indução de defesa da planta (Pereira *et al.*, 2008; Mendeiros *et al.*, 2009; Lucas *et al.*, 2012), fazendo com que a planta produza fitoalexinas, proporcionando

aumento da síntese de outros compostos bioquímicos e estruturais de defesa da planta (Balbi-Penã *et al.*, 2006; Kagade *et al.*, 2004).

c) Produtividade das plantas de cebolinhas

As cebolinhas tratadas com derivados vegetais tiveram incrementos tanto no comprimento da planta quanto na largura final das folhas de cebolinha (Tabelas 8 e 9; Figura 19). Houve um acréscimo médio de 64,5% no desenvolvimento do comprimento da planta e 78,4% no desenvolvimento da largura das folhas de cebolinha em comparação com a testemunha, onde foi aplicado somente água.

O efeito sobre o comprimento e a largura das folhas de cebolinha pode ter ocorrido devido ao fornecimento de nutrientes pela pulverização semanal desses produtos derivados de vegetais. Observações semelhantes também foram constatadas no trabalho de Araujo *et al.* (2012), que obteve desenvolvimento de 19% no comprimento e de 32% no peso fresco das folhas de cebolinha tratadas com extratos de alga (*Ulva fasciata* Delile), em relação a testemunha em que foi aplicado somente água. Enquanto que, Rodrigues *et al.* (2007) constataram o aumento de 25% do peso fresco de alface por meio de aplicações semanais na base da planta com EBA e massa de gengibre.

As plantas de cebolinha (testemunha) ficaram atrofiadas e não se desenvolveram como as plantas tratadas com produtos derivados de vegetais. Provavelmente a doença pode ter causado a redução da parte aérea em que acarretou na redução da emissão de novas raízes, ocorrendo o rompimento das escamas dos bulbos próximos a coroa, essa evidência também é relatado no trabalho de Wordell Filho *et al.* (2008). Com isso, foi possível confirmar os benefícios dos tratamentos com os produtos derivados de vegetais testados nesse experimento. Pois os tratamentos a base de derivados vegetais mostraram eficientes tanto na sanidade como no desenvolvimento da planta. Além disso, esses resultados são interessantes, uma vez que, os hidrolatos de pimenta longa, pau rosa, macacaporanga produzidos pelas indústrias de extração de óleos essenciais possam ter outro destino, que não sejam o descarte no meio ambiente.

Tabela 10: Média do comprimento de folhas de plantas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) e porcentagem de desenvolvimento em comparação com a testemunha

Tratamentos	Média dos tratamentos (cm)	Comprimento da folha em comparação c/ a testemunha (%)
EBA de casca preciosa	45,7 (a)	70
Infusão de pimenta longa	49,8 (a)	73
HID de pau rosa	50,1 (a)	80
HID de macacaporanga	47,1 (a)	80
OE de pimenta longa	48,6 (a)	83
HID de pimenta longa	50,3 (a)	90
EBA de pimenta longa	48,6 (a)	73
Testemunha (água)	24,8 (b)	
*CV%	12,2	

*(CV% coeficiente de variação); As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 11: Média da largura de folhas de plantas de cebolinha (*Allium fistulosum* L.) e porcentagem de desenvolvimento em comparação com a testemunha

Tratamentos	Média dos tratamentos (mm)	Largura das folhas em comparação c/ a testemunha (%)
EBA de casca preciosa	0,93 (a)	70
Infusão de pimenta longa	0,96 (a)	70
HID de pau rosa	1,03 (a)	83
HID de macacaporanga	1,03 (a)	83
OE de pimenta longa	1,06 (a)	83
HID de pimenta longa	1,13 (a)	90
EBA de pimenta longa	0,96 (a)	73
Testemunha (água)	0,23 (b)	
*CV%	9,29	

*(CV% coeficiente de variação); As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Figura 20: Efeito dos produtos derivados de vegetais em cebolinhas infectadas com *Colletotrichum* sp., após sete semanas do plantio. (T1) extrato bruto aquoso de casca preciosa, (T2) extrato aquoso de pimenta longa; (T3) hidrolatos de pimenta longa, (T4) hidrolato de pau rosa, (T5) hidrolato de macacaporanga, (T6) óleo essencial de pimenta longa, (T7) infusão de pimenta longa, (T8) testemunha.

6. CONCLUSÃO

A cebolinha é suscetível a diferentes espécies de *Colletotrichum* (*C. theobromicola*, *C. truncatum* e *C. spaethianum*).

Os produtos derivados de vegetais testados neste trabalho foram eficientes na inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum* ssp., na redução da incidência e severidade da antracnose. Sendo que os HIDs de macacaporanga e pimenta longa foram os que apresentaram maior potencial como controladores da doença.

Os produtos derivados de vegetais proporcionaram maior rendimento na produção da cebolinha em relação à testemunha.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaskaveg, J.E.; Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, St. Paul, v.87, p.979-987.
- Afanador-Kafuri, L. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, v.93, n.5, p.579-587.
- Agrovel. 2015 (www.agrov.com/vegetais/hortalicas/cebolinha.htm). Acesso 05/01/2015.
- Agrofit. 2015 (www.agricultura.gov.br). Acesso 05/01/2015.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. *Plant diseases*. Elsevier, Academic Press, Califórnia, 5ed. 921p.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. 40^a ed., John Wiley, New York, 869p.
- Alfenas, A. C.; Mafaia, R. G. 2007. Métodos em Fitopatologia. Viçosa. Ed. UFV. 382pp.
- Amorim, L.; Resende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. 2011. *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. Agronômica Cores, Piracicaba, São Paulo, 704p.
- Amadioha, A.C. 1998. Control of Powdery mildew of pepper (*Capsicum annum* L.) by leaf extracts *Carica papaya*. *J. Herbs, spices and med.plants*, v.6, p.41-47.
- Andrade, E.M.; Uesugi, C.H.; Ueno, B.; Ferreira, M.A.S.V. 2007. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, n.1, p.21-31.
- Araujo, J.A.M. 2014. *Nonopartículas, óleos essenciais e extratos vegetais no controle in vitro de fungos fitopatogênicos*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte.
- Araujo, I.B.; Luiz, A.M.; Stadnik, M.J. 2012. Efeito do extrato de alga e de argila silicatada na severidade da alternariose e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.). *Tropical Plant Pathology*, v.37, n.5, p.363-367.
- Assis, D.C.; Resende, D.V.; Santos, M.C.; Correia, D.; Oliveira-Silva, M. B. 2013. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. And *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.55, n.3, p.149-154.
- Assistat. 2015 (www.assistat.com). Acesso 10/01/2015.

Baxter, A.P.; Van der Westhuizen, G.C.A.; Eicker, A. 1983. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. South African Journal of Botany, v.2, p. 259-289.

Balbi-Peña, M.I.; Becker, A.; Stangarlin, J.R.; Franzener, G.; Lopes, M.C.; Schwan-Estrada, K.R.F. 2006. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e *curcumina* - II. Avaliação *in vivo*. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p. 310-314.

Barguil, B.M. 2009. Identificação e variabilidade de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.6, p.1639-1646.

Bastos, C.N. 2011. Pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) e seus produtos: perspectivas de utilização no controle de pragas e doenças de plantas. *Boletim Técnico*, n.22, 36p.

Bastos, C.N.; Albuquerque, S.B. 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.5, p.555-557.

Bastos, C.N.; Benchimol, R.L. 2006. Avaliação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. sobre o crescimento micelial de patógenos de plantas ornamentais. In: *Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais*. Anais, Belém, 38p.

Bastos, C.N.; Poltronieri, L.S. 2005. Sensibilidade *in vitro* de *Dreschilera incurvata* e *Paracercospora musae* a óleos essenciais de plantas medicinais. *Summa Phytopathologica*, v.31 (Suplemento), p.12.

Bastos, C.N.; Silva, D.M.H. 2002. Inibição de fungos fitopatogênicos através dos óleos essenciais de *Piper aduncum* e *P. marginatum*. *Fitopatologia Brasileira*, v.27 (Suplemento), p.82.

Benato, E.A.; Sigris, J.M.M.; Hanashiro, M.M.; Magalhães, M.J.M.; Binotti, C.S. 2002. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. *Summa Phytopathologica*, v.28 (Suplemento), p.299-304.

Bezerra, J.L.; Menezes, M. 2007. Taxonomia tradicional do gênero *Colletotrichum*. In: *I Workshop Regional Sobre Colletotrichum: Colletotrichum*. Recife, Pernambuco, 1 CD-ROM.

Brown, K.; Gerstberger, S.; Carlson, L.; Franzoso, G.; Siebenlist, U. 1995. Control of IκB-α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. v.267, p.1485-1488.

Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.F.; Tessmann, D.J.; Scapim, C.A. 2004. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.29, n.2, p.128-13.

Bo, Y. K.; Yang, H. J.; Wang, W. X.; Liu, H.; Wang G. Q.; Yu, X., 2012. Metabolisable energy, *in situ* rumen degradation and *in vitro* fermentation characteristics of linted cottonseed hulls, delinted cottonseed hulls and cottonseed linter residue. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v.25, n.2, p.240-247.

BOFF, P. 1933. Antracnose-foliar da cebola: diagnóstico e controle. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v.6, n.2, p.34-37.

Bueno, C.R.N.C. 2005. *Identificação e caracterização das espécies de Colletotrichum causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas*. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Bueno, C.R.N.C.; Tozze Júnior, H.J.; Massola Júnior, N.S. 2005. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes temperaturas e espectros de radiação. In: *Anais XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Santos, São Paulo, p.61.

Cabera, A.M.G.; Alvarez, R.E. 2002. Primera identificación de *Colletotrichum dematium* sobre *Aglaonema* y de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre *Sinningia* em el nordeste de la Argentina. *Investigación Agraria Producción y Protección Vegetales*, v.16, p.131-134.

Cai L.; Hyde, K.D.; Taylor, P.W.J.; Weir, B.S.; Waller, J.; 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*, v.39, p.183-204.

Cannon, P.F.; Buddie, A.G.; Bridge, P.D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, v. 104, p.189-204.

Carbone, I.; Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. v.91, p. 553-556.

Carneiro, S.M.T.P.G.; Pignoni, E.; Vasconcellos, M.E.C.; Gomes, J.C. 2007. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, v. 33, p.34-39.

Carré, V.; Zanella, A.L.; Becker, A.; Stangarlin, J.; Pagliosa, L.A.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Gonçalves JR, A.C. 2002. Fungitoxicidade de quitosana e extrato de *Artemisia camphorata* a *Colletotrichum musae*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, p.291.

Celoto, M.I.B.; Papa, M.F.S.; Sacramento, L.V.S.; Celoto, F.J. 2011. Atividade antifúngica de extratos de *Mormodica charantia* L. sobre *Colletotrichum musae*. *Revista Brasileira de plantas medicinais*, Botucatu, v.13, n.3, p.337-341.

Clement, C.R.; Bianchetti, L.De B.; Costa, I.R.S.; Perez, E.L.; Althoff, K.C.; De Araujo, D. D.; Ramos, R.De.L.; Coral, A.G.; Carvalho, G.A.; Reis, Q.R.; Bastos, J.A.C. 2006. *Utilização e conservação de recursos genéticos de espécies hortícolas, frutíferas e medicinais por comunidades do alto Solimões*. Disponível em: (<http://>

nerua.inpa.gov.br/RERUA/32.htm) Acesso 29/07/2014.

Cox, M.L.; Irwin, J.A.G. 1988. Conidium and aplerium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. *Australian Systematic Botany*, v.1, p.139-144.

Craveiro, A.A.; Machado, M.I.L.D. 1986. Aromas, insetos e plantas. *Ciência Hoje*, v.4, n.23, p.54-63.

Cruz, A.A. 2014. *Características morfo-culturais e moleculares de isolados de Colletotrichum guaranicola* Albuquerque. *Procedentes do Estado do Amazonas*. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 106p.

Costa, C.P.; Melo, I.S. 1984. Seleção massal em cebola (*Allium cepa* L.), população “Pira Ouro”, para resistência a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Sensu arx*, 1957. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.9, n.3, p.214-219.

Cullen, D.W.; Lees, A.K.; Toth, I.K.; Duncan, J.M. 2002. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, Oxford, v.51, p.281-292.

Damm, U.; Cannon, P.F.; Woudenberg, J.H.C.; and Crous, P.W.; 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Study Mycology*, v.73, p.37-113.

Damm, U.; Woudenberg, J.H.C.; Cannon, P.F.; Crous, P.W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, v.39, p.45-87

Degani, A.L.G.; Cass, Q.B.; Vieira, P.C. 1998. Cromatografia: Um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n.7, p.21-25.

Diao, Y.Z.; Zhang, C.; Xu, J.; Lin, D.; Liu, L.; Mtung'e, O.G.; Liu, X. 2015. Genetic differentiation and recombination among geographic populations of the fungal pathogen *Colletotrichum truncatum* from chili peppers in China. *Evolutionary Applications*. v.8, n.10, p.108-118.

Diao, Y.Z.; Zhang, C.; Lin, D.; Liu, X.L. 2014. First Report of *Colletotrichum truncatum* causing Anthracnose of tomato in China. *Plant disease*, v.98, n.5, p.687.

Dias-Arieira, C.R.; Ferreira, L.R.; Arieira, J.O.; Miguel, E.G.; Donega, M.A.; Ribeiro, R.C.F. 2010. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.36, n.3, p.228-232.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L.; Hortorium, L.H.B. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p.13-15.

Fazolim, M. 2006. Potencialidade da pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.), Características gerais e resultados de pesquisa. Rio Branco, AC, Documentos. 103p.

Feitosa, M. I.; Fchteberger, E.; Kudamatsu, M.; Rossetti, V.; Leite, L. R. 1977. Estudos

sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v.44, n.2, p.33-54.

Figueiredo, L.C. 2012. Genetic and pathogenic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of cashew anthracnose. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, Jaipur, v.2, n.1, p.250-259.

Filgueira, F.A.R. 2000. Novo Manual de Olericultura: *Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa MG. Editora UFV. 80p.

Franco, D.A.; Bettiol, W. 2000. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita citros com produtos alternativos. *Fitopatologia Brasileira*, v.25, p.602-606.

Ganley, A.R.D; Scott, B. 2002. Concerted evolution in the ribosomal RNA genes of an *Epichloë* endophyte hybrid: comparison between tandemly arranged rDNA and dispersed 5S rrn genes. *Fungal Genetics and Biology*, v.35, p.39-51.

Gunnell, P.S.; Gubler, W.D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Lancaster Mycologia*, v.2, n.84, p.157-165.

Guo, M.; Pan, Y.M.; Dai, Y.L.; Gao, Z.M. 2013. First Report of leaf spot caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Peucedanum praeruptorum* in China. *Plant disease*. v.97, n.10, p.1380.

Guo, L.D.; Hyde, K.D.; Liew, E.C.Y. 2001. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.20, n.1, p.1-13.

Gupta, V.K. 2010. Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. by random amplified polymorphic DNA analysis. *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.26, p.4009-4013.

Hammer, K.A.; Carson, C.A.; Riley, T.V.; 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p.985-990.

Harbone, J.B. 1993. *Introduction to Ecological biochemistry*. 4.ed. London: Academic. v.3, p.357.

Heredia Z.N.A.; Vieira, M.C; Weismann, M.; Lourenção, A.L.F. 2003. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. *Horticultura Brasileira*, v.21, n.3, p.574-577.

Hibbett, D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the British Mycological Society*, v.33, p.533-556.

Hidrosol Primer. 2014. (www.hydrosols.com/article_primer.html). Acesso em: 18/12/14.

Holliday, P. 1980. *Fungus diseases of tropical crops*. Cambridge: Cambridge University Press. 607p.

- Harborne, J.B. 1993. Phytochemistry. *Academic Press*, London, p.89-131.
- Hussain, A.I. F.; Anwar, S.T.H.; Sherazi, R. 2008. Chemical composition. Antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, v.108, p.986-995.
- IDAM, 2014. (www.idam.gov.br). Acesso em: 15/01/2015.
- Kim, W.G.; Hong, S.K.; Kim, J.H. 2008. Occurrence of Anthracnose on Welsh Onion Caused by *Colletotrichum circinans*. *Mycobiology*, v.36, n.4, p.274.
- Koketsu, M.; Gonçalves, S.L. 1991. *Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, (Documento 8). 24p.
- Kuhn, O.J.; Portz, R.L.; Stangarlin, J.R.; Del Águila, R.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Franzener, G. 2006. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Semana: Ciências Agrárias*, Londrina, v.27, n.1, p.13-20.
- Kagade, S.; Marimuthu, T.; Thayumanavan, B.; Nandakumar, R.; Samiyappan, R. 2004. Antimicrobial activity and induction of resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. London, v.65, p.91-100.
- Leite, C.D. 2010. *Extrato de alho e óleo vegetal na quebra de dormência de gemas e no controle de doenças da videira*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná.
- Leslie J.F.; Summerell B.A. 2006: *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Ltd, Iowa.
- Liu, B.; Louws, F. J.; Sutton, T.B.; Correll, J.C. 2012. A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Plant Pathology*. v.132, p.593-607.
- Lima, J. S. 2012. Genetic Diversity of *Colletotrichum* spp. an Endophytic Fungi in a Medicinal Plant, Brazilian Pepper Tree. *ISRN Microbiology*, p.1-7.
- Lins, S.R.O.; Abreu, M.S.; Alves, E. 2007. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. Em plântulas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, n.6, p.488-495.
- Lorenzi, H.; Abreu Matos F.J. 2008. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. Nova Odessa, São Paulo, SP, v.2. 544p.
- Louws, F.J.; Rademaker, J.L.W.; de Bruijn, F.J. 1999. The three ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bactéria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review Phytopathology*, v.37, p.81-125.

- Lucas, P.G.; Bray, E.S.; Emry, R.J.; Karl, F. 2012. Dinosaur Eggshell and the cretaceous-paleogene boundary in the zayzan basin, esastern Kazakstan. *Journal Ofstratigraphy*, v.36, n.2, p.417-4127.
- Lucas, S. G.; Emry, R.J.; Bayshashov, B.U.; Tyutkova, L. A. 2009. Cenozoic mammalian biostratigraphy and biochronology in the Zaysan Basin, Kazakstan. In: Albright, L.B. (ed.) Papers on geology, vertebrate paleontology, and biostratigraphy in honor of Michael O Woodburne. Flagstaff, *Museum of Northern Arizona Bulletin*, v.65, p.621-633.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlig emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, v.2, n.1, p.176-177.
- Maia, J.G.S.; Zohbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A. 2000. *Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais*. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém, v.15, 413p.
- Maia, J.G.S. 1998. Constituints of the essencial of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon region. *Flavour and Farmacy Journal*, 13: p.269-272.
- Maqbool, F.; Wang, Z.; Xu, Y.; Zhao, J.; Gao, D.; Zhao, Y.; Bhatti, Z. A.; Xing, B. 2012. Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *Journal of Hazardous Materials* (Elsevier), v.237, n°1, p.262-269.
- Martin, M.P.; Figueres, G. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *Europen Journal of Plant Pathology*, v. 105, p.733-741.
- Menezes, M.; Hanlin, R.T. 1996. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from Nothranstern Brazil. *Phytopatology*, v.27, p.228-236.
- Menezes, M. 2002. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.523-524.
- Mendeiros, P. H. A.; Araújo, J. C.; Bronstert, A. 2009. Interception measurements and assessment of Gash model performance for a tropical semi-arid region. *Revista Ciência Agronômica*, v.40, n.2, p.165-174.
- Mills, P.R.; Sreenivasaprasad, S.; Brown, A.E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.98, p.137-144.
- Michereff, S.J. 2000. Quantificação de Doenças de Plantas. In: Desafio do Manejo Integrado de Pragas e Doenças. Livro de palestras e mini-cursos, *Semana de Fitossanidade*. Recife: Editora Universitária da UFPE, p.63-77.
- Mishra, A.; Siradhana, B.S. 1979. Studies on the survival of sorghum anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) pathogen. *Phillippine Agriculture*, v.62, p.149-152.

- Moreira, L.M.; May De Mio, L.L.; Aldebenito-Sanhueza, R.M.; Lima, M.L.R.Z.; Possamai, J.C. 2002. Controle em pós-colheita de *Monilia Fructicola* em pêssegos. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.395-398.
- Moriwaki, J.; Sato, T.; Tsukiboshi, T. 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. From Japan. *Mycosciense*, v.44, p.47-53.
- Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. 2000. Medicinal plants of Brazil. Michigan: Reference Publications Incorporation. 501p.
- Mors, W.B.; Rizzini, C.T. 1995. Botânica econômica brasileira. *Âmbito Cultural*. v.3, p.207.
- Mullis, K., Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Meth Enzymol*. v.155, p.335-350.
- Munaut, F.; Hamaide, N.; Mariotte, H. 2002. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. *Micological Research*, v.106, p.479-593.
- Nguyen, T.H.P. 2009. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. *Plant Pathology*, Oxford, v.58, p.898-909.
- Oger, J.M., Fardeau, A.; Richomme, P.; Guinaudeau, H.; Fournet, A. 1994. Novel isoquinoline alkaloids from bolivian laureaceae: *Aniba canelilla* H. B. K. *Canada Journal Chemistry*., v.71,n.8, p.1128-11353.
- Oliveira, J. A. 1991. *Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativus L.) e pimentão (Capsicum annum L.)*. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Orjaba, J.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. 1989. Biologically active phenylpropene and benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* leaves. *Planta Medicinal*, v.55, p.619-620.
- Peres, N.A.R.; Kuramae, E.E.; Dias, M.S.C.; Souza, N.L. 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.150, p.128-134.
- Pereira, W. V. 2008. *Caracterização e identificação molecular de espécies de Colletotrichum associadas à antracnose da goiaba no estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo. 79p.
- 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*, v.44, p.33-43.

Pileggi, S.A.V. 2009. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.55, p.1076-1088.

Prihastuti H.; Cai L.; Chen H.; McKenzie E.H.C.; Hyde K.D. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, v.39, p.89-109.

Puterka, G.J.; Black, W.C.; Steiner, W.M.; Burton, R.L. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Morkvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, London, v.70, p.604-618.

Regente, M.C., Oliva, C.R., Ffeldman, M.L., Castagnaro, A.P.; Canal, L., 1997. A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiologia Plantarum*, v.100, p.178-182.

Rezende, J.A.M.; Fancelli, M.I. 1997. Doenças do mamoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, A.; Bergamin Filho, A.B.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. *Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas*. Agronômica Ceres, São Paulo. v.2. p. 261-297.

Rodrigues, A.L.; Pinho, B.P.; Lisboa, D.O.; Nascimento, R.J.; Pereira, O.L.; A.C.; Furtado, Q.G. 2014. *Colletotrichum theobromicola* causes defoliation, stem girdling and death of mini-cuttings of eucalyptus in Brazil. *Tropical plant pathology*, v.39, n.4, p. 326-330.

Rodrigues, E.; Schwan-Eestrada, K.R.F.; Fiori- Tutida, A.C.G.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M.E.S. 2007. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.33, n.2, p.124-128.

Rojas, E.I; Rehner, S.A.; Samuels, G.J.; Van Bael, S.A.; Herre, E.A.; Cannon, P.; Chen, R.; Pang, J.; Wang, R.; Zhang, Y.; Peng, Y.Q.; Sha, T. 2010 *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, v.102, p.1318-1338.

Rojas-Martínez, R.I. 2008. Virulence and Genetic Variation of Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, Ciudad Obregón, v.26, n.1, p.21-26.

Rozwalka, L.C.; Lima, M.L.Z.R.C.; Mio. L.L.M.; Nakashima. T. 2008. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307.

Sales Júnior, R.; Soares, S.P.F.; Amaro Filho, J.; Nunes, G.H.S.; Miranda, V.S. 2004. Qualidade do melão exportadompelo porto de Natal-RN. *Ciencias Agrarias*, v.36, n.1,

p.286-289.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2003. *Farmacologia da planta ao medicamento*. 5ª ed. Editora da UFSC. 1102p.

Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Almeida, A.M.F.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Mendes-Giannini M.J.S. 2007. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, p.25-34.

Serra, I.M.R.S. 2011. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. *Summa Phytopathology*, Jaboticabal, v.37, n.1, p.42-51.

Sharma, P.N.; Kaur, M.; Sharma, O.P.; Sharma, P.; Pathania, A. 2005. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici* the cause of fruit rot of chilies in the subtropical region of north-western. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 153, p.232-237.

Shafiq, S.; Shakeel, F.; Talegaonkar, S.; Ahmad, F.J.; Khar, R.K. 2007. Design and development of oral oil in water ramipril nanoemulsion formulation: *In vitro* and *in vivo* assessment. *Journal Biomed Nanotech*, v.3, p.28-44.

Shafiq, B., Joshi, J.; Bertino, E.; Ghafoor, A. 2005. Secure Interoperation in a Multi-Domain Environment Employing RBAC Policies. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering*. v.17, n.11, p.1557-1577.

Silva, P.S.D.; Knoechelmann, C.M.; Tabarelli, M.; Almeida-Cortez, J.S. 2011. Richness of gall morphospecies along a secondary successional gradient of Atlantic Forest in northeastern Brazil. *Revista Brasileira Biociencias*. v.9, n.3, p.270-277.

Silva, M.F.; Lisbôa, R.C.L.; Lisbôa P.L.B.; 1997. *Nomes Vulgares de Plantas Amazônicas*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. v.1, p.222.

Simic, A.; Sokovic, M. D.; Ristic, M.; Grujic-Jovanovic, M.; Vukojevic, J.; Marin, P. D., 2004. The Chemical Composition of some Lauraceae Essential Oils and Their Antifungal Activities. *Phytotherapy Research*, v.18, p.713-717.

Singh, R.; Graney, L.; Williamson, M. 2015. First Report of Boxwood Dieback Caused by *Colletotrichum theobromicola* in the United States. *Plant Disease*. v.99, n.9, p.1274.

Soll, D.R. 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infections fungi. *Clinical Microbiology Review*, v.3, p.332-370.

Souza, J.L.; Resende, P. 2006. *Manual de Horticultura Orgânica*. Editora: Aprenda Fácil, Viçosa, Minas Gerais. 2ª. Ed., 835p.

Souza, K.S.; Chaar, J.S.; Oliveira, K.M.T.; Gomes, E.O.; Portela, C.N.; Pohlit, A.M.; Quignard, E.L.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P.; Mouchrek Filho, V.E.; Silva, D.D.;

- Galhiane, M.S.; Chierice, G.O. 2007. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.9, n.2, p.1-7.
- Sreenivasaprasad, S.; Sharada, K.; Brown, A.E.; Mills, P.R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*, v.45, p.650-655.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute. 696p.
- Sutton, B.C. 1992. *The genus Glomerella and its anamorph Colletotrichum*. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, U.K.: CAB International, p.1-26.
- Tavares, G. M. 2004. *Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (Carica papaya L.) na pós-colheita*. 2004. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 55p.
- Talhinhas, P.; Sreenivasaprasad, S.; Neves-Martins, J.; Oliveira, H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, v.92, p.986-996.
- Taveira, F.S.N.; Lima, W.M.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S. 2003. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. *Biochemical Systematics and Ecology*. v.31, n.1, p.69-75.
- Torres-Calzada, C. 2011. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. *Molecular Biotechnology*, Totowa, v. 49, n.1, p.48-55.
- Tozze Júnior, H.J. 2012. Antracnose do Abacateiro: danos pós- colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré- penetração e monocíclicos e controle químico. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 124p.
- Tozze Júnior, H.J.; Massola Júnior, N.S. 2007. Caracterização tradicional de espécies de *Colletotrichum*. In: Workshop Regional Sobre *Colletotrichum*. Recife, Pernambuco, 1 CD-ROM.
- Tozze Júnior, H.J.; Bueno, C.R.N.C.; Massola Júnior, N.S. 2004. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* sp. de hortaliças solanaceas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.30, p.73.
- Varzea, V.M.P.; Rodrigues Júnior, C.J.; Lewis, B.G. 2002. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology*, Oxford, v.51, p.202-207.
- Venturoso, L. R.; Bacchi, L.M.A.; Gavassoni, W.L.; Conus, L.A.; Pontim, B.C.A.; Bergamin, A.C., 2011. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o

desenvolvimento de fitopatógenos. *Summa phytopathol*, Botucatu, v.37, n.1, p.18-23.

Vieira, W.A.S.; Michereff, S.J. 2014. First Report of Antracnose caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Heimerocallis flava* in Brasil. *Plant disease*. v.98, n.7, p.997.

Vicgo-Schutz, S.C.; Stangarlin, J.R.; Franzener G.; Portz R.L.; Kuhn,O.J.; Schwane-Estrada, K.R.F. 2006. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. *Seminário de Ciências Agrárias, Londrina*, v.27, n.4, p.515-524.

Weir, B.; Johnston, P.R.; Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, v.73, p.115-180.

White, T.J.; Arnheim, N.; Erlich, H.A.1989. The polymerase chain reaction. *Trends Genet.*, v.5, p.185-188.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Ed.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York, p. 315-322.

Wordell Filho, J.A.; Rowe, E; Gonçalves, P.A.S.; Debarba, J.F.; Boff, P.; Thomazelli, L.F. 2006. *Manejo Fitossanitário na Cultura da Cebola*. Florianópolis: Epagri, p.226.

Zaha, A.; Ferreira, H.B.; Passaglia, M.P. (Eds.). 2003. *Biologia Molecular Básica*. Mercado Aberto, ed. 3, Porto Alegre. 424p.

8. ANEXOS

Anexo 1: Características químicas resultante da análise de solo realizada pelo Laboratório de Análises de Solos e Plantas- LASP da Embrapa Ocidental.

Nº	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA		pH	C	M.O.	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	Fe	Zn	Mn	Cu	
Prot.	Nº	Prof. (cm)	H ₂ O	g/kg		mg/dm ³			cmol/dm ³							%	mg/dm ³					
1508	1		Setor 2 - Maracujá.	6,08	3,71	6,38	156	21	4	1,79	0,56	0,00	1,50	2,42	2,42	3,92	61,72	0,00	89	17,72	9,79	3,45
1509	2		Setor 4 - Hortaliças.	6,09	6,02	10,36	111	33	3	1,74	0,64	0,00	1,63	2,48	2,48	4,11	60,26	0,00	91	12,3	7,69	2,12

pH em água - relação 1:2,5

P, Na, K, Fe, Zn, Mn, Cu - Extrator Mehlich-1

Ca, Mg - Extrator KCl 1 mol/L

H+Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0

SB - Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC(T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

V - Índice de Saturação por Bases

m - Índice de Saturação por Alumínio

Matéria Orgânica (M.O) = C (carbono orgânico) x 1,724 - Walkley-Black

Anexo 2: Artigo publicado no periódico *Plant Disease* (parte dos resultados obtidos no presente estudo).

Santana, K.F.A.; Garcia, C.B.; Matos, K.S.; Hanada, R.E.; Silva, G.F.; Sousa, N.R. 2016. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum spaethianum* on *Allium fistulosum* in Brazil. *Plant Disease*, v.100, n.1, p. 224. 10.1094/PDIS-07-15-0737-PDN

The Welch onion (*Allium fistulosum* L.) is widely grown in temperate and subtropical regions worldwide and has many important culinary uses. The occurrence of anthracnose on Welch onion has been reported in Korea and is caused by *Colletotrichum circinans* (Kim et al. 2008). Since 2012, symptoms typical of anthracnose have been observed on Welch onions in a vegetable garden located in the Japanese Colony of Manaus, Amazonas, Brazil (59°59'06" W; 03°04'16" S). This disease occurred in 50% of the seedlings and the symptoms consist of brown necrotic spots that extend along the entire leaf. Acervuli collected directly from the leaves were plated onto potato dextrose agar (PDA) and then incubated at 25°C for three to four days. Single-spore cultures were obtained from three isolates from different plants. On PDA medium, the isolates initially produced white colonies, which then turned gray and had an orange-colored conidial mass. On Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) medium (Leslie and Summerell, 2006), they formed numerous black structures such as sclerotia, setae, and acervuli. Conidia on SNA are hyaline, aseptate, curved or slightly curved, with a rounded apex and truncated base that is 13.1 to 20.2 µm long and 3.3 to 4.0 µm wide. The appressoria are solitary or in loose groups, dark brown, irregularly shaped, sometimes partially lobed, smooth-walled, and from 5.6 to 10.8 µm long and 4.3 to 8.2 µm wide. An alignment of the actin (ACT) and chitin synthase (CHS-1) partial gene sequences showed 100% identity with *Colletotrichum spaethianum* (Allesch.) Damm, P. F. Cannon & Crous (CBS 167.49). Maximum likelihood analysis was done using the published sequences of the ACT and CHS-1 genes from *C. spaethianum* and other *Colletotrichum* species that have curved conidia (Damm et al. 2009; Vieira et al. 2014). The individual data sets were combined using the web tool FaBox (1.41) and analysis with PAUP (1000 bootstrap replicates). Based on morphological characteristics and phylogenetic analysis, the isolates were identified

as *C. spaethianum*. The sequences for the isolates obtained in the present study were deposited in GenBank (ACT Accession Nos. KT184300 to KT184302; CHS-1 Accession Nos. KT184303 to KT184305). The cultures were deposited in the Culture Collection of Microorganisms of the National Institute of the Amazonian Research (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA) (INPA 2615, 2770, and 2774). Five Welch onion seedlings were sprayed with a conidial suspension (10^6 conidia/ml) for each isolate and control seedlings were sprayed with sterile water. Plants were covered with plastic bags and maintained at $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ in a greenhouse and a 12-h photoperiod. Symptoms typical of anthracnose were induced five days postinoculation, and signs of the pathogen were observed at 12 days postinoculation. No symptoms were observed in the control plants. *C. spaethianum* was reisolated from symptomatic plants, completing Koch's postulates. *C. spaethianum* has been described on *Hosta sieboldiana* in Germany, *Lilium* sp. in South Korea, *Hemerocallis* sp. in New Zealand (Damm et al. 2012), *Hemerocallis fulva*, *Hemerocallis citrine*, and *Peucedanum praeruptorum* in China (Yang et al. 2012; Guo et al. 2013), and *Hemerocallis flava* in Brazil (Vieira et al. 2014). To our knowledge, this is the first report of *C. spaethianum* on *A. fistulosum*.

References:

- (1) U. Damm et al. Fungal Divers. 39:45, 2009.
- (2) M. Guo et al. Plant Dis. 97:1380, 2013.
- (3) G. W. Kim et al. Mycobiology. 36:274, 2008.
- (4) W. A. S. Vieira et al. Plant Dis. 98:997, 2014.
- (5) Y. Yang et al. Trop. Plant Pathol. 37:165, 2012.

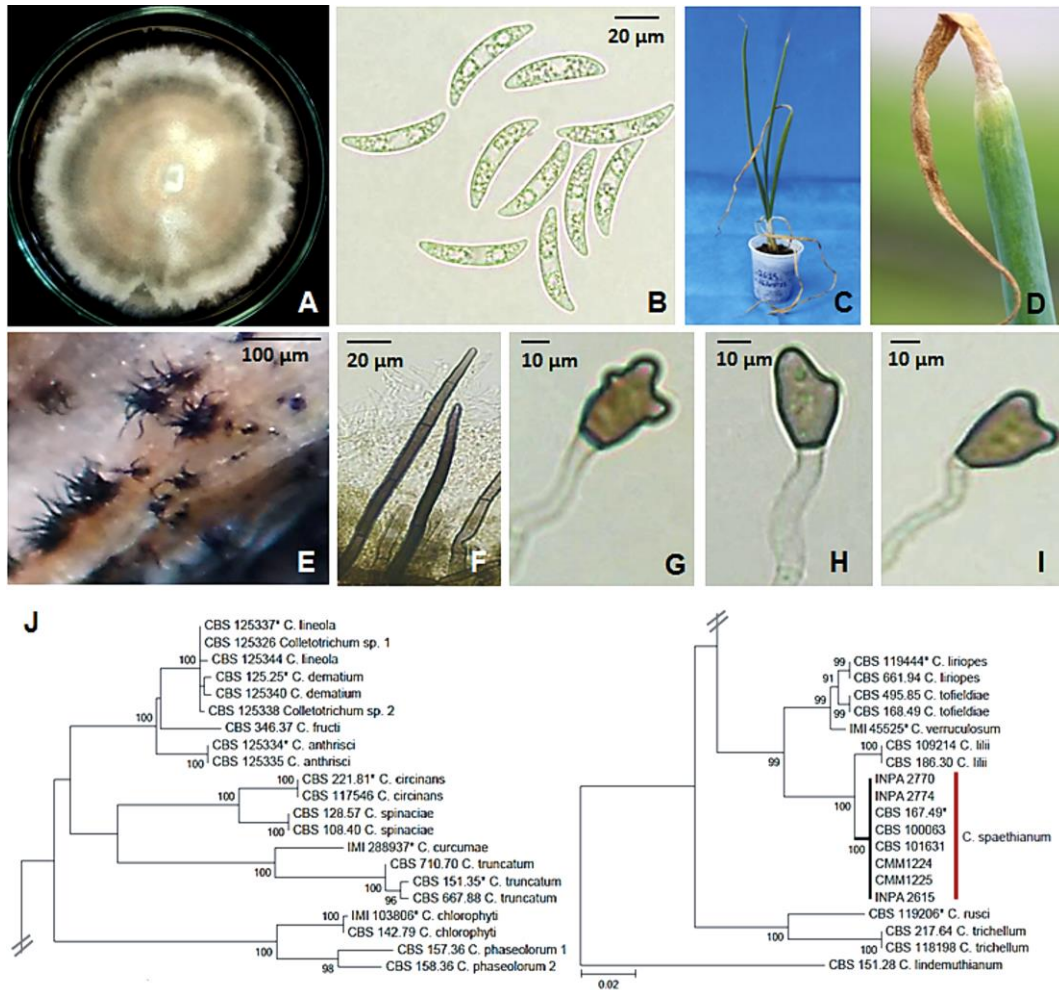


Fig. 1 **A**, *Colletotrichum spaethianum* on PDA after 10 days growth. **B**, conidia. **C** and **D**, anthracnose symptoms on Welsh onion. **E**, acervuli. **F**, seta. **G-I**, appressoria. **J**, Maximum likelihood tree showing phylogenetic affinities of *Colletotrichum* isolates with *C. spaethianum* type (*) using combined analysis of genes ACT and CHS-1.