

Diferenciação de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoesterase, e produção de enzimas extracelulares

Tereza Cristina de Assis¹, Maria Menezes², Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade¹, Rildo Sartori Barbosa Coelho¹

¹IPA, Área de Fitossanidade, Laboratório de Fitopatologia, 50761-000, Recife-PE, Brasil; ²UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

Autora para correspondência: Tereza Cristina de Assis (crisrina.assis@ipa.br)

Data de chegada: 03/10/2005. Aceito para publicação em: 23/03/2010.

1262

RESUMO

Assis, T.C., Menezes, M.; Andrade, D.E.G.T., Coelho, R.S.B.. Diferenciação de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoesterase, e produção de enzimas extracelulares. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.140-144, 2010.

Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5 e ISO-6), agente causal da antracnose em frutos de mangueira, foram caracterizados por meio de padrões eletroforéticos de proteínas totais e esterase, em gel de poli(acrilamida) e produção de enzimas extracelulares, em substratos sólidos específicos. A análise eletroforética mostrou variação no número, intensidade de coloração e posição das bandas no gel, dentro dos dois sistemas estudados.

Verificou-se polimorfismo em relação a esterase, mostrando maior diferença entre os isolados, enquanto que nas proteínas totais, observou-se comportamento aparentemente uniforme. Quanto à produção de enzimas extracelulares: amilase, lipase e protease, todos os isolados, embora variando em comportamento, apresentaram atividade para essas enzimas, sendo aparentemente mais acentuada à atividade proteolítica.

Palavras-chave adicionais: *Mangifera indica*, proteínas, isoenzimas, enzimas hidrolíticas, antracnose.

ABSTRACT

Assis, T.C., Menezes, M.; Andrade, D.E.G.T., Coelho, R.S.B.. Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates by using total proteins and esterase electrophoretic patterns and extracellular enzymes production. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.1, p.140-144, 2010.

Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5 and ISO-6), the causal agent of anthracnose disease on mango fruits, were characterized by electrophoretic patterns of total proteins and esterase in polyacrylamide gel, and also, by production of extracellular enzymes on specific solid substrate. The electrophoretic analysis showed variation in number, intensity of coloration and position of the bands in the gel at

each studied system tested. In contrast to the monomorphic behavior to total proteins, high esterase polymorphism was observed indicating difference among isolates. All isolates showed the activity of extracellular enzymes such as amylase, lipase, and protease with some variation among them. The proteolytic activity seemed to be more accentuated than the two other enzymes studied.

Keywords: *Mangifera indica*, proteins, isoenzymes, hydrolytic activity, anthracnose.

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk), é uma das doenças mais comuns e importantes da mangueira (*Mangifera indica* L.), amplamente disseminada nas regiões produtoras de manga do Brasil e do mundo (24). O patógeno ocorre em todas as fases de desenvolvimento da planta, porém no florescimento e formação dos frutos os prejuízos são maiores devido à queima e queda de flores e frutos jovens. Em frutos maduros há o aparecimento de lesões escuras, ligeiramente deprimidas e com formatos variados, culminando com a podridão de pós-colheita, durante o armazenamento e comercialização (5).

O patógeno tem capacidade de atacar diferentes variedades de manga, com variações quanto aos sintomas induzidos nos frutos. Além disso, apresenta também variação na morfologia, critério primário tradicionalmente usado na identificação da espécie. Alguns isolados de *C. gloeosporioides*, embora semelhantes em morfologia, apresentam diferenças de comportamento cultural e patogênico.

Em anos recentes, vários métodos têm sido propostos para detecção da variabilidade entre espécies ou entre isolados de uma mesma espécie fúngica. Entre métodos, são citados as análises eletroforéticas de padrões protéicos e isoenzimáticos (2, 7), a produção de enzimas extracelulares (20), a análise de DNA, por meio de marcadores RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA (26), além de outros, representando avanços significantes na taxonomia de *Colletotrichum* (8).

A eletroforese de proteínas tem contribuído para resolução de problemas taxonômicos em fungos. Segundo Hennebert & Vancanneyt (14), a principal razão para a escolha do padrão protéico como um caráter adicional para identificação de fungos é que a diversidade na produção de proteínas está diretamente relacionada à variabilidade genética, e pode expressar diferenças ou similaridades específicas entre os organismos.

A análise de isoenzimas evidencia a variação na sequência de aminoácidos da molécula protéica que tem a mesma função

catalítica, detectando desta maneira a variação na sequência de DNA que codifica a proteína (15). Deste modo, as análises isoenzimáticas permitem distinguir várias espécies de *Colletotrichum* ou mesmo isolados dentro de uma mesma espécie (7, 22, 25).

As enzimas extracelulares de fungos são muito importantes no processo patogênico (12). A produção dessas enzimas pode ser avaliada através da habilidade do organismo degradar substratos específicos, como aqueles indicativos de atividade celulolítica, lipolítica, amilolítica e proteolítica, dentre outras. As variações nos níveis de produção dessas enzimas também podem ser utilizadas para diferenciar espécies fúngicas (20).

Considerando a importância de *C. gloeosporioides*, como patógeno de frutos de mangueira, o presente trabalho teve como objetivo principal, diferenciar isolados obtidos de mangas, com sintomas de antracnose, utilizando padrões eletroforéticos de proteínas totais e esterase, como também a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, visando fornecer subsídios básicos para estudos taxonômicos em níveis subespecíficos.

MATERIALE MÉTODOS

Padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoesterase de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

Preparo dos extratos protéicos

Isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de frutos de manga, com sintomas de antracnose, das variedades Espada (ISO-1, ISO-2, ISO-3 e ISO-4) e Rosa (ISO-5 e ISO-6) (3), foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e após oito dias, discos de micélio (5mm de diâmetro) foram removidos das colônias e transferidos para frascos de Erlenmeyers contendo 50mL do meio líquido BD (batata-dextrose), sendo incubados por cinco dias em claro contínuo, a temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, a massa micelial foi coletada por filtração, lavada com água destilada esterilizada e o excesso de umidade retirado com auxílio de papel de filtro. O micélio fresco (2g) de cada um dos isolados foi individualmente triturado em almofariz mantido em banho de gelo, em 2mL do tampão tris-glicina a 0,125M, pH 8,2, com adição de 300 mg de sacarose e 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP), visando romper as células e liberar as proteínas. Após o processo, as amostras foram mantidas a 4°C , durante um período de 4 horas, sendo depois filtradas em gaze dupla, obtendo-se dessa maneira o extrato protéico (2).

Preparo do gel e corrida eletroforética

O gel de poli(acrilamida a 5% AA/BIS (acrilamida e bis-acrilamida), foi preparada pela dissolução da acrilamida e bis-acrilamida na solução tampão tris-glicina, pH 8,2. À mistura foram cuidadosamente adicionados 0,1mL de TEMED (tetrametildiamina) e 2,8mL de persulfato de amônia a 1%. Em seguida, vertida no molde de vidro até a polimerização completa. O gel foi colocado numa cuba horizontal contendo tampão tris-glicina a 0,125M, pH 8,2, fazendo-se uso de tecido tipo perfex® como ponte de conexão. Os extratos foram aplicados, individualmente, com auxílio de micropipetas, empregando-se 20 µL de cada amostra por cavidades do gel, procedendo-se em seguida a corrida eletroforética a 4°C , mantendo a corrente constante em 10 mA, durante 4 horas (2). O corante utilizado como marcador foi azul de Bromofenol.

Coloração para detecção de proteínas totais e esterase

Para detecção de proteínas totais, o gel foi imerso por 12 horas na solução corante constituída de Coomassie blue RR-250, em condições de laboratório. Após este período, o gel foi lavado em três porções sucessivas de solução clareadora PAGE, contendo metanol (45mL), água destilada (45mL) e ácido acético glacial (10mL). A coloração para detecção de esterase foi realizada através da imersão do gel, por 1 hora a 37°C , em solução corante preparada com tampão fosfato a 0,1 M, pH 6,5 (100mL), alfa-naftil-acetato 1% (0,05g), Fast Blue (0,05g), acetona (2,5mL) e água destilada (2,5mL). Para a fixação das bandas, o gel foi imerso numa solução preparada com metanol (100mL), ácido acético (20mL), glicerol (0,5mL) e água destilada (80mL) (2).

Secagem e interpretação dos géis

A secagem dos géis foi efetuada colocando-os entre lâminas de papel celofane e deixando-os por um período de 48 horas, em condições normais de laboratório. A interpretação dos géis foi realizada com base no número, intensidade de coloração e posição das bandas de proteínas e isoesterase. Para o cálculo da mobilidade relativa (Rf) das bandas foi empregada a fórmula $Rf = (d/D) \times 100$ (2), onde d= distância percorrida pela molécula e D= distância percorrida pelo corante marcador.

Os valores das Rfs do sistema protéico e isoesterásico foram utilizados para avaliar a diferenciação dos isolados de *C. gloeosporioides*, por meio da análise da distância Euclidiana e agrupados pelo método de Single Linkage, utilizando o programa STATISTICA for Windows, versão 5.1 (@StatSoft Inc., Tulsa, USA).

Produção de enzimas extracelulares por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meios sólidos específicos

Atividade amilolítica

A habilidade dos isolados de *C. gloeosporioides* em degradar o amido foi determinada em meio constituído de extrato de carne, 3,0g; peptona, 5,0g; ágar, 15,0g; água destilada, 1000mL e 0,2% de amido solúvel (13). Discos de micélio (5mm de diâmetro) retirados de colônias jovens foram transferidos para o centro de placas de Petri, contendo o referido substrato. Após 5 dias de incubação, foram adicionados à colônia 5mL de uma solução de iodo (lugol) para detecção do substrato degradado, visualizado como uma zona amarela ao redor da colônia de cada isolado, sendo essa zona medida (mm) em dois sentidos diametralmente opostos utilizando régua milimetrada.

Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada empregando meio de cultura basal na seguinte composição: peptona, 10,0g; NaCl, 5,0g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1g; ágar, 17,0g e água destilada (1000mL), contendo como substrato lipídico, sorbitol monolaurato - Tween 20 (13). O Tween 20 foi autoclavado separadamente, por 15 minutos e adicionado, posteriormente, ao meio basal, na proporção de 1mL para cada 100mL do meio. Discos de micélio de *C. gloeosporioides* foram transferidos para o centro de placas de Petri e a atividade lipolítica avaliada pela presença de um halo opaco formado em torno das colônias, após 5 dias de incubação. A medição do halo foi realizada da mesma forma descrita no item anterior.

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica dos isolados de *C. gloeosporioides* foi

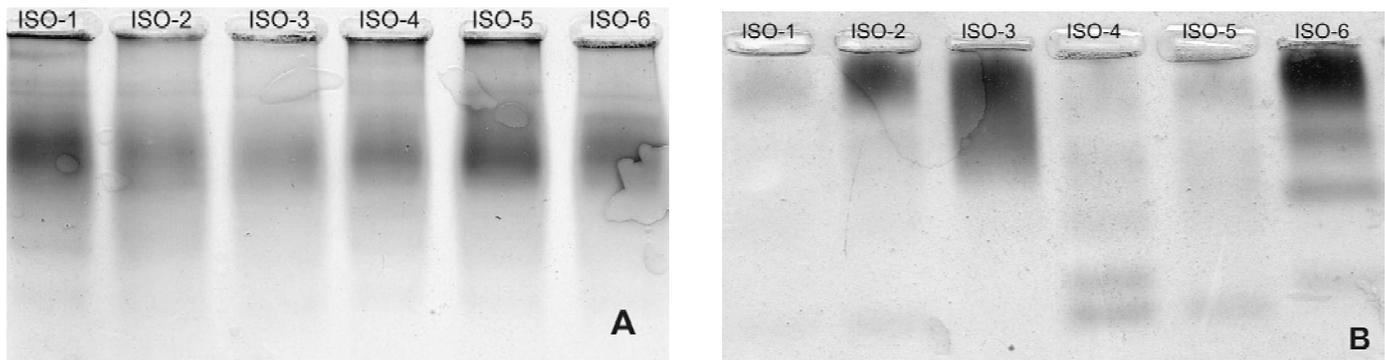


Figura 1. Padrões eletroforéticos de proteínas totais (A) e isoesterase (B), dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, em gel de poliacrilamida.

testada através da hidrólise de caseína em meio ágar-leite: leite desnatado, 100mL; ágar a 2%; água destilada, 500mL (23). Da mesma maneira que nos testes anteriores os discos de micélio do patógeno foram transferidos para o centro de placas de Petri e incubadas durante 5 dias. A atividade da enzima foi avaliada pela presença de halo de degradação em torno das colônias. A medida do halo foi efetuada da mesma forma já descrita.

Em todos os casos, os isolados de *C. gloeosporioides* (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5 e ISO-6) foram incubados em condições de luz contínua e a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo os dados submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoesterase de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

O padrão protéico revelou maior uniformidade entre os isolados de *C. gloeosporioides*, enquanto que, o isoesterásico mostrou a ocorrência de polimorfismo, com a exceção do ISO-1 e ISO-3, indicando variabilidade genética dos isolados, conforme apresentado na Figura 1.

Com relação às proteínas totais, os isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram bandas de intensidade forte, praticamente numa mesma região do gel (Figura 1A), embora pequena variação na posição tenha sido observada (Tabela 1). No entanto, estes isolados apresentaram expressiva variação para isoesterase quanto à intensidade da coloração

Tabela 1. Mobilidade relativa (Rf)* das bandas de proteínas totais apresentadas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Região do gel	ISO-1	ISO-2	ISO-3	ISO-4	ISO-5	ISO-6
1	3,3	-	-	-	-	-
2	10,0	10,0	10,0	10,0	-	10,0
3	-	11,6	-	11,6	11,6	-
4	13,3	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	28,3
6	-	-	-	30,0	30,0	-
7	31,6	31,6	31,6	-	-	-

*Mobilidade relativa obtida pela aplicação da fórmula: $Rf = (d/D) \times 100$ (2).

Tabela 2. Mobilidade relativa (Rf)* das bandas de esterase apresentadas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Região do gel	ISO-1	ISO-2	ISO-3	ISO-4	ISO-5	ISO-6
1	-	-	-	-	10	-
2	13,3	13,3	-	-	-	13,3
3	-	-	-	16,6	-	-
4	-	-	-	-	23,3	-
5	-	25,0	-	-	-	25,0
6	-	-	-	28,3	-	-
7	-	-	33,3	-	33,3	-
8	-	-	-	-	-	35,0
9	-	-	-	41,6	-	-
10	-	-	-	58,3	-	58,3
11	-	-	-	-	63,3	-
12	-	-	-	65	-	-
13	-	66,6	-	-	-	-

*Mobilidade relativa obtida pela aplicação da fórmula: $Rf = (d/D) \times 100$ (2).

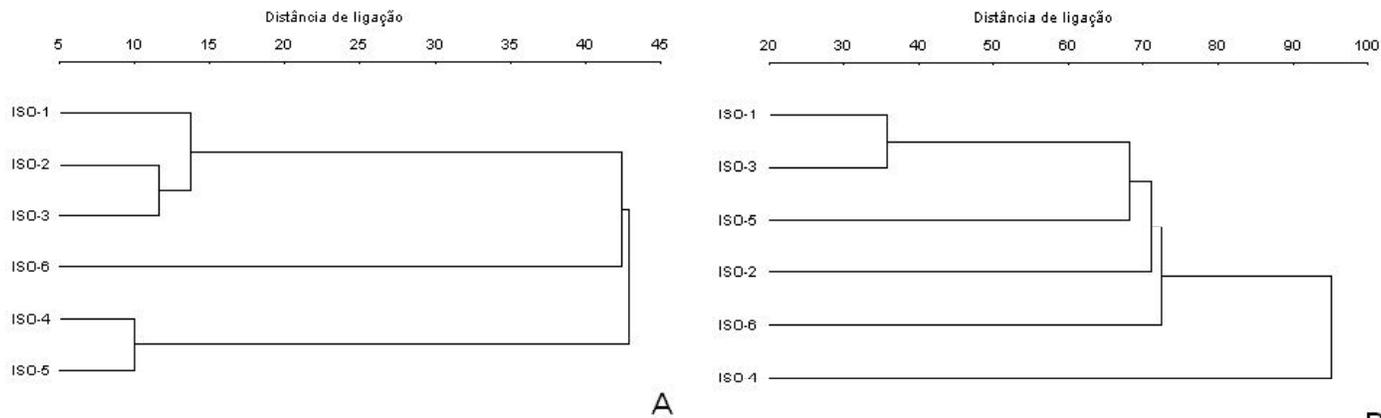


Figura 2. Dendrograma mostrando a diferenciação de seis isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5, ISO-6), obtido por meio da análise da distância Euclidiana e agrupados pelo método de Single Linkage, considerando a mobilidade relativa das bandas, para proteínas totais (A) e isoesterase (B).

e número de bandas (Figura 1B), assim como, quanto à mobilidade relativa das mesmas (Tabela 2). Resultados similares em relação aos padrões protéicos foram constatados por Figueredo (11) e Rego et al. (22) que observaram uma baixa variabilidade para *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Sorib. e *C. orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx., respectivamente, contrastando com os resultados obtidos por Vêras et al. (25) que relataram grande polimorfismo de nove isolados de *C. guaranicola* Albuquerque, agente da antracnose do guaranzeiro (*Paullinia cupana* Ducke), com relação aos fenótipos para proteínas totais.

Enzimas são codificadas por diferentes alelos ou locos gênicos distintos, possuindo, freqüentemente, mobilidades diferentes, sendo estas diferenças atribuídas a variações na composição de aminoácidos ou no tamanho da molécula, o que, por sua vez, depende da seqüência de nucleotídeos do DNA (16, 17), demonstrando, desta forma, variabilidade genética existente entre indivíduos.

Na análise de agrupamento dos isolados, com base nos dados da mobilidade relativa (Rf) das bandas de proteínas totais, foi verificado a ocorrência de três grupos: I (ISO-1, ISO-2, ISO-3), II (ISO-6) e III (ISO-4, ISO-5), tendo este último exibido menor distância de ligação, sendo o contrário observado para o isolado do grupo II (Figura 2A). O padrão de proteínas é diretamente relacionado ao código genético, e vem sendo utilizado como um caráter para diagnóstico de fungos, por expressar semelhanças ou diferenças entre os isolados de uma mesma espécie (6, 17).

O agrupamento dos isolados com base nas diferenças apresentadas pelos padrões da mobilidade relativa (Rf) das bandas de isoesterase, admitindo a distância de ligação 40, possibilitou a separação dos isolados em cinco grupos: I (ISO-1, ISO-3), II (ISO-5), III (ISO-2), IV (ISO-6) e V (ISO-4) (Figura 2B), tendo os isolados do grupo I expressado a menor distância de ligação, enquanto o ISO-4, do grupo V, foi geneticamente mais distante em relação aos demais, no sistema esterásico. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a presença de tipos fisiológicos diferentes na espécie *C. gloeosporioides*. Vale ressaltar que o isolado ISO-4, em trabalhos realizados por Assis et al. (3) comportou-se como o mais agressivo, em relação aos demais, na indução de sintomas de antracnose em frutos de três variedades de mangueira. As diferenças na expressão sintomática podem ser conseqüências da carga genética do fungo e genótipo do hospedeiro, pois a existência de compostos antifúngicos pré-formados em mangas, ocorrendo em concentrações elevadas pode inibir a ação de *C.*

gloeosporioides (5). De maneira similar, Vêras et al. (25), comparando isolados de *C. guaranicola* através do sistema esterásico, observaram diferentes padrões de bandas entre os isolados, indicando a ocorrência de variabilidade dentro dessa espécie.

O perfil isoesterásico revelou a possibilidade de uso deste sistema para diferenciação de isolados de *C. gloeosporioides* agente da antracnose, conforme evidenciado também por Assunção et al. (4), em estudos comparativos de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de folhas de cebola, através dos padrões de esterase e outras enzimas. Do mesmo modo, Rego et al. (22) diferenciaram isolados de *C. orbiculare*, oriundos de cucurbitáceas, através do padrão de bandas apresentado pela análise eletroforética de isoesterase e outras enzimas.

Produção de enzimas extracelulares por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em meios sólidos específicos

Todos os isolados de *C. gloeosporioides* demonstraram atividade enzimática para amilase, lipase e protease, avaliadas por difusão em substratos específicos, conforme mostrado na Tabela 3.

Na atividade amilolítica, todos os isolados apresentaram halo de degradação, na maioria superior a 40,0mm, diferindo significativamente do isolado ISO-5 (30,0mm) com menor halo de degradação. O ISO-5 mostrou ser uma variante genética com menor capacidade para produção de amilase. Segundo Dianese (10), as amilases são comuns em fungos

Tabela 3. Atividade de enzimas extracelulares de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Isolado	Halo (mm)		
	Amilolítica	Lipolítica	Proteolítica
ISO-1	44,17 a	7,83 a	43,33 ab
ISO-2	43,00 a	8,50 a	44,00 b
ISO-3	44,17 a	7,83 a	44,83 ab
ISO-4	43,67 a	6,17 a	49,17 a
ISO-5	30,00 b	7,50 a	41,00 b
ISO-6	40,50 a	7,17 a	45,67 ab
Média	40,90	7,50	44,70
C.V.(%) =		8,51	

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

permitindo a hidrólise do amido até glucose, entretanto, pouco se sabe sobre a sua importância na patogênese. A produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie (19), em função da concentração de amido no meio de cultura (1), como também do período de incubação. Lima (15), trabalhando com *C. graminicola*, verificou que um período de incubação superior a 10 dias favoreceu a maior degradação do amido para todos os isolados testados.

A atividade lipolítica foi verificada em todos os isolados, de *C. gloeosporioides*, porém em menor intensidade em relação a lipase e protease, com halos de diferentes tamanhos, sem no entanto diferirem significativamente entre si. De maneira similar, Lima (15), estudando isolados de *C. graminicola*, verificou aos 15 dias de incubação uma alta atividade para lipase. O halo de degradação observado é decorrente da formação de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da enzima e pela completa degradação dos sais de lipídios (13). As lipases que atacam fosfolípidos representam um complexo enzimático com potencial importante na patogenicidade, pois degradam um componente celular de grande valor que é a membrana plasmática do hospedeiro (12). Além disso, várias lipases produzidas por fungos são na realidade cutinases, que auxiliam na penetração do patógeno na planta hospedeira. A atividade lipolítica também tem sido bem documentada em outros patossistemas (18, 21).

Na atividade proteolítica observou-se variação no comportamento dos isolados de *C. gloeosporioides*, com destaque para ISO-4 que apresentou maior halo de degradação (49,17mm). A variação da atividade proteolítica de alguns fungos é decorrente da sua própria constituição genética, cuja expressão depende também do pH e temperatura, assim como, da presença de fontes de carbono, nitrogênio e/ou enxofre no meio (12). O papel das proteases em *C. gloeosporioides* é pouco conhecido, no entanto, Dean (9) verificou que a mucilagem que envolve os conídios desse patógeno é composta por glicoproteínas de alto peso molecular e que tratamentos enzimáticos que removam carboidratos destroem essas proteínas, frequentemente inibindo o ataque do patógeno.

Considerando o conjunto dos resultados obtidos neste estudo, a utilização de padrões eletroforéticos de isoesterase, mesmo utilizando um reduzido número de isolados, demonstrou variabilidade genética, ou seja, diversidade entre isolados de *C. gloeosporioides*, sendo, portanto, uma ferramenta importante para estudos sobre taxonomia química desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afe, E.O.; Oso, B.A. Amylolytic activities of culture filtrates of *Rhizopus oryzae* and *Botryodiplodia theobromae*. **International Journal of Food Science & Technology**, Cambridge, v.28, n.2, p.110-111, 1991.
2. Alfenas, C.A.; Peters, I.; Brune, W.; Passador, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas para identificação de espécies de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
3. Assis, T.C.; Menezes, M.; Andrade, D.E.G.T.; Coelho, R.S.B.; Oliveira, S.M.A. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v.27, p.208-212, 2001.
4. Assunção, I.P.; Alfenas, A.C.; Coelho, R.S.B.; Lima, G.S.A. Análise isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose foliar da cebola. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v.25, n.4, p.293-298, 1999.
5. Bailey, J.A.; Jeger, M.J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford: C.A.B. International, 1992. 388p.
6. Bonde, M.R.; Micales, J.A.; Peterson, G.L. The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.8, p.961-968, 1993.
7. Bonde, M.R.; Peterson, G.L.; Maas, J.L. Isozyme comparison for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.12, p.1523-1528, 1991.
8. Buddier, A.G.; Marinez-Culebras, P.; Bridger, P.D.; Garcia, M.D.; Querol, A.; Cannon, P.F.; Monte, E. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, n.4, p.385-394, 1999.
9. Dean, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.211-234, 1997.
10. Dianese, J.C. **Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta-patógeno**. Brasília: UNB, 1989.139p.
11. Figueredo, G. **Padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de raças de *Colletotrichum lindemuthianum***. 1990. 90f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
12. Griffin, D.H. **Fungal physiology**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1994. 458p.
13. Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, v.67, n.4, p.597-607. 1975.
14. Hennebert, G.L.; Vancanneyt, M. Proteins in Fungal taxonomy. In: Frisvad, J.C.; Bridge, P.; Arora, D.K. (Eds.) **Chemical fungal taxonomy**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.77-106.
15. Lima, M.L.F. **Caracterizações patogênica, fisiológica e enzimática de isolados de *Colletotrichum graminicola* (Ces) G.W. Wilson, agente causal da antracnose do milho, *Zea mays* L.** 2000. 87f. Dissertação (Mestrado em Biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco.
16. McDonald, B.A.; McDermott, J.M. Population genetics of plant pathogenic fungi. **Bioscience**, Washington, v.43, n.5, p.311-319, 1993.
17. Micales, J.A.; Bonde, M.R.; Peterson, G.L. The use of isoenzyme analysis in fungal taxonomy and genetics. **Mycotaxon**, Ithaca, v.27, n.3, p.405-449, 1986.
18. Mirza, A.Q.; Akhtar, M.W.; Chughtai, M.J.D. Effect of different triglycerides on lipase production by various *Mucor* species. **Journal of Biochemistry**, Tokio, v.107, n.1, p.10-17, 1979.
19. Nwufu, M.I.; Fajola, A.O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corm rots of colocasia esculenta. **Acta Microbiologica Hungarica**, Budapest, v.35, n.4, p.371-378, 1988.
20. Paterson, R.R.M.; Bridge, P.D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. Wallingford: C.A.B. International, 1994. 125p.
21. RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v.17, n.9, p.832-838, 1995.
22. Rego, A.M.; Maffia, L.A.; Alfenas, A.C. Virulência e análise de isoenzimas de *Colletotrichum orbiculare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.4, p.552-559, 1994.
23. Sarath, G.; DE La Motte, R.S.; Wagner, F.W. Protease assay methods. In: BEYNON, R.J.; BONDE, J.S. (Eds.) **Proteolytic Enzymes: an practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1989. p.25-54
24. Silva, M.J.; Santos Filho, H.P. Antracnose da mangueira causada por *Glomerella cingulata* Stoneman (S. & V.S.) *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Brasília, v.6, n.1, p.7-15, 1984.
25. Vêras, S.M.; Gasparotto, L.; Menezes, M. Avaliação isoenzimática de *Colletotrichum guaranicola*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.40, n.5, p.548-553, 1997.
26. Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, L.A.; Bennet, J. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Cambridge, v.18, p.6531-6535, 1990.